



## ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

**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

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Javier Capilla Luque, Profesor Agregado de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili y Josep Guarro Artigas, Catedrático de la Unitat de Microbiologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili.

HACEN CONSTAR QUE:

La Tesis Doctoral titulada "**Actividad y eficacia experimental de fármacos antifúngicos frente a levaduras causantes de micosis sistémicas**", presentada por Pamela Evelyn Thomson Morales, 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, 03 de marzo de 2016

Dr. Javier Capilla Luque

Dr. Josep Guarro Artigas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES**

**ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE  
FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS  
CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS**

**Pamela Evelyn Thomson Morales**

**Directores: Dr. Javier Capilla Luque**

**Dr. Josep Guarro Artigas**

**2016**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

*Dedicado a mi pequeña Sofía*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

## AGRADECIMIENTOS

Comenzaré estas importantes palabras agradeciendo a mis directores de tesis Dr. Javier Capilla y Dr. Josep Guarro, por su paciencia, por recibirme en esta unidad y darme la oportunidad de aprender junto a los mejores micólogos. También por todas las aportaciones realizadas a mi tesis doctoral y manuscritos incluidos en ella.

Quiero expresar mi cariño y admiración a mi querido Jefe Dr. Guarro, que con su estilo único, me enseñó de micología y de la vida.

Con especial aprecio, agradezco al Dr. José Cano por su ayuda en este difícil camino, por sus consejos y por dejarme ver que a parte de un gran Doctor y Profesor es un hombre con un tremendo corazón.

Igualmente al Dr. Emilio Mayayo por sus conversaciones mezcladas de humor, tinciones y formas.

Expreso también mi agradecimiento y respeto a todos y cada uno de los miembros de esta familia llamada “Unidad de Microbiología”.

A la distancia, agradezco al Dr. Víctor Silva por creer en mí y darme la oportunidad de aprender al lado del mejor grupo de científicos.

Continuaré agradeciendo a mi pequeña Sofia, que sin tener voz ni voto me acompañó en esta arriesgada aventura. Gracias hija, por tu inocencia, tu sonrisa, tu dulzura y tantas cosas que me alegran la vida.

Queridos y amados padres, gracias infinitas por hacerme crecer, por dejarme volar, por apoyarme y estar presentes en cada una de mis batallas, por reír con mis triunfos y llorar con mis fracasos. Mamá, gracias por transmitirme tu fortaleza; Papá gracias por



transmitirme tu serenidad cuando más los necesitaba. Por cuidarnos y estar desde el corazón día a día con nosotras, ustedes han sido y serán lo mejor que el universo nos ha entregado.

A mi hermano querido.....mi cómplice, gracias por estar con nosotras, por apoyarnos y cuidarnos, por creer en mí, por compartir momentos únicos, impregnados de grandes cuotas de amor y de humor.

A mi otro pedacito de Chile, tío Yemito, tía Paty, prima Melody, abuelita Mary, tía Berta, tío Caco; agradecerles por estar siempre apoyándonos a la distancia.

Amparito y Eduardo, los mejores padres y abuelos adoptivos que la vida nos regaló. Gracias por cuidarnos y apoyarnos.

A mis amigas y amigos Dra. Fadua Latif, Dra. Alejandra Giraldo, Dr. Marcelo Sandoval; alias mis brujitas/alias el potro; Nicomedes y Marcelita. Gracias chicos, por su sinceridad, por aceptarnos tal como somos, por haber sido parte de nuestras vidas, por estar para nosotras disfrutando comidas, cenas, viajes, días soleados y lluviosos.

Y a mí Satur, que lo menciono al final solo por orden de aparición en nuestras vidas. Gracias nen!

Para finalizar, y recordando a mi abuela quisiera citar a Violeta Parra diciendo: “gracias a la vida que me ha dado tanto”



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades del Reino <i>Fungi</i> .....	1
1.2. La infección fúngica.....	6
1.3. Tipos de infecciones fúngicas o micosis.....	7
1.3.1. Micosis superficiales.....	7
1.3.2. Micosis cutáneas.....	7
1.3.3. Micosis subcutáneas.....	8
1.3.4. Micosis profundas.....	8
1.3.5. Micosis sistémicas.....	9
1.3.6. Micosis producidas por hongos oportunistas.....	9
1.3.6.1. <i>Saprochaete capitata</i> .....	10
1.3.6.2. <i>Cryptococcus albidus</i> y <i>Cryptococcus laurentii</i> .....	12
1.3.6.3. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	14
1.3.6.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
1.4. Compuestos antifúngicos.....	17
1.4.1. Polienos.....	18
1.4.1.1. Anfotericina B.....	18
1.4.2. Antifúngicos azólicos.....	19
1.4.2.1. Imidazoles.....	19
1.4.2.2. Triazoles.....	20
1.4.3. Equinocandinas.....	22

1.4.4. Pirimidinas .....	22
1.4.5. Otros compuestos antifúngicos.....	23
1.5. Combinaciones antifúngicas .....	24
1.6. Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos .....	25
1.7. Determinación experimental de la eficacia antifúngica .....	27
1.7.1 Estudios de patogenia .....	27
1.7.2 El ratón <i>Mus musculus</i> .....	27
1.7.3. Cuantificación de los niveles séricos de fármaco.....	28
1.8. Correlación entre los métodos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	29
<b>2. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1. Origen y conservación de las cepas.....	43
3.1.1. Identificación de las cepas .....	43
3.2. Estudios <i>in vitro</i> .....	47
3.2.1. Cepas .....	47
3.2.2. Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de compuestos antifúngicos o determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	48
3.2.3. Preparación de los agentes antifúngicos .....	50
3.2.4. Preparación de los inóculos para los estudios <i>in vitro</i> .....	51
3.2.5. Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de compuestos antifúngicos en combinación .....	52
3.2.6. Curvas de mortalidad.....	53
3.3. Estudios <i>in vivo</i> . .....	54

3.3.1. Cepas .....	54
3.3.2. Animales de experimentación .....	55
3.3.2.1. Inmunosupresión .....	55
3.3.2.2. Establecimiento de los modelos de infección.....	55
3.3.3. Administración de medicamentos .....	56
3.3.3.1. Oral (p.o.) .....	56
3.3.3.2. Intraperitoneal (i.p.).....	56
3.3.3.3. Intravenosa (i.v.).....	56
3.3.4. Determinaciones de concentraciones séricas.....	57
3.3.4.1. Cuantificación de antígeno en suero .....	58
3.3.4.2. Cuantificación de los niveles séricos de los fármacos mediante bioensayo.....	59
3.3.5. Determinación de la carga fúngica en órganos diana .....	60
3.3.5.1. Estudio histopatológico .....	60
3.3.5.1.1. Tinciones .....	61
3.3.6. Supervisión del dolor y sufrimiento en ratones .....	62
3.3.7. Análisis estadísticos.....	62
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
4.1. Efficacy of posaconazole in a murine model of systemic infection by <i>Saprochaete capitata</i> . 2015. Thomson P, Mayayo E, Guarro J, Capilla J. Antimicrob agents Chemother 59: 7477-7382. ....	67
4.2. Efficacy of amphotericin B combined to voriconazole in a neutropenic murine model of systemic infection by <i>Cryptococcus albidus</i> and <i>Cryptococcus laurentii</i> . 2016. Thomson P, Mayayo E, Capilla J, Guarro J. ....	73

4.3. Antifungal susceptibility, virulence and antifungal therapy of <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> in a murine model of disseminated infection. 2016. Thomson P, Mayayo E, Guarro J, Capilla J. ....	97
4.4. Antifungal susceptibility, virulence and antifungal therapy of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in a murine model of disseminated infection. 2016. Thomson P, Mayayo E, Capilla J, Guarro J. ....	127
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>151</b>
5.1. <i>Saprochaete capitata</i> .....	151
5.2. <i>Cryptococcus albidus</i> y <i>Cryptococcus laurentii</i> . ....	153
5.3. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	155
5.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	157
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>161</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>169</b>

---

## INTRODUCCIÓN



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

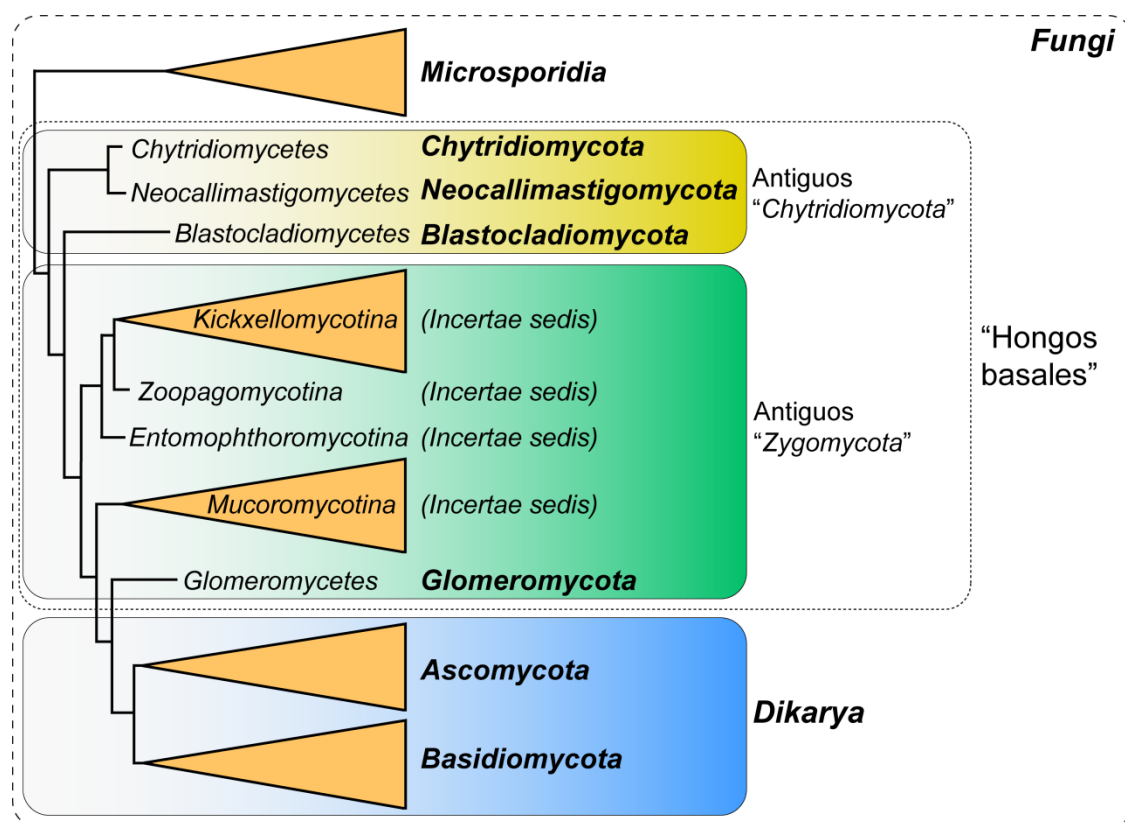
## 1. Introducción

### 1.1. Generalidades del Reino *Fungi*

El Reino *Fungi* constituye un grupo numeroso y heterogéneo de organismos distribuidos ampliamente en la naturaleza, que tienen un papel relevante en la descomposición de la materia orgánica, participando en distintos ciclos biológicos (Pontón, 2008). En base a las relaciones establecidas entre las especies de hongos conocidos con los distintos grupos de plantas que crecen en la tierra, se estima que pueden haber alrededor de unas 1.5 millones de especies fúngicas (Schmidt & Mueller, 2007). En la actualidad, hay aproximadamente 100.000 especies fúngicas descritas, cifra que va aumentando progresivamente a razón de un 1.2% por año (McLaughlin *et al.*, 2009).

La disponibilidad de caracteres bioquímicos, ultraestructurales y especialmente el avance en el estudio de genomas, ha permitido la reestructuración del sistema de clasificación de los seres vivos estableciendo relaciones filogenéticas con una base molecular. Así pues, en la actualidad el Reino *Fungi* constituye uno de los seis reinos del árbol de la vida, el cual comprende un subreino (*Dikarya*) y siete *phyla* (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporidia* y *Neocallimastigomycota*). El subreino *Dikarya* agrupa los *Ascomycota* y los *Basidiomycota* que incluyen hongos formadores tanto de hifas como de esporas dicarióticas (Hibbet *et al.* 2007). El antiguo *phylum* *Zygomycota*, que antaño agrupaba a los hongos evolutivamente más antiguos y productores de hifas cenocíticas, ya no es aceptado como tal y está considerado como un taxón polifilético (Hibbet *et al.* 2007). Sus miembros se encuentran ahora distribuidos entre el *phylum* *Glomeromycota* y cuatro

linajes de agrupación incierta siendo en conjunto informalmente denominados “hongos basales” (Hibbett *et al.*, 2007; McLaughlin *et al.*, 2009) (Figura 1). La mayoría de los hongos patógenos para el hombre se hallan incluidos en las divisiones *Ascomycota* y *Basidiomycota* y en el grupo de los antiguos “zigomicetos” que actualmente se denominan mucorales. Quedan todavía algunos pocos hongos patógenos que pertenecen a los *Entomophthoromycotina* aunque con escasa relevancia clínica. Sin embargo, hoy en día las categorías taxonómicas del Reino se encuentran en un estado de constante modificación debido a la fácil utilización de métodos moleculares (Boekhout *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Representación esquemática de la clasificación taxonómica vigente del Reino *Fungi*, se destacan los siete *Phyla* actualmente aceptados (en negrita) y el subreino *Dikarya*, junto con otros grupos parafiléticos previamente incluidos en la anterior clasificación de *Chytridiomycota* y en el extinto *Phyla Zygomycota*, informalmente denominados “hongos basales” (Sandoval, 2016; adaptado de Hibbet *et al.* 2007).

Los hongos son organismos eucariotas, poseen un núcleo que contiene varios cromosomas delimitados por una membrana nuclear, con un nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas. El citoplasma se encuentra limitado por una membrana, formada por una doble capa de fosfolípidos asociada a proteínas y esteroides y que es responsable de la permeabilidad y de participar en la síntesis de los componentes de pared celular. Externamente a la membrana, se encuentra la pared celular que está compuesta fundamentalmente por polisacáridos y diversas proteínas. Los polisacáridos más importantes son la quitina, el manano y el glucano que son polímeros de n-acetilglucosamina, manosa y glucosa respectivamente (Sangamwar *et al.*, 2008).

Desde un punto de vista simplista los hongos presentan básicamente en dos tipos de morfología, una multicelular o filamentosa y otra unicelular o levaduriforme. Los hongos filamentosos también llamados miceliares o mohos, representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En medios de cultivo sólido y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, producen colonias algodonosas o pulverulentas que suelen ser características de los diferentes géneros y especies. Al microscopio óptico, los hongos filamentosos presentan unas estructuras tubulares, formadas por múltiples células que se denominan hifas y que en su mayoría son tabicadas con septos que delimitan las diferentes células. Sin embargo, los mucorales presentan hifas que carecen de septos denominándose cenocíticas o sifonadas. Las hifas normalmente se desarrollan a partir de esporas, aunque también pueden originarse a partir de fragmentos de otras hifas, que se ramifican con frecuencia hasta producir una maraña de filamentos que constituyen el micelio. En la colonia de un hongo filamentoso, se produce una clara diferenciación en las funciones del micelio, de tal forma que el micelio

vegetativo penetra en el sustrato para obtener los nutrientes, mientras que el micelio aéreo se proyecta hacia el exterior de la colonia y produce las estructuras reproductoras. Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas que recuerdan a las bacterianas, cuando se desarrollan en medios de cultivo sólidos. Dichas colonias están formadas por agregados de células individuales denominadas levaduras. Los hongos levaduriformes se dividen por gemación o por fisión binaria. En algunos casos las células hijas no acaban separándose de la célula madre, formando en su lugar cadenas cortas denominadas pseudohifas, originando un pseudomicelio. Los hongos que presentan este tipo de crecimiento, dan lugar a colonias similares a las que producen los hongos levaduriformes en medios sólidos. Un pequeño grupo de hongos, pero de gran importancia en clínica, presentan tanto un crecimiento levaduriforme como miceliar. Estos hongos se denominan dimorfos y típicamente presentan un crecimiento filamentoso a 25 °C y un crecimiento levaduriforme a 37 °C cuando invaden al hospedero.

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción presentando un metabolismo quimioheterótrofo al obtener la energía y las fuentes de carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas (Montes *et al.*, 2003; Pontón, 2008).

En el laboratorio, los hongos crecen fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo, necesitando fundamentalmente una fuente de carbono orgánica e iones amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno. Sus requerimientos de temperatura y de pH son poco exigentes y la mayoría crecen en un rango de pH de 2 a 9 y a temperaturas entre 10 y 40 °C. La mayoría de los hongos presentan reproducción sexual y asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. Es común

que un mismo hongo tenga dos o más nombres, el del estado anamorfo y el del estado teleomorfo, ya que generalmente se descubrieron y nombraron de forma independiente. Así, por ejemplo la levadura *Candida krusei*, también se conoce como *Pichia kudriavzevii*, que es su teleomorfo. Además en algunas especies se da la particularidad que puede haber dos formas asexuales que se propagan independientemente, llamadas sinanamorfos. Así el género *Scedosporium* tiene un sinanamorfo, *Graphium*, y un teleomorfo *Pseudallescheria* con estructuras de reproducción distintas, pero genéticamente iguales. Actualmente, la comunidad micológica está haciendo un esfuerzo por simplificar la nomenclatura de los hongos y en la «Declaración de Ámsterdam de nomenclatura fúngica» surgida en el año 2011 (Haksworth *et al.* 2011) se establecieron las bases del sistema de nomenclatura, el cual no acepta el uso de dos nombre para una misma especie (Gruter & Ranquín Rodríguez, 2012).

Muchos hongos se reproducen tanto de forma sexual como asexual, por medio de esporas, aunque la reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, ya que cada fragmento puede generar, una nueva colonia. Los hongos producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia. Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y es de importancia para la identificación fúngica, ya que suelen presentar diferencias morfológicas características. Sin embargo, en muchas especies fúngicas se desconoce la fase telomórfica, bien porque no es observable bajo condiciones experimentales; o bien porque han perdido dicha fase (Pontón *et al.*, 2002).

## 1.2. La infección fúngica

La capacidad de los hongos para causar enfermedades en los seres humanos parece ser un fenómeno accidental, ya que su patogenicidad no es necesaria para el mantenimiento o la difusión de la especie. En general, el desarrollo de las micosis humanas se relaciona principalmente con el estado inmunológico del hospedero y su exposición ambiental a los propágulos fúngicos (Rex & Pfaller, 2002). Un pequeño número de hongos, tradicionalmente denominados patógenos primarios, tienen la capacidad de causar infecciones en seres humanos sanos. Por ejemplo, los dermatofitos, que poseen enzimas como la queratinasa y la elastasa u otros en cambio, presentan dimorfismo térmico, como *Sporothrix* o poseen un mecanismo capaz de bloquear las defensas inmunes mediadas por células del hospedero como ocurre en las infecciones por *Histoplasma capsulatum*. Por lo tanto, el mecanismo básico de la patogenicidad fúngica es su capacidad para adaptarse al entorno del tejido y resistir el dinamismo del sistema inmune del hospedero (Casadevall & Pirofski, 2001).

Además de los denominados patógenos primarios, existen muchas especies de hongos, tradicionalmente considerados como saprobios, que pueden llegar a ser la causa de enfermedades graves e incluso fatales para el hombre. Estas especies fúngicas son considerados globalmente como hongos oportunistas (Walsh *et al.*, 2004; Stajich *et al.*, 2009).

### **1.3. Tipos de infecciones fúngicas o micosis**

Una forma habitual de clasificar las micosis ha sido atendiendo a su localización anatómico-clínica, ya sea en el hospedero inmunocompetente o en el inmunodeprimido. Así podemos clasificarlas en superficiales, cutáneas, subcutáneas, profundas o sistémicas (Ameen, 2010).

#### **1.3.1. Micosis superficiales**

Son micosis adquiridas por contacto directo y cuya afección se limita a la capa córnea de la piel y la porción suprafolicular del pelo. Se caracterizan por afectar tejidos inertes y por no generar una respuesta inmunitaria en el hospedero. La pitiriasis versicolor producida por levaduras del género *Malassezia* es la micosis superficial más frecuente (Ameen, 2010).

#### **1.3.2. Micosis cutáneas**

Las infecciones cutáneas en el ser humano incluyen una amplia variedad de procesos en los que pueden verse afectados la piel y sus anejos como pelos y uñas. Estas micosis pueden provocar una respuesta inmune en el hospedero produciendo a su vez síntomas detectables (Murray & Dawner, 2002). El término dermatomicosis se refiere a cualquier proceso micótico de la piel, mientras que dermatofitosis se refiere al causado exclusivamente por hongos dermatofitos tales como *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum* spp. o *Trichosporon* spp. (de Hoog *et al.*, 2000).



### 1.3.3. Micosis subcutáneas

Son infecciones del tejido subcutáneo asociado generalmente a la dermis y a la epidermis, causadas por hongos saprobios cuyo hábitat es el suelo y las plantas. La puerta de entrada suele ser la inoculación traumática por material contaminado como astillas, espinas u otros objetos punzantes; por lo que también se denominan micosis de implantación. La infección evoluciona a medida que el agente etiológico se adapta al entorno adverso del tejido del hospedero. Estas infecciones rara vez se difunden o se vuelven sistémicas. Las micosis subcutáneas más comunes son esporotricosis, cromoblastomicosis y micetomas; los cuales pueden ser causados por unas 20 especies fúngicas diferentes (Pang *et al.*, 2004; La Hoz *et al.*, 2012; Bhat *et al.*, 2015).

### 1.3.4. Micosis profundas

Son aquellas micosis que invaden un órgano o tejido interno ocasionando una infección localizada capaz o no de diseminarse por vía linfática y/o hemática. Dentro de las micosis profundas cabe destacar por su frecuencia y gravedad la blastomicosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y la criptococosis. Las cuatro primeras están producidas por diversas especies de hongos dimórficos, que se caracterizan como hemos indicado, por presentar un crecimiento filamnetoso en su estado saprobio y una forma levaduriforme, más o menos esférica al parasitar al ser humano. Las especies más importantes que se incluyen en este último grupo son: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Son especies con una distribución restringida a zonas geográficas muy concretas y todas ellas se adquieren principalmente por inhalación de los propágulos que el hongo produce en su hábitat natural. Una vez inhaladas, inducen cuadros clínicos

diversos, según el estado inmunológico del hospedero, que oscilan de cuadros asintomáticos inespecíficos a procesos pulmonares granulomatosos que en el hospedero inmunocomprometido suelen producir infecciones generalizadas (Rubio *et al.*, 2007).

### **1.3.5. Micosis sistémicas**

Este término se reserva para aquellas micosis invasoras, que afecten a dos o más órganos no adyacentes. En su etiología están implicadas especies ubicuas de distribución mundial, de origen ambiental o asociado a la microbiota. Estas infecciones, son habitualmente controladas por los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, pero cuando hay una alteración de la respuesta inmunológica del hospedero, puede desarrollarse el cuadro clínico que, dadas las características suele ser muy grave (Fortún *et al.*, 2011; Arenas *et al.*, 2012). El agente etiológico de este tipo de infecciones puede ser cualquier especie fúngica capaz de crecer a 37 °C y cuyos requerimientos nutricionales puedan ser satisfechos por los tejidos del hospedero. Pueden producir infecciones sistémicas un gran número de especies fúngicas, representadas por ascomicetos, basidiomicetos o mucorales (Graybill, 1983; Fortún, 2011; Arendrup *et al.*, 2014).

### **1.3.6. Micosis producidas por hongos oportunistas**

Las micosis generadas por hongos oportunistas son producidas por microorganismos tradicionalmente considerados “no patógenos” o “poco virulentos” y que, tras el contacto con el hospedero, son eliminados por el sistema inmune. Cuando existe alguna alteración de la repuesta inmune del hospedero y/o un desequilibrio en la

microbiota, puede desarrollarse un cuadro clínico de curso grave. El incremento de pacientes con enfermedades malignas hematológicas, cánceres de órganos sólidos, trasplantes de progenitores hematopoyéticos, inmunodeficiencias primarias y secundarias, regímenes de quimioterapia, el uso prolongado de corticoides y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) suelen representarse como factores de riesgo importantes para la adquisición de este tipo de micosis (Muñoz *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2012).

Si bien, las micosis oportunistas son causadas con mayor frecuencia por hongos tradicionales como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*, en los últimos años han adquirido importancia otras especies de hongos considerados como raros o poco frecuentes entre ellos *Saprochaete capitata*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Saccharomyces cereviceae* (Pagano *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Arendrup *et al.*, 2014) que constituyen el objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

#### **1.3.6.1. *Saprochaete capitata***

*Saprochaete capitata*, también llamado *Geotrichum capitatum* o *Blastoschizomyces capitatus* es un hongo levaduriforme, que forma parte de la microbiota normal de la piel humana habiendo sido aislado a partir de esputos y tracto digestivo humano, así como desde sustratos ambientales tales como la madera y el suelo (Miceli *et al.*, 2011; Gadea *et al.* 2004).

En pacientes hematológicos con neutropenia severa, a *S. capitata* se le ha atribuido responsabilidad del desarrollo de fungemia a menudo letal (Christakis *et al.*,

2005; Birrenbach *et al.*, 2012; Parahym *et al.*, 2015; Ulu-Kilic *et al.*, 2015). A dicha categoría pertenecen hasta el 92% de los casos notificados, habiéndose registrado un 75% de ellos en Italia, España y Francia (Girmenia *et al.*, 2005). La mortalidad asociada con la infección diseminada se estima en un 57% de la población hematológica (Martino *et al.*, 2004; Girmenia *et al.*, 2005; Trabelsi *et al.*, 2015). Fuera del contexto hematológico, este hongo también ha sido responsable de endocarditis protésica de la válvula mitral, neumonía, fungemia y meningitis (deMaio *et al.*, 2000; Wills *et al.*, 2004; Shuermans *et al.*, 2011; Mazzocato *et al.*, 2015). Los catéteres venosos centrales han sido reconocidos como un potencial portal de entrada de este microorganismo (Martino *et al.*, 2004; Pemmaraju *et al.*, 2014).

La mayoría de casos de fungemia por *S. capitata* han sido diagnosticados a partir de hemocultivo. En medio sólido, las colonias de *S. capitata* son de color blanco a crema y microscópicamente se observan hifas, pseudohifas, blastoconidios, artroconidios y/o aneloconidios. El marcador 1,3-β-D-Glucano se puede detectar *in vitro* a partir del sobrenadante de cultivo en cantidades de 88%, pero hay escasa experiencia en el diagnóstico de micosos invasoras por esta especie (Cuétara *et al.*, 2009).

Hay escasos datos clínicos para evaluar el tratamiento óptimo contra *S. capitata* en pacientes hematológicos. Sin embargo, basándose en los datos *in vitro*, cualquier formulación de anfotericina B con o sin flucitosina puede ser útil (Ikuta *et al.*, 2010). El voriconazol muestra una actividad prometedora *in vitro* (Gadea *et al.*, 2004) por lo que algunos autores lo han sugerido como terapia combinada con anfotericina B (Martino *et al.*, 2004). Hasta la fecha no existen recomendaciones para el tratamiento de las infecciones causadas por esta especie y las opciones terapéuticas son limitadas, siendo la anfotericina B el fármaco más utilizado en el ámbito clínico, seguido del itraconazol y del

voriconazol (García-Ruiz *et al.*, 2013; Arendrup *et al.*, 2014; Mazzocato *et al.*, 2015). A pesar de los tratamientos utilizados la mortalidad de los pacientes infectados por dicha levadura sigue siendo elevada (Cantón *et al.*, 2002; Girmenia *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2009; Villa.López *et al.*, 2013). Cabe señalar también, que la retirada temprana del catéter constituye una medida complementaria importante para mejorar la eficacia de las terapias antifúngicas (Gadea *et al.*, 2004).

### **1.3.6.2. *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii***

El género *Cryptococcus* comprende alrededor de 70 especies, que incluyen levaduras capsuladas pertenecientes al grupo de los basidiomycetes (Arendrup *et al.*, 2014). Las especies *C. neoformans* y *C. gattii* son las que se encuentran asociados con mayor frecuencia a infecciones en humanos (Singh *et al.*, 2008; Perfect *et al.*, 2010). Sin embargo, en los últimos años otras especies como *C. albidus* y *C. laurentii* se han aislado desde diversos tipos de muestras clínicas como sangre, líquido cefalorraquídeo y piel (McCurdy *et al.*, 2003; Rimek *et al.*, 2004; Tintelnot & Losert., 2005; Burnik *et al.*, 2007; Klawcharoenporn *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2012) y ambientales como aire, suelo, agua, alimentos y excrementos de palomas (Klawcharoenporn *et al.*, 2007). En conjunto estas dos especies causan el 80% de las infecciones cryptococósicas no-*neoformans* y no-*gattii* asociadas al torrente sanguíneo, sistema nervioso central y pulmón. Los casos de infecciones diseminadas por *C. albidus* y *C. laurentii* se han asociado a enfermedades subyacentes y cuyos factores de riesgo predominantes incluyen la enfermedad hematológica maligna, enfermedades asociadas a SIDA, tumores sólidos, dispositivos médicos invasivos y terapia inmunosupresora (Kuklinska *et al.*, 2009; Kulkarni *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Conti *et al.*, 2015). La mortalidad es mayor en

el caso de las infecciones por *C. albidus*, especialmente en pacientes con edad avanzada o con diagnóstico de meningitis (McCurdy *et al.*, 2003; Klawcharoenporn *et al.*, 2007).

En el laboratorio, las levaduras del género *Cryptococcus* spp. presentan mayoritariamente cápsula y con un tamaño entre 3 a 8 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). En medio de cultivo sólido se forman colonias mucoides y cremosas que se oscurecen con el tiempo. Son levaduras no fermentadoras caracterizadas por la producción de ureasa y la asimilación de azúcares. La identificación de las especies se realiza mediante la secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) y de los dominios D1 / D2 (Rimek *et al.*, 2004; Tintelnot *et al.*, 2005; Bovers *et al.*, 2007) del DNA ribosómico. MALDI-TOF-MS es una herramienta prometedora para la identificación de levaduras no comunes, incluyendo especies de *Cryptococcus* spp. sin embargo, su rendimiento depende de la calidad de la base de datos. Esta técnica utiliza una desorción e ionización láser asistida por matriz (MALDI) a la cual se acopla un detector de iones (TOF) que se utiliza en espectrometría de masas (MS) (Firacative *et al.*, 2012; Posteraro *et al.*, 2012). A pesar de compartir varios antígenos capsulares con *C. neoformans*, la detección de antígeno criptocócico no es una prueba de diagnóstico fiable para las especies no *neoformans* / *no gattii* (McCurdy *et al.*, 2003).

Si bien las especies de *Cryptococcus* spp. son intrínsecamente resistentes a equinocandinas, las pruebas de sensibilidad *in vitro* sugieren que *C. albidus*, y *C. laurentii* son susceptibles a la anfotericina B y a la flucitosina, de forma parecida a lo que ocurre con *C. neoformans* (Bernal-Martínez *et al.*, 2010; Perfect *et al.*, 2010). Por el contrario, son menos sensibles al fluconazol y a otros azoles (García-Martos *et al.*, 2002; Serena *et al.*, 2004; Pedroso *et al.*, 2006). La resistencia a fluconazol ha sido reportada con mayor frecuencia en pacientes con exposición previa a los azoles (Khawcharoenporn

*et al.*, 2007; Teodoro *et al.*, 2013; Gosh *et al.*, 2015). Debido a la baja incidencia de infecciones por *C. albicans* y *C. laurentii*, no se han establecido protocolos para un tratamiento óptimo. La anfotericina B se utiliza como tratamiento estándar para la criptococosis, sola o en combinación con flucitosina. A pesar de la eficacia de anfotericina B con o sin flucitosina, su uso puede verse limitado debido a los efectos nefrotóxicos y hepatotóxicos asociados a éstos fármacos (Saag *et al.*, 2000; Catalán & Montejo, 2006 ; Perfect *et al.*, 2010). Por otro lado, fluconazol es usado en la terapia de mantenimiento o profilaxis (Perfect *et al.*, 2010) la cual debe ser monitoreada cuidadosamente debido al aumento de cepas resistentes (Sar *et al.*, 2004).

### **1.3.6.3. *Rhodotorula mucilaginosa***

Las especies de *Rhodotorula* son levaduras ambientales comunes, que se pueden encontrar en el suelo, en el mar y lagunas; también en zumos de frutas y leche (Wirth & Goldani., 2012). En la actualidad este género incluye 46 especies, de las cuales tres han sido descritas como ocasionales patógenos en humanos, así son *R. mucilaginosa* (antes llamada *R. rubra*), *R. glutinis* y *R. minuta* (Tuon & Costa., 2008; Biswas *et al.*, 2001). *R. mucilaginosa* se ha aislado de la piel, esputo y muestras del tracto digestivo, incluyendo las heces, formando parte de la microbiota humana normal. Esta especie representa la mayoría de las infecciones causadas por el género, seguido por *R. glutinis* (Tuon & Costa, 2008; García-Suarez *et al.*, 2011<sup>a, b</sup>).

El primer caso de infección por *Rhodotorula* se publicó en 1985 (Kiehn *et al.*, 1992), siendo el factor predisponente más común la presencia de catéter venoso central y la enfermedad hematológica subyacente (Lunardi *et al.*, 2006; Tuon *et al.*, 2007; Tuon & Costa., 2008, García-Suarez *et al.*, 2011<sup>a, b</sup>, Miceli *et al.*, 2011; Chitasonbat *et al.*, 2012;

Fores *et al.*, 2012; Wirth & Goldani., 2012). Sin embargo, casos de fungemia, peritonitis, endocarditis o meningitis también han sido asociados a *Rhodotorula* en otros grupos de pacientes vulnerables, incluidos los pacientes con SIDA, con quemaduras extensas, diálisis peritoneal continua ambulatoria, cirrosis y los sometidos a cirugía intra-abdominal (Perniola *et al.*, 2006; Baradkar., 2008; Savini *et al.*, 2008; Tuon & Costa., 2008, Unal *et al.*, 2009; Spiliopoulou *et al.*, 2012; Villar *et al.*, 2012).

Los aislamientos *Rhodotorula* son fácilmente reconocibles en el laboratorio por sus colonias mucoides de color salmón. Las células de *Rhodotorula* spp. son subglobosas, ovales o alargadas, con o sin pequeñas cápsulas y a veces pudiendo formar hifas rudimentarias. Fisiológicamente puede producir ureasa, pero no fermenta los hidratos de carbono (Villar *et al.*, 2012). Sin embargo, la identificación específica no es totalmente fiable por métodos diagnósticos de rutina y debería realizarse también mediante el análisis de secuencias del DNA ribosómico. Las especies de *Rhodotorula* son consideradas intrínsecamente resistentes al fluconazol y a las equinocandinas, pero son sensibles a la anfotericina B y a la flucitosina (Preney *et al.*, 2003; Diekema *et al.*, 2005; Gomez-Lopez *et al.*, 2005). Actualmente, anfotericina B parece ser el fármaco de elección para el tratamiento de la infección por *Rhodotorula*, aunque la toxicidad renal asociada a este fármaco limita su uso (Lunardi *et al.*, 2006; Tuon *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013.; Simon *et al.*, 2014). El papel de los triazoles en el tratamiento de estas infecciones es incierto debido a la poca experiencia y requiere de datos clínicos adicionales antes de poder recomendar su uso (Tuon & Costa., 2008; García-Suarez *et al.*, 2011<sup>a, b</sup>, Mori *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2012).



#### 1.3.6.4. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae*, es una levadura de baja patogenicidad para el ser humano (Edwards-Ingram *et al.*, 2004) que puede ser encontrada como comensal inocuo del tracto digestivo y también como colonizador de las superficies mucosas de los individuos sanos. Se han descrito casos de infección diseminada después de la administración de *S. cerevisiae* como probiótico (Basseti *et al.*, 1998; Enache-Angoulvant *et al.*, 2005; Herbrecht *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2005; deLlanos *et al.*, 2006). Es por ello, que el uso de probióticos que contengan esta especie de hongo, en pacientes debilitados, neutropénicos, recién nacidos prematuros o con con catéter venoso central es considerado como un factor de riesgo (Stefanotou *et al.*, 2011; Thygesen *et al.*, 2012).

Como características de las cepas patógenas de *S. cerevisiae* cabe destacar la capacidad de crecer a 42° C, producir proteinasas y desarrollar un crecimiento pseudohifal (Yoshida *et al.*, 1997).

La infección invasiva se diagnostica con mayor frecuencia mediante microscopía observándose células redondas u ovaladas. Como *S. cerevisiae* está filogenéticamente relacionado con *Candida glabrata*, sus características clínicas y microbiológicas pueden ser similares y en el diagnóstico se puede confundir con cierta frecuencia (Yoshida *et al.*, 1997).

La evidencia clínica, aunque limitada, sugiere que el tratamiento con anfotericina B con o sin flucitosina, son de utilidad en casos severos o recurrentes, pero el uso de esta combinación requiere de mayor experiencia clínica, al igual que el uso de equinocandinas como alternativa terapéutica (Hamound *et al.*, 2011; Popiel *et al.*, 2015).

#### 1.4. Compuestos antifúngicos

El término antifúngico o antimicótico define a los compuestos obtenidos de forma natural, biosintética o química que pueden producir modificaciones en estructuras de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo o alterando su viabilidad (Odds *et al.*, 2003). 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 que existen; así como la mayor posibilidad de aparición de efectos secundarios y/o tóxicos (Graybill *et al.*, 2003; Revankar & Graybill, 2003). Los antifúngicos se pueden clasificar basándose en su estructura química, su origen (natural o de síntesis química), su espectro (amplio o restringido), y su mecanismo de acción (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999). Antes de la aparición de los antifúngicos azoles, las opciones para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas eran muy limitadas. La griseofulvina fue el primer antifúngico disponible, pero su espectro de actividad es muy limitado y sólo tiene aplicación en las micosis por dermatofitos. Hasta finales del siglo XX, no existían muchas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas. La anfotericina B desoxicolato, la fluorocitosina y algunos azoles como el miconazol y el ketoconazol fueron empleados durante mucho tiempo para el tratamiento de las micosis sistémicas, mostrando una eficacia reducida ya que su toxicidad limitaba la cantidad de fármaco que podía administrarse al paciente. Por ello, en las últimas dos décadas se han desarrollado nuevos fármacos y nuevas formulaciones de antifúngicos, más eficaces y de menor toxicidad, que han permitido mejorar el pronóstico de los pacientes con micosis invasoras (Allen *et al.*, 2015).

### 1.4.1. Polienos

El mecanismo de acción de los polienos se basa en su capacidad de unirse al ergosterol, que es el principal esteroide de la membrana fúngica. Como consecuencia, se generan canales que alteran la permeabilidad de la misma, produciendo la pérdida de cationes, proteínas, glúcidos y metabolitos, con la consiguiente muerte celular. Los polienos se caracterizan por su baja biodisponibilidad digestiva, lo que impide su administración oral, además de su escasa solubilidad en agua y su elevada nefrotoxicidad (Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009). Los compuestos polienos más representativos son la nistatina y la anfotericina B (Carrillo-Muñoz., *et al* 1999).

#### 1.4.1.1. Anfotericina B

La anfotericina B se comercializó en 1957 y la unión de su actividad fungicida con el amplio espectro de acción, que incluye a la mayoría de las especies fúngicas patógenas para el ser humano, la convirtieron en la principal alternativa en el tratamiento de las micosis profundas hasta el año 1990 (Laniado-Laborín, 2009). La anfotericina B es activa frente a la mayoría de las levaduras, los mohos más comunes y los hongos dimórficos que causan infección humana incluyendo: *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus* spp. y el grupo de los mucormicetos (Walsh *et al.*, 2004; Pfaller & Diekema, 2004; Guarro, 2011). A principios de los años 90, aparecieron las formulaciones lipídicas de anfotericina B, que manteniendo su efecto y espectro de actividad presentan un efecto tóxico considerablemente menor que la de la formulación convencional (Cagnoni, 2002; Al Nakeeb *et al.*, 2015).

## 1.4.2. Antifúngicos azólicos

Los azoles son moléculas sintéticas con un anillo de cinco carbonos unido a una cadena alifática con un grupo fenilo. Existen dos familias de azoles, que se distinguen por las moléculas de nitrógeno que contiene el anillo azólico, dos en caso de los imidazoles y tres en el de los triazoles. 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, que como ya hemos dicho es el principal esteroide presente en la membrana de la célula fúngica (Ananda-Rajah *et al.*, 2012). El sistema enzimático del citocromo P450 está presente en un gran número de seres vivos y su función es la síntesis del ergosterol o del colesterol en el caso de los mamíferos. La falta de ergosterol provoca una alteración en la permeabilidad de la membrana celular, que resulta en la muerte celular (Maertens, 2004; Allen *et al.*, 2015). Los azoles están indicados en el tratamiento de las micosis tanto superficiales como sistémicas siendo los principales representantes el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol, el posaconazol y el isavuconazol, como el más reciente (Allen *et al.*, 2015).

### 1.4.2.1. Imidazoles

Los primeros imidazoles (clotrimazol y miconazol) se comercializaron en 1969 como alternativas tópicas de la griseovulvina y la nistatina para las infecciones cutáneas y mucocutáneas por dermatofitos y *Candida* spp (Cuenca-Estrella, 2010).

#### 1.4.2.2. Triazoles

La década de 1990 marcó un gran avance en el tratamiento de las infecciones fúngicas con la introducción de los triazoles.

El fluconazol fue el primer antifúngico sistémico con una toxicidad reducida y con un excelente perfil farmacocinético, lo que supuso un cambio trascendental en el arsenal terapéutico antifúngico al disponer de una nueva alternativa con formulaciones oral e intravenosa, que suelen ser muy bien toleradas por los pacientes. Su espectro de actividad incluye *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* y los hongos dimórficos (Cuenca-Estrella, 2010). La absorción oral de fluconazol es casi del 100% y no se ve afectada por los alimentos o el pH gástrico. Debido a su alta penetración en el sistema nervioso central y la capacidad de concentración en la orina, el fluconazol se convirtió en un pilar de la terapia para la meningitis criptocócica e infecciones del tracto urinario causadas por *Candida* spp sensibles (Pappas *et al.*, 2009).

El itraconazol fue aprobado por la FDA en 1992 representando una considerable ampliación del espectro *in vitro* de la actividad antifúngica, incluyendo también a hongos como *Aspergillus* spp. No obstante, su amplio espectro de actividad se ve desfavorecido por sus perfiles farmacocinéticos y de seguridad. De forma parecida a lo que ocurre con el ketoconazol, la absorción de itraconazol se ve influida negativamente por la presencia de alimentos consumidos y por el pH gástrico (Allen *et al.*, 2015) por lo que, la solución oral de itraconazol se absorbe mejor con el estómago vacío (Cuenca-Estrella, 2010). Por otra parte, debido a sus efectos inotrópicos negativos sobre el corazón, el itraconazol está contraindicado en pacientes con disfunción ventricular como por ejemplo una insuficiencia cardíaca congestiva (Allen *et al.*, 2015).

El voriconazol fue aprobado en el año 2002. Estructuralmente es similar al fluconazol con la excepción de la presencia de un grupo fluoropirimidina en lugar de un resto triazol (deSarro *et al.*, 2008). El espectro *in vitro* de su actividad incluye la mayoría de las *Candida* spp. (incluyendo *C. glabrata* y *C. krusei*), *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cryptococcus* spp. y hongos dimórficos (Pastor & Guarro, 2007). Se encuentra disponible tanto en formulación oral como intravenosa. La formulación oral de voriconazol presenta una excelente biodisponibilidad cuando se administra con el estómago vacío (Pastor & Guarro, 2007). Una de las aplicaciones más interesantes del voriconazol la constituye la profilaxis de las enfermedades fúngicas invasivas en receptores de trasplante de células madre alogénicas debido especialmente a su excelente actividad frente a *Aspergillus* y *Candida* (Díaz *et al.*, 2005).

El posaconazol fue aprobado en el 2006 presentando un espectro de actividad antifúngica similar al del voriconazol, y además con una cierta actividad frente a hongos mucorales (Nagappan & Dresinski, 2007). De forma parecida como ocurre con otros azoles, la absorción óptima de la formulación oral de posaconazol se ve afectada negativamente por la presencia tanto de comida, como por el pH gástrico. Por lo que, la suspensión de posaconazol debe administrarse junto con una comida rica en grasas, un suplemento nutricional o una bebida carbonatada ácida para mejorar su absorción (Ananda-Rajah *et al.*, 2012). También está indicado como terapia profiláctica en pacientes con trasplante de células madre alogénicas y pacientes neutropénicos con leucemia aguda o síndrome mielodisplásico (Chae *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2015; Soysal, 2015).

### 1.4.3. Equinocandinas

Las equinocandinas pertenecen al grupo de los antifúngicos lipopeptídicos, formados por un núcleo peptídico cíclico unido a un grupo hidrofóbico por un nitrógeno aminoterminal y una cadena lateral. Las equinocandinas son inhibidores no competitivos de la 1,3- $\beta$ -D-Glucano sintetasa, un complejo enzimático que forma polímeros de glucano en la pared celular del hongo. Su acción sobre esta diana inhibe la síntesis de la pared celular con un efecto fungicida consistente en la pérdida de la resistencia mecánica en la pared, lo que hace que se produzcan cambios osmóticos que llevan a la destrucción celular (Ferrer *et al.*, 2013).

Esta familia de antifúngicos se comenzó a desarrollar en 1974, pero no fue hasta el 2001 que se aprobó para uso humano la primera equinocandina: la caspofungina. Actualmente se dispone de tres equinocandinas con indicaciones clínicas: la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina. 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 jirovecii* y hongos dimórficos (de Wet *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2004). En cambio presentan una actividad limitada frente a determinados hongos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis*, y son inactivos frente a *Fusarium* spp., *Cryptococcus* spp. y hongos mucorales ya que estos últimos tienen un menor contenido de 1,3- $\beta$ -D-glucano en su pared celular (Cortés y Russi, 2011).

### 1.4.4. Pirimidinas

En el año 1964 apareció la flucitosina o fluorocitosina (5-FC), único antifúngico de uso clínico perteneciente a la clase de las pirimidinas. Es un fármaco fungistático que penetra en el interior de la célula fúngica tras contactar con una enzima de membrana

llamada citosina permeasa. En el interior de la célula, la fluorocitosina es desaminada a 5-fluoruracilo, produciendo varias modificaciones que acaban por generar ácido 5-fluoruradílico, el cual se incorpora en la cadena de ARN, ocasionando la producción de ARN aberrante con la consecuente inhibición celular (Gavalda & Ruiz, 2003). Su espectro de acción se reduce a las levaduras ya que no tiene actividad frente a hongos filamentosos. Existen determinadas cepas de *Candida* spp. y de *Cryptococcus* spp. que muestran resistencia primaria a la flucitosina. Asimismo, cuando se utiliza en monoterapia, genera resistencia secundaria con facilidad. Por ello, en la actualidad sólo se recomienda su utilización en algunas terapias combinadas; como por ejemplo, la combinación de anfotericina B y fluorocitosina en el tratamiento de la criptococosis en enfermos con SIDA (Perfect *et al.*, 2010).

#### **1.4.5. Otros compuestos antifúngicos**

La griseofulvina interrumpe el huso mitótico e interfiere con los microtúbulos deteniendo el crecimiento de la célula en la fase de mitosis. Es activa frente a dermatofitos, siendo indicada en las tiñas de cuero cabelludo, cuerpo y uñas. Sin embargo, en comparación con otros antifúngicos, que también se usan frente a los dermatofitos, tales como el itraconazol y la terbinafina, es menos eficaz, además de presentar una mayor toxicidad y más efectos secundarios (Fortún, 2011). Las alilaminas presentan un efecto antifúngico debido 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 (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999).

### **1.5. Combinación antifúngica**

El desarrollo del tratamiento antifúngico sistémico en la década de 1950, representó un gran avance en lo que, en muchos casos constituía una enfermedad intratable. Sin embargo, a pesar de la introducción de nuevas terapias en los años siguientes, la tasa de cura de las enfermedades fúngicas invasivas sigue siendo baja. Por ello, se ha contemplado el uso de combinaciones de fármacos antifúngicos que en algunos casos pueden ser más eficaces que el uso de las monoterapias (Clemons & Stevens, 2006). Hay una serie de escenarios en los que la terapia combinada antifúngica puede ser beneficiosa ya que permiten (1) aumentar la actividad antifúngica de uno o más agentes antifúngicos; (2) ampliar el espectro de actividad antifúngica para tratar más patógenos o patógenos potencialmente resistentes; (3) reducir la aparición de agentes patógenos resistentes; (4) minimizar potencialmente la toxicidad asociada a los antifúngicos utilizando dosificaciones más reducidas en las combinaciones y (5) permitir que los agentes antifúngicos lleguen a varios sitios del cuerpo (Enoch *et al.*, 2006; Dodds & Johnson, 2011). En el uso de las combinaciones, los fármacos antifúngicos pueden ejercer un efecto sinérgico, definido como el aumento de la actividad en la combinación, más allá de lo esperado cuando se utiliza uno por sí solo. Aunque también puede existir indiferencia cuando el efecto de la combinación es igual al de cada compuesto por si solo; y antagonismo que se produce cuando la combinación tiene un efecto menor al producido por cada fármaco por si solo (Johnson *et al.*, 2004; Dodds & Johnson, 2011).

Todos los triazoles han sido evaluados como terapia de combinación con otros agentes antifúngicos tales como la anfotericina B, o las equinocandinas. El triazol más utilizado en combinación ha sido el fluconazol; por ejemplo al utilizarlo en combinación con la anfotericina B para el tratamiento de inducción de la meningitis criptocócica en individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes. Dado el éxito del fluconazol, se ha dedicado especial interés al ensayo de otras combinaciones, especialmente la terapia combinada de voriconazol con una equinocandina (Enoch *et al.*, 2006; Ruiz Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Jhonson & Perfect, 2010; Pagano *et al.*, 2013; Marr *et al.*, 2015).

#### **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 (Pfaller *et al.*, 2004; Shadomy & Shadomy, 1991; Alastruey-Izquierdo, 2015). Actualmente dos instituciones, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) han desarrollado métodos estandarizados para evaluar la sensibilidad antifúngica de levaduras como *Candida*, *Cryptococcus* y hongos filamentosos utilizando básicamente métodos de microdilución en caldo (CLSI, 2008<sup>a</sup>; Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2011<sup>a</sup>). La técnica más utilizada para el estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos es la dilución en medio líquido mediante la utilización de un micrométodo (Espinel-Ingroff, 1994; Pujol *et al.*, 1997; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015). Si bien, ambos métodos poseen diferencias, diversos estudios han demostrado una correlación en los resultados de concentración mínima inhibitoria obtenidos con ambas técnicas de microdilución, aunque con ligeras variaciones en el caso

de las equinocandinas frente a a *Candida* spp. (Pfaller *et al.*, 20004; Pfaller *et al.*, 2011<sup>a</sup>) y azoles frente *Aspergillus* spp. (Pfaller *et al.*, 2011<sup>b</sup>). Ambos métodos han demostrado proveer resultados clínicamente útiles y ser capaces de discriminar entre cepas sensibles y resistentes (Johnson, 2008; Lass-Flörl *et al.*, 2010; Pfaller, 2012).

A su vez el CLSI ha estandarizado métodos simples y económicos de difusión en agar tanto para levaduras (CLSI, 2008<sup>b</sup>) como para hongos filamentosos (CLSI, 2009). Estos métodos permiten obtener las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de un fármaco. Paralelo a esto, se han desarrollado diversos métodos comerciales para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos que permiten simplificar los ensayos y aportan rapidez en la obtención de resultados (Johnson, 2008; Lass-Flörl *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2012). Entre estos métodos destacan Sensititre Yeast One ®, Vitek ® y Etest® debido a su amplio uso en el ambiente hospitalario. Los ensayos *in vitro* han confirmado ser útiles para orientar la elección del fármaco y la vigilancia de la aparición de resistencias, constituyendo una gran ayuda para la optimización de la eficacia de la terapia antifúngica (Johnson, 2008; Lass-Flörl *et al.*, 2010; Pfaller, 2012). Una de las mayores utilidades de dichos métodos ha sido el permitir el establecimiento de puntos de corte clínicos, basados en el análisis de la distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias y su relación con la eficacia en clínica humana. No obstante, debido a la baja incidencia de infecciones fúngicas oportunistas y la escasez de datos *in vitro* disponibles para muchas especies de hongos oportunistas no ha sido posible determinar puntos de corte clínicos con precisión para todas las especies fúngicas que pueden infectar al hombre (Revankar & Graybill, 2003).

## **1.7. Determinación experimental de la eficacia antifúngica**

Las pruebas realizadas con animales de experimentación son cruciales para el desarrollo de nuevos fármacos o el ensayo de nuevas estrategias terapéuticas. En la fase preclínica o de desarrollo de un fármaco, los estudios *in vitro* son útiles para determinar su eficacia en la inhibición del crecimiento de un microorganismo, a la vez estos estudios permiten determinar el potencial valor terapéutico del antifúngico (Hinrichsen & Di Masso, 2010).

### **1.7.1. Estudios de patogenicia**

Los estudios de patogenicia, nos permiten entender los mecanismos relacionados con un proceso infeccioso, la interacción hospedero-patógeno o la potencial resolución de la infección. En base a estos conocimientos, podemos evaluar la eficacia de una terapia en modelos animales, mediante la prolongación de la supervivencia, la reducción de la carga fúngica detectable en diferentes órganos, o estudios histopatológicos. Paralelo a esto se pueden cuantificar antígenos como el galactomanano y  $\beta$ -glucanos. A su vez, los modelos animales también se utilizan para establecer las propiedades farmacocinéticas del compuesto (Capilla *et al.*, 2007; Graybill, 2010; Hinrichsen & Di Masso, 2010; Guarro, 2011).

### **1.7.2. El ratón *Mus musculus***

El ratón *Mus musculus* es la especie de elección en micología médica debido a su similitud con la fisiología humana por su corto intervalo generacional, fácil

mantenimiento y el alto potencial biótico. Así como, la elevada disponibilidad y el bajo coste; características que en conjunto convierten a estos modelos en una opción para el trabajo experimental.

Tanto ratones como seres humanos tienen características funcionales y anatómicas similares en los distintos órganos y sistemas. Esto ha permitido reproducir y cuantificar las diferentes fases que se producen durante una determinada infección (Graybill, 2010). 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 que los antifúngicos han superado las pruebas *in vitro*. La demostración de la eficacia depende mucho de las condiciones experimentales, influenciada por la absorción, la distribución, y la eliminación del antifúngico, la concentración y vía de administración del inóculo, el estado inmunológico del hospedero y la duración del tratamiento (Hinrichsen & Di Masso, 2010).

### **1.7.3. Cuantificación de los niveles séricos de fármaco**

Debido a la significativa variabilidad intrapacientes en las concentraciones séricas de los antifúngicos, se recomienda el monitoreo de los niveles séricos alcanzados durante el tratamiento para asegurar concentraciones efectivas. El método más común utilizado para medir las concentraciones en suero de estos agentes es la cromatografía líquida de alta potencia (HPLC), pero los bioensayos y la espectrometría de masas también puede ser utilizada; mostrando una elevada correlación entre métodos (Cendejas *et al.*, 2012; Drew *et al.*, 2013; Ashbee *et al.*, 2014). A pesar de la falta de grandes estudios clínicos

controlados, la acumulación de pruebas sugiere que la monitorización terapéutica de drogas aumenta la probabilidad de resultados exitosos y previene toxicidades relacionadas con las drogas en los pacientes tratados con estos agentes (Ashbee *et al.*, 2014; Tononi *et al.*, 2015).

### **1.8. 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 inhibitoria mínima de un determinado antifúngico puede predecir con mayor exactitud un posible fracaso terapéutico. La falta de un establecimiento en los puntos de corte en base a criterios clínicos, es decir, valores de concentración inhibitoria mínima 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 resistentes a los antifúngicos convencionales y la descripción de fracasos terapéuticos relacionados con valores elevados de las concentraciones mínimas inhibitorias, han suscitado la necesidad del estudio de procedimientos estandarizados para poder detectar de forma temprana el perfil de sensibilidad de las diferentes especies fúngicas implicadas en clínica humana (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 desarrollado y aprobado 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 concentraciones mínimas inhibitorias 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 concentraciones mínimas inhibitorias dentro de un conjunto de aislados de cada una de las especies, para definir posteriormente que cepas pertenecían a la población salvaje (Cantón *et al.*, 2007). Esta última está constituida por 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 que 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 concentraciones mínimas inhibitorias de un antifúngico en particular frente a una determinada especie fúngica, la moda de esta distribución y la variabilidad y reproducibilidad inherente de las concentraciones mínimas inhibitorias (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2009; Espinel-Ingroff *et al.*, 2010). De esta manera se pretende detectar los hongos que albergan mecanismos de resistencia hacia un antifúngico en particular. Los puntos de corte epidemiológicos son ayuda en la identificación de aislados con sensibilidad *in vitro* disminuida, y sirven como marcadores de los cambios en los patrones de sensibilidad de los hongos (Pfaller *et al.*, 2009). A su vez, estos puntos de corte epidemiológicos pueden utilizarse para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad, en casos en los que no hay suficiente información para establecer puntos de corte clínicos. Los puntos de corte disponibles hoy en día se caracterizan por ser específicos para cada especie, por estar basados en un conjunto de datos epidemiológicos, farmacodinámicos y clínicos, y por ser revisados periódicamente, según se va disponiendo de nuevos datos procedentes de estudios de

epidemiología molecular y del análisis de su correlación clínica (Cuenca-Estrella *et al.*, 2013).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

---

## INTERÉS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

## 2. Interés y objetivos del estudio

En las últimas décadas se ha producido un incremento importante en la incidencia de las micosis invasoras producidas por hongos oportunistas que, a pesar del tratamiento quirúrgico y de la terapia antifúngica utilizada, continúan causando una elevada morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Aunque gran parte de estas infecciones están causadas por las especies *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, se ha observado un aumento importante en la incidencia de otras especies de hongos considerados oportunistas. Las terapias usadas actualmente para el tratamiento de estas infecciones fúngicas han demostrado no ser las óptimas, ya que muchos casos no pueden resolverse, constituyendo una necesidad de primer orden el investigar nuevas estrategias para su tratamiento. Por ello, el objetivo principal de esta tesis ha sido contribuir al desarrollo experimental de alternativas terapéuticas frente a levaduras oportunistas capaces de causar infecciones sistémicas.

### 2.1. *Saprochaete capitata*

*Saprochaete capitata* es un hongo que se ha reportado como causa de fungemia fatal en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en aquellos con neoplasias hematológicas (Christakis *et al.*, 2005; Birrenbach *et al.*, 2012; Parahym *et al.*, 2015; Ulu-Kilic *et al.*, 2015). Hasta la fecha no existen recomendaciones para el tratamiento de las infecciones causadas por esta especie y las opciones terapéuticas son limitadas. El posaconazol no ha sido evaluado frente a las infecciones por *S. capitata*, pero ha demostrado ser eficaz contra una amplia gama de hongos oportunistas en otras infecciones experimentales (Salas *et al.*, 2011; Calvo *et al.*, 2012; Treviño *et al.*, 2014). Por lo que los objetivos de este estudio fueron:

- Determinar la actividad *in vitro* de posaconazol frente a 06 cepas de interés clínico de *S. capitata*.
- Desarrollar las curvas de mortalidad de posaconazol frente a cepas de *S. capitata*.
- Evaluar la eficacia del tratamiento con diferentes dosis de posaconazol a en un modelo de infección diseminada por *S. capitata* en el ratón inmunosuprimido.
- Determinar y cuantificar los niveles séricos de posaconazol y de 1,3-β-D glucano a partir de suero de ratones infectados al finalizar la terapia con posaconazol.

## **2.2. *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii***

La criptococosis es una micosis sistémica, que representa la tercera enfermedad más prevalente en personas positivas al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), siendo *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* los agentes más frecuentemente aislados (Gosh *et al.*, 2015). Sin embargo, otras especies del género como *C. laurentii* y *C. albidus*, han sido descritas como causa de infecciones invasivas en humanos y en conjunto son responsables del 80% de las infecciones no-*neoformans*/no-*gattii* (Gulló *et al.*, 2013).

En la actualidad, no existe la suficiente información para el tratamiento de las infecciones causadas por *C. albidus* y *C. laurentii*, por lo que los objetivos de este estudio fueron:

- Determinar la actividad *in vitro* de la anfotericina B, del fluconazol y del voriconazol frente a cepas de *C. albidus* y *C. laurentii*.
- Determinar la actividad *in vitro* de la anfotericina B asociada al voriconazol frente a cepas de *C. albidus* y *C. laurentii*.
- Determinar la virulencia de *C. albidus* y *C. laurentii* en un modelo de infección en el ratón inmunocomprometido.
- Desarrollar un modelo experimental de infección diseminada en el ratón inmunocomprometido que permita evaluar la eficacia de las tres monoterapias y de la combinación de anfotericina B con voriconazol.

### **2.3. *Rhodotorula mucilaginosa***

La levadura *R. mucilaginosa*, afecta principalmente a pacientes con presencia de catéter venoso central e inmunosuprimidos. Tanto el voriconazol como el posaconazol son fármacos de uso común en el tratamiento antifúngico y han demostrado ser eficaces contra otras levaduras pertenecientes al grupo de los basidiomycetos (Mavrogiorgos *et al.*, 2006; deAlmeida *et al.*, 2008; Calvo *et al.*, 2010). Por tales motivos nuestros objetivos fueron:

- Determinar la actividad *in vitro* de los siguientes antifúngicos: anfotericina B, itraconazol, fluconazol, posaconazol, voriconazol, anidulafungina, micafungina, caspofungina y 5-fluorocitosita frente a cepas de *R. mucilaginosa*.

- Desarrollar las curvas de mortalidad de anfotericina B, voriconazol y posaconazol frente a cepas de *R. mucilaginosa*.
  
- Determinar la virulencia de *R. mucilaginosa* en un modelo de infección en el ratón inmunosuprimido.
  
- Evaluar la eficacia de la anfotericina B, del voriconazol y del posaconazol en el tratamiento de la infección diseminada por *R. mucilaginosa* en el ratón inmunosuprimido.

#### **2.4. *Saccharomyces cerevisiae***

Las as infecciones por *S. cerevisiae*, son relativamente frecuentes en el entorno de las enfermedades subyacentes crónicas como la enfermedad maligna, el VIH / SIDA y en pacientes transplantados de médula ósea. Los casos de fungemia e infección diseminada ocurren con mayor frecuencia en pacientes después del tratamiento con el probiótico compuesto por esta misma especie (Herbrecht *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2005; Stefanotou *et al.*, 2011).

La limitada evidencia clínica, sugiere que el tratamiento con anfotericina B con o sin flucitosina, son de utilidad en casos severos o recurrentes, pero el uso de esta combinación requiere de mayor experiencia clínica, al igual que el uso de equinocandinas como alternativa terapéutica (Hamound *et al.*, 2011; Popiel *et al.*, 2015). Por ello, nuestros objetivos fueron:

- Determinar la actividad *in vitro* de los siguientes antifúngicos: anfotericina B, itraconazol, fluconazol, posaconazol, voriconazol, anidulafungina, micafungina, caspofungina y 5-fluorocitosina frente a cepas de *S. cerevisiae*.
  
- Desarrollar las curvas de mortalidad para anfotericina B, voriconazol y anidulafungina frente a *S. cerevisiae*.
  
- Determinar la virulencia de *S. cerevisiae* en un modelo de infección en ratón inmunocomprometido.
  
- Evaluar la eficacia de la anfotericina B liposomal, voriconazol y anidulafungina en el tratamiento de la infección diseminada causada por *S. cerevisiae* en el ratón inmunosuprimido.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Origen y conservación de las cepas**

Los aislados correspondientes a *Saprochaetecapitata*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Saccharomyces cerevisiae*; incluidos en la presente Tesis Doctoral fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA; del Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute (IHEM), Bruselas, Bélgica y de la colección de la Facultad de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili (FMR), Reus, España.

Las cepas fueron conservadas a temperatura ambiente en tubos de agar inclinado cubierto de vaselina líquida, en tacos de agar de 5 mm<sup>2</sup> sumergidos en agua destilada estéril y/o liofilizadas. Para la obtención de los inóculos, las cepas se subcultivaron en placas de agar patata dextrosa (APD) (Pronadisa, Madrid, España) e incubadas a su temperatura óptima (entre 30 y 35°C) hasta su completo desarrollo (24-72 horas según la especie).

##### **3.1.1. Identificación de las cepas**

Todas las cepas fueron confirmadas macroscópicamente y microscópicamente a partir de cultivos puros. Para evaluar la morfología macroscópica se observaron características como textura, bordes, superficie y color. En la morfología microscópica en cambio, se observaron características como presencia o no de, hifas, pseudohifas, blastoconidios, artroconidios y aneloconidios a partir de un montaje directo de la colonia con azul de lactofenol (Panreac, España) y visualizadas con ayuda de un microscopio de campo claro (Olympus CH2). Los aislados de *Saprochaetecapitata*, además fueron visualizados con

ayuda de un microscopio electrónico (Jeol JSM-6400) para esto las colonias crecidas en APD fueron previamente cortadas en tacos de 5 mm<sup>2</sup> y sumergidas en glutaraldehído para su posterior deshidratación, fijación y montaje.

Los aislados de *Cryptococcus* spp. fueron sometidos a tres pruebas complementarias consistentes en la observación de la cápsula con tinta china, el crecimiento en agar urea de Christensen y la prueba de la fenoloxidasa (Canelo & Casquero, 2000; Perezet *al.*, 2003).

A aquellos aislados de *Cryptococcus* spp., *Rhodotorulas* spp. y *Saccharomyces* spp. que fueron incluidos en los estudios *in vivo* se les realizó la identificación molecular mediante secuenciación y comparación con la correspondiente cepa tipo, tal como se describe a continuación.

Inicialmente se realizó la extracción del ADN directamente de las colonias de un cultivo puro, mediante el kit PrepMan Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA., EE UU). Siguiendo las indicaciones del fabricante se suspendió una colonia en 100 µL de reactivo PrepMan Ultra para su posterior homogenización mediante agitación. Tras 10 minutos a 100 °C, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 2 minutos y posteriormente fueron centrifugadas durante 7 minutos a 13.000 r.p.m. El ADN fue colectado y conservado en tubos para su cuantificación y valoración de la pureza mediante espectrofotómetro Gene (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra).

En un segundo paso se realizó la amplificación del dominio D1/D2 y de la región ITS, mediante PCR del gen 5.8S del ARN ribosomal y sus espaciadores intergénicos (región ITS) para esto se utilizaron los cebadores ITS5/ITS4 y los cebadores NL1/NL4 para los dominios D1/D2 del gen 28S del ARN ribosomal (Tabla 1) siguiendo los protocolos descritos por Cano *et al.* (2004) y Gilgado *et al.* (2005) respectivamente. La

amplificación se realizó en un volumen final de 40  $\mu$ l que contenía de 20 a 60 ng de ADN genómico, tampón 10X PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl), 10  $\mu$ l de cada cebador, 50  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ l de dNTPs de cada nucleótido (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), y 5  $\mu$ l ADN ampli Taq polimerasa (Roche, Estados Unidos). El programa de amplificación consistió en una pre-desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación (a 53 °C y 51 °C durante 1 min respectivamente) y extensión a 72 °C durante 1 min, con una extensión final a 72 °C por 7 min.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (agarose MP; Boehringer-Mannheim, Alemania). Para verificar el tamaño de los amplificadores se añadió, en el primer y último pocillo de cada gel, un marcador de peso molecular, 100 pbLadder (Invitrogen, Groningen, Países Bajos). La secuenciación fue realizada por MacroGen Europe Inc., (Amsterdam, Países Bajos) con el analizador 3730XL DNA (Applied Biosystems).

Finalmente, para la obtención de las secuencias consenso se empleó el programa SeqMan (Lasergene, Madison, WI, E.E.U.U.). Una vez obtenidas, se compararon con aquellas disponibles en la base de datos de acceso público GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando la Basic Local Alignment Search Tool (Blastn) mediante la página web (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar los porcentajes de similitud con respecto a las secuencias de las cepas tipo y/o de referencia depositadas en esa base de datos.

**Tabla 1.** Cebadores y sus secuencias utilizados en la identificación de cepas utilizadas en la presente Tesis Doctoral.

<b>Cebador</b>	<b>Locus</b>	<b>Secuencia (5'--3')</b>	<b>Referencia</b>
NL1	Dominio D1/D2	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AA	O'Donnell, 1993
NL4	Dominio D1/D2	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	O'Donnell, 1993
ITS4	ITS ADNr	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS5	ITS ADNr	GGA AGT AAA AGT AAC AAG G	White <i>et al.</i> , 1990

## 3.2. Estudios *in vitro*

### 3.2.1. Cepas

En las pruebas de sensibilidad *in vitro*, se ensayaron un total de 27 cepas correspondientes a cinco especies de levaduras de importancia clínica y dos cepas control (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cepas de origen clínico utilizadas en los estudios *in vitro*

Espece	Número	Procedencia
<i>Candidaparapsilosis</i>	01	ATCC
<i>Candidaalbicans</i>	01	ATCC
<i>Saprochaetecapitata</i>	06	IHEM
<i>Saccharomycescerevisiae</i>	03	IHEM
<i>Cryptococcus albidus</i>	10	IHEM
<i>Cryptococcus laurentii</i>	02	FMR
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	04	IHEM

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA

IHEM: Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute, Bruselas, Bélgica

FMR: Facultad de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España



### **3.2.2. Evaluación de la actividad *in vitro* de compuestos antifúngicos o determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La sensibilidad antifúngica de las levaduras fue determinada mediante la técnica de microdilución en caldo siguiendo la metodología descrita en el documento M27-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Se evaluó la actividad antifúngica de concentraciones dobles seriadas de anfotericina B, fluconazol, posaconazol, voriconazol, itraconazol, anidulafungina, caspofungina, micafungina y flucitosina. Los rangos de concentraciones de los antifúngicos ensayados fueron de 0.03 a 16 µg/ml en todos los casos con excepción de fluconazol, donde se utilizó un rango de 0.06 a 32 µg/ml (Figura 3). Para todos los antifúngicos ensayados *in vitro*, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) definida como la menor concentración de antifúngico que provocaba un 100% de inhibición del crecimiento fúngico para anfotericina B y un 50 % para equinocandinas, azoles y flucitosina en comparación con el pocillo que contenía el control positivo (CLSI, 2008<sup>a</sup>). Los rangos ensayados para cada antifúngico se detallan en la tabla 3.

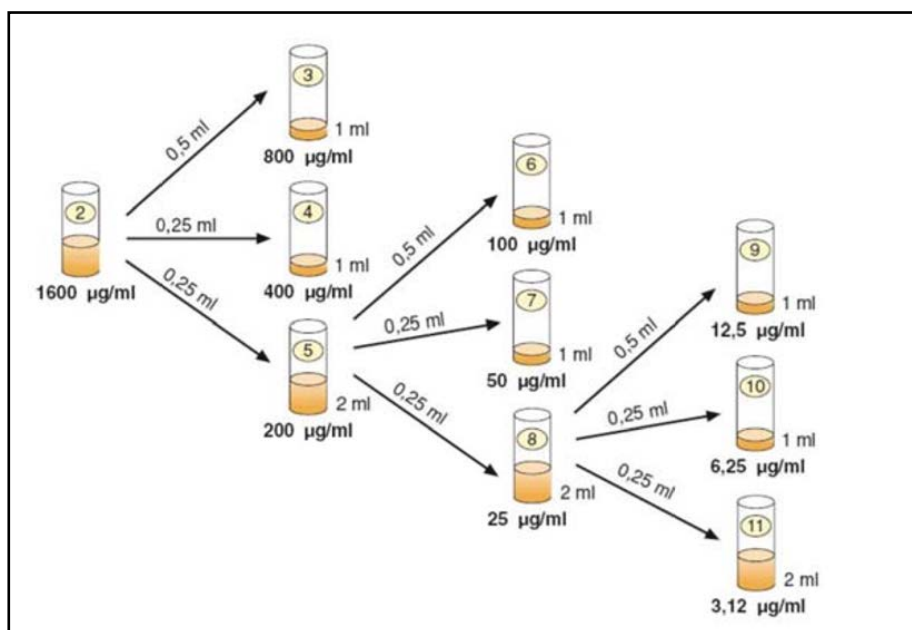
**Tabla 3.** Antifúngicos y rango utilizados en los estudios *in vitro*

<b>Antifúngico (Rango µg/ml)</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Pureza</b>	<b>Disolvente</b>
<b>Anfotericina B<sup>b</sup></b> (0.03-16)	Sigma-Aldrich Co. St Louis, EUA.	99.8%	DMSO
<b>Fluconazol<sup>a</sup></b> (0.06-32)	Pfizer Inc, Madrid, España	82.4%	Agua
<b>Itraconazol<sup>a</sup></b> (0.03-16)	Jansen Pharaceutical, Madrid, España	100%	DMSO
<b>Posaconazol<sup>a</sup></b> (0.03-16)	Schering-Plough Res. Inst., Kenilworth, EUA.	100%	DMSO
<b>Voriconazol<sup>a</sup></b> (0.03-16)	Pfizer Inc, Madrid, España	100%	DMSO
<b>Anidulafungina<sup>c</sup></b> (0.03-16)	Pfizer Inc, Madrid, España.	82.4 %	DMSO
<b>Caspofungina<sup>b</sup></b> (0.03-16)	Merk& Co., Rahway, E.E.U.U.	100%	Agua
<b>Micafungina<sup>a</sup></b> (0.03-16)	AstellasPharmaInc, Tokio, Japón	100%	Agua
<b>Flucitosina<sup>a</sup></b> (0.03-16)	Sigma-Aldrich Co. St Louis, EUA.	99%	Agua

DMSO: dimetilsulfóxido; <sup>a</sup> conservación a temperatura ambiente; <sup>b</sup> conservación a 4°C, <sup>c</sup> conservación a -20°C.

### 3.2.3 Preparación de los agentes antifúngicos

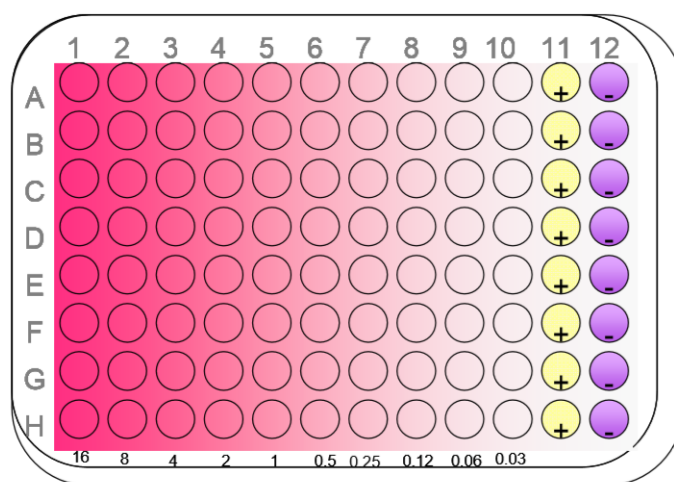
Se preparó una solución inicial de antifúngico 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar. Según la solubilidad del compuesto se empleó DMSO o agua destilada (Tabla 3). A partir de la solución madre se preparó un banco de diluciones dobles seriadas siguiendo el esquema de la figura 1.



**Figura 1.** Esquema para la realización de diluciones dobles seriadas de antifúngicos solubles en DMSO (Cantón *et al.*, 2007).

### 3.2.4. Preparación de los inóculos para los estudios *in vitro*

Los aislados a estudiar se sembraron en placas de APD y se incubaron entre 30 y 35°C durante 24-72 horas, según la especie estudiada. Los inóculos fueron preparados suspendiendo dos o tres colonias a partir del cultivo en placas con APD en 1 ml de agua destilada estéril. La suspensión fue ajustada en cámara de Neubauer a  $1 \times 10^6$ -  $5 \times 10^6$  levaduras/ml (tubo 1). La viabilidad de los inóculos se verificó sembrando 100  $\mu$ l de las diluciones 1:1000 y 1:10000 en APD. Cada pocillo de las microplacas fue inoculado con 100  $\mu$ l de la suspensión fúngica obteniendo una concentración final de  $1 \times 10^3$ -  $5 \times 10^3$  UFC/ml en cada pocillo (Figura 2). Siguiendo las recomendaciones del documento M-27-A3, en cada ensayo se incluyeron como cepas de control de calidad *Candida parapsilosis* ATCC 22019 o *Candida albicans* ATCC 90028.



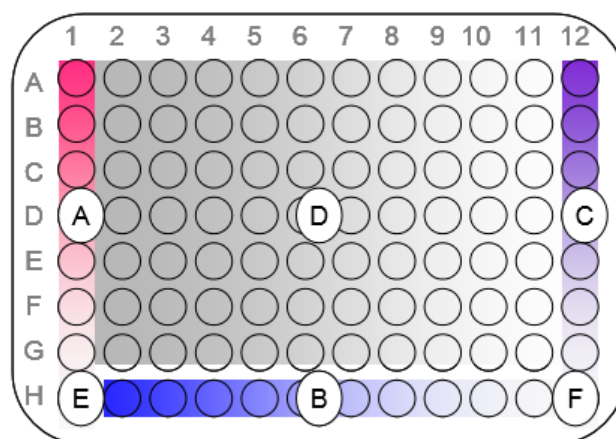
**Figura 2.** Esquema de la distribución de diluciones dobles seriadas de un antifúngico ensayado con un rango de 0.03-16  $\mu$ g/ml. Columnas 11 y 12 son usadas como control positivo y negativo, respectivamente.

### 3.2.5. Evaluación de la actividad *in vitro* de compuestos antifúngicos en combinación

Para evaluar la actividad *in vitro* de combinaciones dobles de antifúngicos, se prepararon microplacas siguiendo un esquema de tablero de ajedrez (Dannaouiet *al.*, 2004). Se ensayaron las combinaciones de anfotericina B más fluconazol y anfotericina B más voriconazol frente a las especies de *Cryptococcus* spp. Tal como se ilustra en la figura 3, las concentraciones dobles seriadas del fármaco B se dispensaron en columnas y las correspondientes al fármaco A en filas. De ésta manera, la zona central de la microplaca contenía una combinación de ambos fármacos a las diferentes concentraciones ensayadas. Para anfotericina B, se utilizaron gradientes de concentraciones de 0.03 a 16 µg/ml dispensándose 50 µl en los pocillos de las columnas 2-11 de la microplaca para todas las combinaciones. Para fluconazol se utilizaron gradientes de concentraciones de 1 a 64 µg/ml y para voriconazol de 0.06 a 4 µg/ml distribuidas en las filas de la "A" a la "G".

Para el estudio de las interacciones entre antifúngicos, se utilizó el índice de concentración inhibitoria fraccionaria FICI que corresponde a la suma de los FIC de cada antifúngico. Este índice permitió clasificar la interacción como sinérgica si el índice FICI fue  $\leq 0.5$ ; aditiva si el índice FICI fue  $> 0.5$  a  $\leq 1.0$ ; indiferente si el índice FICI fue  $> 1.0$  a  $\leq 2$  y antagonista si  $FICI > 2$  (Figura 3). El FIC se define como la CMI de cada antifúngico cuando actúa en combinación dividido por la CMI del antifúngico cuando actúa solo. El FICI se calculó:

$$FICI = \frac{CMI\ A\ combinación + CMI\ B\ combinación}{CMI\ A\ solo \quad CMI\ B\ solo}$$



**Figura 3.** Distribución esquemática por zonas de los compuestos antifúngicos en la microplaca. En las zonas A y B fueron dispensadas concentraciones dobles seriadas del fármaco A o B respectivamente. La zona C fue del control positivo libre de antifúngico. D, zona de combinación de antifúngicos. E y F, zonas definidas como control negativo.

### 3.2.6. Curvas de mortalidad

Las curvas de mortalidad fueron realizadas para *S. capitata* frente a posaconazol, para *R. mucilaginosa* frente a anfotericina B, posaconazol y voriconazol y para *S. cerevisiae* frente a anfotericina B, voriconazol y anidulafungina. Para ello, se prepararon concentraciones correspondientes a 0.03, 0.12, 0.5, 1, 2, 8 y 32  $\mu\text{g/ml}$  de cada fármaco en medio RPMI 1640. Paralelamente fueron inoculados tubos con 1 ml de la suspensión de cada especie de levadura ajustada a una concentración de  $5 \times 10^6$  UFC/ml, que mezclado con las concentraciones de cada fármaco, fueron incubados a 35°C. Transcurridas 4, 8, 24 y 48 horas se extrajeron 100  $\mu\text{l}$  de cada tubo para realizar diluciones seriadas y sembrar 30  $\mu\text{L}$  en agar APD por duplicado. Las placas fueron incubadas por 48 horas, para determinar las UFC/ml. Una reducción en el recuento de UFC de  $\geq 99,9\%$  o  $3 \log_{10}$  en comparación con el inóculo de partida se consideró indicativo de actividad fungicida, mientras que una reducción de recuento de UFC de

<99.9 % se consideró fungistático (Klepser *et al.*, 1998; Palleret *et al.*, 2004; Cantón *et al.*, 2006).

### 3.3. Estudios *in vivo*

#### 3.3.1. Cepas

Para evaluar la eficacia experimental de los compuestos antifúngicos, se desarrollaron infecciones diseminadas por *Saprochaetecapitata*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 4)

**Tabla 4.** Cepas incluidas en los estudios *in vivo*

Especie	Aislado	Origen
<i>Saprochaetecapitata</i>	IHEM 5665	Hemocultivo
	IHEM 5666	Hemocultivo
	IHEM 5091	Hemocultivo
	IHEM 6803	Lavado broncoalveolar
	IHEM 16105	Espito
	IHEM 16109	Boca
	<i>Cryptococcus albidus</i>	IHEM 2740
IHEM 4786		Fluido cerebroespinal
IHEM 10432		Espito
<i>Cryptococcus laurentii</i>	IHEM 1296	Cavidad oral
	FMR 8123	Clínico
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IHEM 1698	Uña
	IHEM 18459	Hemocultivo
	IHEM 20182	Hemocultivo
	IHEM 2043	Hemocultivo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FMR 13211	Clínico
	FMR 13212	Clínico
	FMR 13213	Clínico

### **3.3.2. Animales de experimentación**

Los modelos experimentales de infección diseminada se desarrollaron en ratones (*Mus musculus*) OF-1 machos (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) de cuatro semanas de edad y 30 gramos de peso.

#### **3.3.2.1. Inmunosupresión**

Los ratones fueron inmunosuprimidos vía intraperitoneal con 200/mg/kg de ciclofosfamida 2 días antes de la infección y cada 5 días hasta el momento de la eutanàsia (Chilleret *al.*, 2002).

#### **3.3.2.2. Establecimiento de los modelos de infección.**

Para establecer los diferentes modelos de infección sistémica en animales se ensayaron inóculos de cada cepa a diferentes concentraciones. Los inóculos se prepararon y ajustaron a la concentración deseada tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.2.4. La infección se llevó a cabo intravenosamente a través de la vena lateral de la cola en un volumen de 0.2 ml. Los animales se supervisaron diariamente para evaluar la progresión de la infección, síntomas clínicos y mortalidad durante 30 días tras la infección. Para evaluar la eficacia de los tratamientos antifúngicos, se seleccionó previamente un inóculo para cada especie, cuya concentración fue capaz de producir una infección aguda en los animales.



### **3.3.3 Administración de medicamentos**

La selección de la vía de administración de los fármacos utilizados en los estudios *in vivo* se realizó atendiendo a las recomendaciones del fabricante según las propiedades farmacocinéticas de cada antifúngico (Tabla 5).

#### **3.3.3.1. Oral (p.o.)**

Vía utilizada para la administración de fluconazol, voriconazol o posaconazol mediante una cánula unida a una jeringuilla de insulina en volúmenes de 0.2 ml. Para administrar medicamentos por esta vía, el ratón se mantuvo con la cabeza y el cuello extendidos.

#### **3.3.3.2. Intraperitoneal (i.p.)**

Vía utilizada para la administración de anidulafungina mediante una jeringuilla de insulina en volúmenes de 0.1 ml en el cuadrante inferior derecho del abdomen, manteniendo a los animales en posición de Trendelenburg para evitar la punción o perforación de órganos internos.

#### **3.3.3.3. Intravenosa (i.v.)**

La administración de anfotericina B o anfotericina B liposomal, se realizó mediante una jeringuilla de insulina en volúmenes de 0.2 ml, a través de la vena lateral de la cola. Antes del procedimiento, se expuso la cola del ratón al calor generado por una ampolleta de luz infrarroja para inducir la dilatación de los vasos.

**Tabla 5.** Antifúngicos ensayados *in vivo*

Antifúngico	Origen	Dosis (mg/kg/día)	Vía de administración [volumen]	Disolvente
Anfotericina B desoxicolato	Anfotericina B deoxicolato. Farmacia Xalabander, Barcelona, España	0.8	Intravenosa [0.2 ml]	Solución glucosada al 5%
Anfotericina B liposomal	Ambisome® Gilead Sciences S.L., Madrid, España	10	Intravenosa [0.2 ml]	Solución glucosada al 5%
Fluconazol	Diflucan® Pfizer S.A., Madrid, España	25	Oral [0.1 ml]	Agua
Posaconazol	Noxafil® Shering-Plough, S.A. Madrid, España	10, 20, 40	Oral [0.1 ml]	Agua
Voriconazol	Vfend® Pfizer S.A., Madrid, España	25	Oral [0.1 ml]	Agua
Anidulafungina	Ecalta® Pfizer Ltda., Kent, Reino Unido	10	Intraperitoneal [0.1 ml]	Solución salina fisiológica

### 3.3.4. Determinaciones de concentraciones séricas

Entre seis y 12 horas después de la administración de la última dosis de antifúngico, se procedió a la obtención del suero de los animales sometidos a estudio para la cuantificación de niveles séricos de fármacos y antígeno fúngico circulante (1,3-β-D-Glucano). Previa anestesia con sevofluorano inhalatorio (Baxter ®) se realizó una punción cardíaca a nivel del quinto espacio intercostal en dirección al corazón extrayendo así un volumen de sangre de 1 ml/animal. Posteriormente, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm, para la obtención de los sueros los cuales fueron almacenados a -20 ° C hasta su uso. Finalmente, los animales fueron eutanasiados mediante dislocación cervical.

### 3.3.4.1. Cuantificación de antígeno en suero

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 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 de la concentración de 1,3-β-D-Glucano en la muestra estudiada (Budhavari, 2009).

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 µl del sobrenadante de cada muestra fueron pipeteados del correspondiente pocillo de la microplaca y tratados con 20 µl de una solución de 0.6 mol/L KCL y 0.125 mol/L de KOH e incubados a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 100 µl del reactivo Fungitell® ya reconstituido a cada pocillo (controles negativos, controles estándares y muestras problemas) mediante el uso de una pipeta multicanal. Finalmente, la microplaca fue insertada en el lector del espectrofotómetro calibrado a 37°C, donde será agitado durante 5 a 10 segundos, para luego realizar la lectura de la microplaca sin tapa a 405/490 nm durante 40 minutos manteniendo una temperatura constante de 37°C.

### 3.3.4.2. Cuantificación de los niveles séricos de los fármacos mediante bioensayo

La determinación de las concentraciones séricas de cada fármaco, se realizó mediante bioensayo. Dicha técnica consistió en determinar el halo de inhibición del crecimiento de una cepa control (*Candidaparapsilosis* ATCC 22019) y relacionarlo con la concentración de fármaco presente en la muestra. Para ello se procedió primeramente a la obtención de una recta patrón para anfotericina B, fluconazol, posaconazol, voriconazol, y anidulafungina. Para ello, se prepararon un rango de diluciones dobles seriadas de posaconazol e itraconazol de entre 0.125 y 10 µg/ml, mientras que el rango utilizado para el voriconazol y la anidulafungina comprendió concentraciones a partir de 0.625 hasta 10 µg/ml y para fluconazol entre 0.625 hasta 32µg/ml. Se realizó una suspensión de las cepas control en medio YNB(yeastnitrogen base) temperado a 42°C obteniéndose así una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/ml. Dicha suspensión fue dispensada en placas de Petri de 100 x 15 mm. Una vez solidificado el medio de cultivo, se realizaron pocillos de 4 mm de diámetro mediante un sacabocados estéril y se dispensaron 30 µl de cada concentración de antifúngico en cada uno de ellos. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas, tras las que se efectuaron las mediciones de los diámetros de inhibición del crecimiento fúngico. A partir de las mediciones obtenidas, se elaboró una recta patrón en la que se relacionaba el diámetro del halo de inhibición con la concentración de fármaco.

Para calcular la concentración de fármaco en el suero de los animales se llevó a cabo la misma metodología pero en este caso los pocillos practicados en el medio de cultivo se inocularon con 30µl de suero de cada animal y se procedió a su incubación. Una vez medidos los diámetros, éstos fueron extrapolados en la recta patrón con la finalidad de conocer la concentración del antifúngico en suero.

### 3.3.5. Determinación de la carga fúngica en órganos diana.

Una vez eutanasiados los animales, se extrajeron asépticamente hígado, pulmones, riñones, cerebro y bazo. Una porción de cada órgano fue pesado y homogeneizado mecánicamente en 1 mL de suero fisiológico estéril con un hominizador de tejidos OMNI-TH-02 (OMNI Int., Kennesaw, GA. E.E.U.U.). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de los homogenizados que fueron sembrados en placas de APD, las cuales fueron incubadas entre 30-35°C dependiendo de la especie de hongo estudiado, para continuar con el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) entre las 24-72 horas de incubación dependiendo de la especie. La carga fúngica en los órganos se expresó como UFC/g según la siguiente fórmula:

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

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

#### 3.3.5.1. Estudio Histopatológico

Para llevar a cabo el estudio histopatológico, una porción de los órganos, tanto de los animales controles como de los animales tratados, fue fijada en formaldehído 4%. A continuación, se realizó la deshidratación de las muestras sumergiendo las piezas en concentraciones crecientes de alcohol etílico. Una vez deshidratadas, las muestras se sumergieron en xilol durante 2– 3 horas con el fin de eliminar el alcohol residual de las mismas y se procedió a la inclusión de las muestras en una mezcla de parafina blanda y xilol en partes iguales y en xilol saturado de parafina. Para obtener un parafinado óptimo,

las muestras se dejaron 8 horas en parafina blanda (a 50 – 55 °C). Luego, con la ayuda de un micrótopo, se realizaron cortes seriados de las piezas parafinadas de 3 µm de grosor. Finalmente, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas antes de proceder a su tinción. Para evaluar la respuesta tisular frente a la infección se emplearon las tinciones de hematoxilina-eosina y ácido periódico de Schiff. Estas tinciones permiten poner de manifiesto alteraciones en estructuras histológicas afectadas tales como inflamación, necrosis, acumulación de células inmunitarias como respuesta al proceso infeccioso. Complementariamente, se realizó la tinción con Ácido periódico de Schiff y nitrato demetenaminaagéntica de Grocott con el fin de evidenciar la presencia de estructuras fúngicas en los tejidos.

#### **3.3.5.1.1. Tinciones**

**-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 tiñeron de color morado, mientras que los mucopolisacáridos y las estructuras fúngicas presentaron un color rojo.

**-Nitrato de metenaminaagéntica de Grocott (GMS).** Los tejidos adoptaron una coloración verde y las células fúngicas se tiñeron de color negro.

### **3.3.6. Supervisión de dolor y sufrimiento en ratones**

Los animales fueron supervisados diariamente atendiendo a los signos más comunes de dolor y angustia en ratones; enumerados en orden creciente de gravedad (1) pelo hirsuto o descuidado; (2) pérdida de peso leve o severa acompañada de anorexia y/o deshidratación; (3) secreción ocular; (4) letargo o la renuencia a moverse; (5) xifosis o lordosis mantenida; (6) ataxia o descoordinación de grupos musculares; debilidad regional o generalizada; (7) temblores intermitentes o persistentes; (8) hipotermia; (9) dificultad del trabajo respiratorio; y (10) cianosis, o coloración azul a las membranas mucosas. Todos los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universitat Rovira i Virgili. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar con libre acceso a comida y agua, siendo supervisados diariamente.

### **3.3.7. Análisis estadísticos**

Para la realización de los diferentes estudios estadísticos se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EEUU).

Los resultados obtenidos en los estudios de supervivencia, fueron analizados con el método de Kaplan Meier el cual permitió calcular el tiempo medio de supervivencia (TMS) para un grupo de animales. Una vez realizado dicho cálculo para cada grupo, se utilizó el Long-rank test para comparar los TMS de los diferentes grupos entre sí o respecto al grupo control. Para los resultados de cuantificación del hongo en diversos órganos, se utilizó test no paramétrico U de Mann-Whitney, el cual permitió comparar los datos obtenidos en los recuentos de colonias por gramo de órgano. Con este test, no hace

falta que los datos sigan una distribución normal y podemos trabajar con los datos originales o logarítmicos.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

---

## RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales



## Efficacy of Posaconazole in a Murine Model of Systemic Infection by *Saprochaete capitata*

Pamela Thomson,<sup>a</sup> Josep Guarro,<sup>a</sup> Emilio Mayayo,<sup>b</sup> Javier Capilla<sup>a</sup>

Unitat de Microbiologia<sup>a</sup> and Unitat de Anatomia Patològica,<sup>b</sup> Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain

The fungus *Saprochaete capitata* causes opportunistic human infections, mainly in immunocompromised patients with hematological malignancies. The best therapy for this severe infection is still unknown. We evaluated the *in vitro* killing activity and the *in vivo* efficacy of posaconazole at 5, 10, or 20 mg/kg twice a day (BID) in a murine neutropenic model of systemic infection with *S. capitata* by testing a set of six clinical isolates. Posaconazole showed fungistatic activity against all of the isolates tested. The different doses of the drug, especially the highest one, showed good efficacy, measured by prolonged survival, reduction of (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels in serum, tissue burden reduction, and histopathology.

*Saprochaete capitata*, formerly known as *Trichosporum capitatum*, *Geotrichum capitatum*, and *Blastoschizomyces capitatus*, is an uncommon clinical fungus belonging to the phylum *Basidiomycota*, but it is able to cause fatal fungemia in immunocompromised patients, especially in those with hematological malignancies (1–6). The therapeutic options against these infections are limited, because *S. capitata* is considered intrinsically resistant to the echinocandins (7–10). Currently, there are no recommendations for the management of infections caused by *S. capitata*, although amphotericin B is the drug most commonly used in the clinical setting, followed by itraconazole and voriconazole (9, 11–14). The use of these compounds is supported by the *in vitro* antifungal susceptibility of *S. capitata* to such drugs. However, despite treatment, the mortality rate still remains high, at around 60% (5, 15–19), making it necessary to explore new therapeutic approaches. In previous studies conducted on mice, high doses of fluconazole demonstrated higher efficacy than amphotericin B, flucytosine, and voriconazole (20). Posaconazole has not been evaluated against this fungal species before but has shown efficacy in experimental infections against a wide range of opportunistic fungi, such as *Aspergillus* spp., *Curvularia* spp., *Rhizopus oryzae* (21, 22, 23), and others, including *Trichosporum asahii*, which is taxonomically related to *S. capitata* (24). In the present study, we evaluated the *in vitro* killing activity of posaconazole against this fungus as well as its *in vivo* efficacy in a neutropenic murine model of systemic infection by *S. capitata*.

### MATERIALS AND METHODS

**Strains and inocula.** Six clinical strains of *S. capitata* (IHEM 5665, IHEM 5666, IHEM 5091, IHEM 6803, IHEM 16105, and IHEM 16109) were included in this study. The inocula were prepared from potato dextrose agar (PDA) cultures by flooding the plates with 3 ml of sterile saline solution and scraping the surface of the colonies with a loop in order to obtain a conidial suspension. To remove hyphal fragments and clumps of agar, the resulting suspension was filtered twice through sterile gauze and then adjusted by hemocytometer counts to the desired concentrations. Viability of inocula was determined by placing 10-fold dilutions of the conidial suspension on PDA plates.

***In vitro* studies.** Pure posaconazole powder provided by Schering-Plough (Kenilworth, NJ) was used in the *in vitro* study following the reference microdilution method according to CLSI document M27-A3 (25). Time-kill curves were determined as previously described (26). In brief, 2-fold serial dilutions, ranging from 64 to 0.06  $\mu$ g/ml of posaconazole,

were assayed. At predetermined time points (0, 4, 8, 24, and 48 h), aliquots of 100  $\mu$ l were removed, serially diluted in sterile water, placed onto PDA plates, and incubated at 35°C for 24 to 48 h in order to determine the CFU/ml. This procedure allowed a limit of detection of 33 CFU/ml. All assays were carried out in duplicate, and the geometric mean and standard deviation were calculated. A CFU count reduction of  $\geq 99.9\%$  or of  $3 \log_{10}$  compared to the starting inoculum was considered indicative of fungicidal activity, while a CFU count reduction of  $< 99.9\%$  was considered fungistatic (27).

***In vivo* studies.** Four-week-old OF-1 male mice (Charles River, Criffa Sa, Barcelona, Spain) weighing 28 to 30 g were used. All animals included in the study were immunosuppressed by intraperitoneal administration of a single dose of 200 mg/kg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk Sa, Barcelona, Spain) 2 days prior to the infection and then every 5 days until the end of the experiment (28). In order to prevent bacterial infections, all animals received 5 mg/kg/day of ceftazidime subcutaneously. Mice were inoculated intravenously (i.v.) with  $2 \times 10^6$  CFU/animal of each fungal strain in 0.2 ml of sterile saline solution into the lateral tail vein. This inoculum has previously proven appropriate for producing an acute infection (20). Animals were housed under standard conditions, and care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili animal welfare committee. The efficacy of posaconazole was evaluated by prolongation of survival, (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels in serum, reduction of tissue burden, and histopathologic features.

Groups of 13 mice were randomly established: 5 for survival and 8 for tissue burden and determination of (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels in serum samples.

In a preliminary study, animals were challenged with the *S. capitata* strains IHEM 5666 and IHEM 16105, and the efficacy of posaconazole was assayed at increasing doses of 5, 10, and 20 mg/kg twice a day (BID) orally by gavage for 6 days starting 24 h after infection to determine the most effective dose. The doses were selected from time-kill results and previous drug pharmacodynamics studies (29, 30). Since posaconazole at 10 mg/kg

Received 25 May 2015 Returned for modification 31 July 2015

Accepted 13 September 2015

Accepted manuscript posted online 21 September 2015

Citation Thomson P, Guarro J, Mayayo E, Capilla J. 2015. Efficacy of posaconazole in a murine model of systemic infection by *Saprochaete capitata*. Antimicrob Agents Chemother 59:7477–7482. doi:10.1128/AAC.01140-15.

Address correspondence to Javier Capilla, javier.capilla@urv.cat.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Thomson et al.

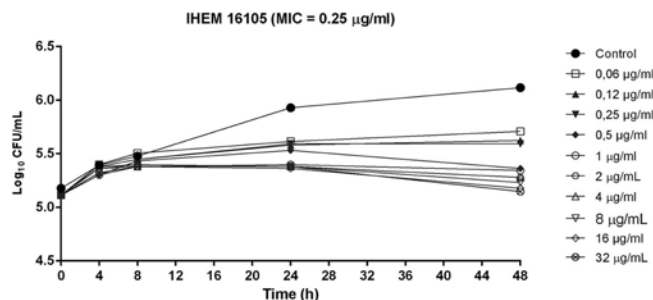


FIG 1 Time-killing kinetic assay of posaconazole against *S. capitata* strain IHEM 16105.

already showed good efficacy, this dose was chosen to be tested against the four remaining strains in a second study.

**Determination of glucan and drug levels and fungal load.** Control and treated mice from the tissue burden study group were anesthetized by inhalation of sevoflurane (Sevorane; Abbott, Madrid, Spain) on day 7 postinfection; 12 h after the last dose was administered, 1 ml of blood from each mouse was extracted by cardiac puncture. Animals were then euthanized by cervical dislocation. Serum samples were obtained by centrifugation of the blood at 3,500 rpm and were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Serum levels of (1-3)- $\beta$ -D-glucan were determined using the Fungitell kit (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA, USA) following the manu-

facturer's instructions, and serum levels of drug were determined by bioassay, as previously described (31). The liver, spleen, lungs, kidneys, and brain of animals were aseptically removed, and approximately one-half of each organ was weighed and mechanically homogenized in 1 ml of sterile saline solution. Homogenates were serially diluted (1:10), placed onto PDA plates, and incubated for 48 h at  $35^{\circ}\text{C}$  for fungal load calculation (CFU/g of tissue).

**Histopathology.** The other half of each organ was fixed with 10% buffered formaldehyde. Samples were embedded in paraffin, stained with hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff (PAS), or Grocott methenamine silver (GMS), and examined in a blinded fashion by light microscopy.

**Statistical analysis.** The mean survival times were estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups using the log-rank test. Results from the tissue burden studies were analyzed using the Mann-Whitney U test, and the Kolmogorov-Smirnov test was carried out to determine the normal distribution of (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels in serum with GraphPad Prism 6.0 for Microsoft Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A *P* value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

**RESULTS**

Posaconazole showed fungistatic activity against the six strains of *S. capitata* tested, with a reduction in the viability of  $\leq 0.14$   $\log_{10}$  CFU/ml. Figure 1 illustrates the time-killing kinetic assay against strain IHEM 16105 as representative of all of the strains assayed. Additionally, the MIC value was  $0.25 \mu\text{g/ml}$  against all strains.

The dose escalation study showed the efficacy of posaconazole 10 and 20 mg/kg against the two strains tested in this first study in comparison to the control group ( $P \leq 0.016$ ), while

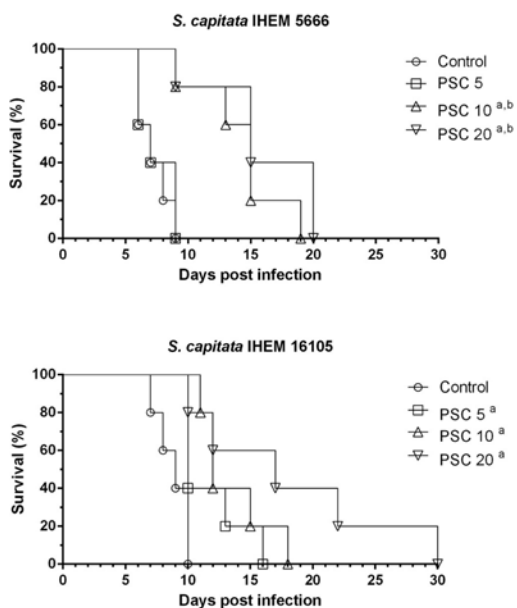


FIG 2 Survival of neutropenic mice infected intravenously with  $2 \times 10^6$  CFU of *S. capitata* IHEM 5666 and IHEM 16105. Animals were treated for 6 days with posaconazole (PSC) at 5 mg/kg BID (PSC 5), 10 mg/kg BID (PSC 10), or 20 mg/kg BID (PSC 20). <sup>a</sup>, *P* value of  $\leq 0.02$  versus control; <sup>b</sup>, *P* value of 0.008 versus PSC 5.

TABLE 1 Survival of mice infected with 6 different *S. capitata* strains and treated with PSC 10<sup>a</sup>

Strain	MST (days) (95% CI) <sup>b</sup>		<i>P</i>
	Control	PSC 10	
IHEM 5665	9.2 (6.9–11.42)	17.8 (8.8–26.73)	0.0039
IHEM 5666	7.2 (5.58–8.81)	14.20 (9.6–18.70)	0.0025
IHEM 5091	7.6 (5.71–9.48)	17 (7.8–26.17)	0.0039
IHEM 6803	9.4 (7.7–11.07)	15.40 (10.70–20.10)	0.0048
IHEM 16105	8.8 (7.18–10.42)	11.8 (8.46–15.13)	0.0027
IHEM 16109	8.6 (5.88–11.32)	13.4 (8.70–18.10)	0.0480

<sup>a</sup> PSC 10, posaconazole 10 mg/kg BID.

<sup>b</sup> MST, mean survival time; CI, confidence interval.

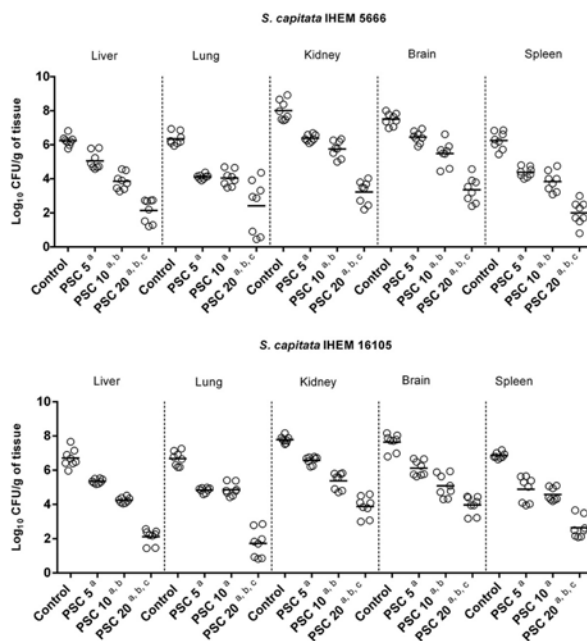


FIG 3 Effects of antifungal treatment on colony counts of neutropenic mice infected with  $2 \times 10^6$  CFU of *S. capitata* in liver, lung, kidney, brain, and spleen and treated for 6 days with posaconazole (PSC) at 5 mg/kg BID (PSC 5), 10 mg/kg BID (PSC 10), or 20 mg/kg BID (PSC 20). <sup>a</sup>, *P* value of  $\leq 0.007$  versus control; <sup>b</sup>, *P* value of  $\leq 0.007$  versus PSC 5; <sup>c</sup>, *P* value of  $\leq 0.014$  versus PSC 10.

posaconazole 5 mg/kg BID showed efficacy against only one of the two strains (IHEM 16105) ( $P = 0.029$ ) (Fig. 2). The dose of 10 mg/kg BID was chosen for the second study for treating infections by the six strains, and this dose significantly pro-

longed the survival with respect to the control group ( $P \leq 0.048$ ) (Table 1).

The six strains tested caused a high fungal load in all organs, and the kidneys and brain generally were the most affected

TABLE 2 Effects of antifungal treatment on colony counts in the liver, lung, kidney, brain, and spleen of neutropenic mice infected with  $2 \times 10^6$  CFU of *S. capitata*

Strain	Treatment <sup>b</sup>	Log <sub>10</sub> CFU/g of tissue (95% CI) <sup>a</sup>				
		Liver	Lung	Kidney	Brain	Spleen
IHEM 5665	Control	6.31 (5.88–6.92)	6.76 (6.11–7.11)	7.88 (7.75–8.10)	8.01 (7.69–8.45)	6.17 (5.80–6.45)
	PSC 10	2.89 (2.48–3.27) <sup>e</sup>	3.69 (2.90–4.50) <sup>f</sup>	5.52 (5.25–5.90) <sup>f</sup>	6.00 (5.65–6.68) <sup>f</sup>	3.69 (3.30–4.17) <sup>d</sup>
IHEM 5666	Control	6.24 (5.78–6.82)	6.35 (5.95–6.94)	8.00 (7.44–8.93)	7.51 (6.98–8.01)	6.23 (5.45–6.86)
	PSC 10	3.85 (3.27–4.57) <sup>d</sup>	4.04 (3.49–4.70) <sup>f</sup>	5.75 (5.00–6.35) <sup>f</sup>	5.48 (4.45–6.62) <sup>f</sup>	3.84 (3.1–4.75) <sup>e</sup>
IHEM 5091	Control	6.11 (5.25–7.28)	6.12 (5.58–6.62)	7.68 (7.34–8.00)	7.31 (6.62–7.81)	6.04 (5.60–6.40)
	PSC 10	2.89 (2.20–3.42) <sup>e</sup>	2.97 (2.41–3.30) <sup>f</sup>	5.07 (4.00–5.88) <sup>f</sup>	5.20 (4.10–5.92) <sup>f</sup>	3.61 (3.00–4.15) <sup>e</sup>
IHEM 6803	Control	6.35 (5.80–6.73)	6.68 (6.10–7.10)	8.07 (7.78–8.50)	7.54 (7.20–7.82)	6.47 (5.57–7.74)
	PSC 10	3.31 (3.10–3.61) <sup>e</sup>	3.43 (2.80–4.25) <sup>f</sup>	5.35 (4.9–5.96) <sup>f</sup>	5.55 (4.90–5.96) <sup>f</sup>	3.23 (2.90–3.39) <sup>f</sup>
IHEM 16105	Control	6.71 (5.97–7.67)	6.68 (6.19–7.26)	7.78 (7.53–8.17)	7.64 (6.99–8.17)	6.85 (6.64–7.18)
	PSC 10	4.24 (4.05–4.39) <sup>e</sup>	4.85 (4.42–5.41) <sup>f</sup>	5.37 (4.71–5.80) <sup>f</sup>	5.08 (4.30–5.64) <sup>f</sup>	4.57 (4.29–5.10) <sup>f</sup>
IHEM 16109	Control	6.09 (5.88–6.26)	6.29 (5.12–6.99)	7.41 (6.98–7.86)	7.51 (6.70–8.01)	6.98 (6.3–6.46)
	PSC 10	3.21 (2.30–4.07) <sup>e</sup>	3.53 (2.80–4.37) <sup>f</sup>	5.29 (4.62–5.75) <sup>f</sup>	5.41 (5.02–5.83) <sup>f</sup>	3.65 (3.10–4.32) <sup>f</sup>

<sup>a</sup> CI, confidence interval.

<sup>b</sup> PSC 10, posaconazole at 10 mg/kg BID for 6 days.

<sup>c</sup> *P* value of 0.0002 compared to control group.

<sup>d</sup> *P* value of 0.007 compared to control group.



Thomson et al.

(mean  $\log_{10}$  CFU/g tissue,  $\geq 7.41$  and  $\geq 7.31$ , respectively). For the strains IHEM 5666 and IHEM 16105, any dose of posaconazole significantly reduced the fungal load in comparison to the control in all organs studied ( $P \leq 0.0079$ ) (Fig. 3), and posaconazole 10 mg/kg BID did so against the rest of the strains ( $P \geq 0.0079$ ) (Table 2). The reduction of CFU/g in animals receiving posaconazole 10 mg/kg BID, with respect to the control animals, ranged from 1.83 to 3.42  $\log_{10}$ ; the highest reduction observed was in the liver (mean  $\pm$  standard deviation [SD]  $\log_{10}$  reduction,  $2.9 \pm 0.41$ ), and the lowest was in the brain (mean  $\log_{10}$  reduction,  $2.13 \pm 0.21$ ). Twelve hours after the end of the treatment with posaconazole at 5, 10, and 20 mg/kg, mean ( $\pm$  SD) serum levels of drug were  $5.76 \pm 0.5$ ,  $6.48 \pm 0.75$ , and  $7.46 \pm 0.70$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively; all levels were above the MIC values. At day 7 postinfection, the (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels in the serum of the controls ranged from 360 to 503 pg/ml. Posaconazole at 5, 10, or 20 mg/kg BID was able to reduce the (1-3)- $\beta$ -D-glucan concentrations in serum in comparison with those of the untreated group, although reduction was not below the cutoff for positivity in human infections, which is 80 pg/ml (32) (Fig. 4).

The histopathologic studies also confirmed that kidney and brain were the most affected organs in untreated animals. Presence of necrotic and hemorrhagic foci with no inflammatory response and abundant fungal structures located in the parenchyma and associated with angioinvasion were observed in all of the studied organs (Fig. 5). In mice receiving the different doses of posaconazole, the presence of fungal cells was reduced in a dose-dependent manner; the presence was observed focally in the parenchyma, with no sign of necrosis or angioinvasion.

#### DISCUSSION

*S. capitata* causes serious opportunistic infections in patients with hematological malignancies, especially in those with acute leukemia, and is associated with a poor outcome (2, 4, 5). Although an improvement in neutropenia in patients with systemic infections by *S. capitata* leads to a better prognosis, it is not enough to cure the infection (2, 4–6).

In this study, we evaluated the efficacy of posaconazole against an unusual number of clinical strains for this type of study, trying to evaluate the possible intraspecies variability in antifungal response, as there is in many species. Therefore, we selected six clinical strains of *S. capitata* with identical MICs and similar time-kill kinetics of posaconazole. Other authors have reported that posaconazole is active *in vitro* against *S. capitata*, with MICs ranging from 0.016 to 1  $\mu\text{g/ml}$  (3, 5, 9) although MICs of  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  have occasionally been reported (18).

In this study, posaconazole at any dose prolonged the survival of the animals compared to the control group, and the best results were obtained with posaconazole 10 and 20 mg/kg BID. In addition, posaconazole at any dose significantly reduced the fungal burden in all the studied organs as well as reduced the (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels in serum. This reduction was dose dependent and correlated with the levels of drug detected in serum after the end of the treatment. The (1-3)- $\beta$ -D-glucan marker is a cell wall component that is common in the fungal kingdom, easily detectable, and quantifiable in serum and body fluids, and it is used as a marker of disseminated fungal infections, including those caused by *S. capitata* (9, 33). We found a correlation between the decrease in the marker, the

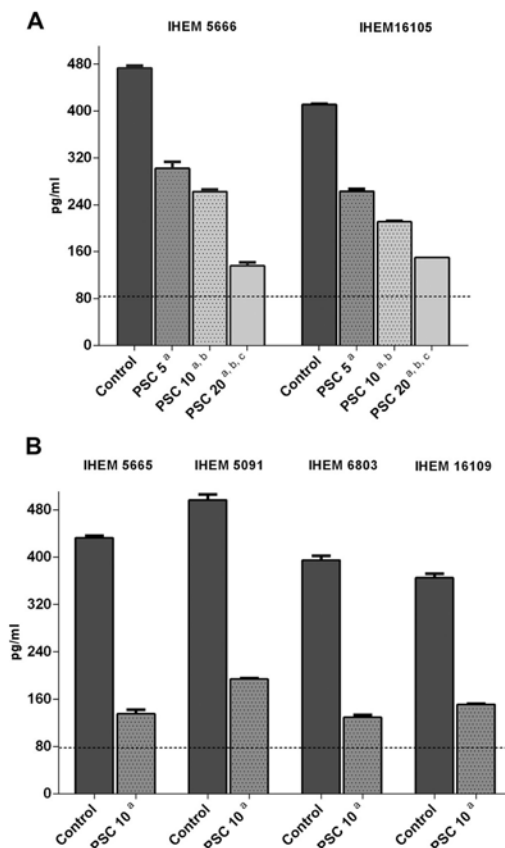
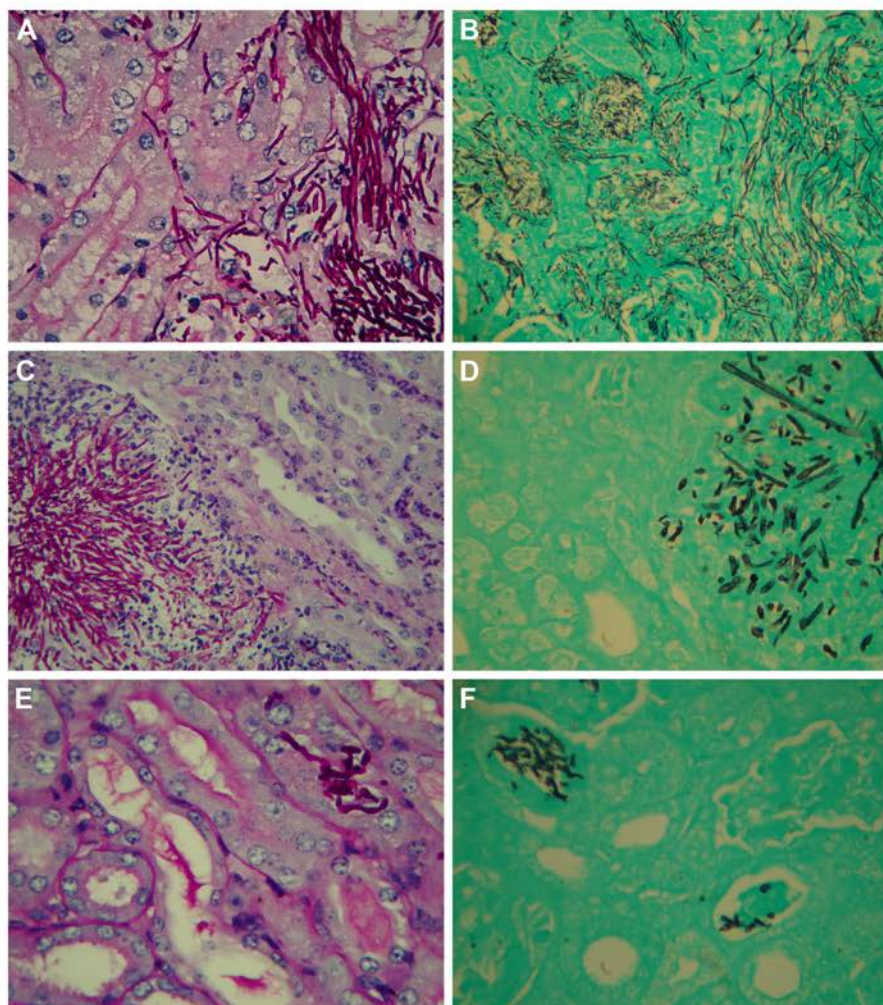


FIG 4 (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels in the serum of mice infected with *S. capitata* strains IHEM 5666 and IHEM 16105 (group control, PSC 5, 10, or 20 mg/kg BID) (A) or strains IHEM 5665, IHEM 5091, IHEM 6803, and IHEM 16109 (group control, PSC 10 mg/kg BID) (B). Horizontal line indicates the cutoff positive (80 pg/ml). <sup>a</sup>,  $P$  value of  $\leq 0.028$  versus control; <sup>b</sup>,  $P$  value of  $\leq 0.028$  versus PSC 5; <sup>c</sup>,  $P$  value of  $\leq 0.028$  versus PSC 10.

fungal load, and the dose administered. Until now, the detectable levels of (1-3)- $\beta$ -D-glucan have been used for diagnosis, although the relationship between such antigen levels and the fungal load found in the present study and in previous studies on animal models (9, 33) seems to indicate that (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels might be useful for evaluating prognosis in infections with *S. capitata*. Further studies are needed to confirm this finding.

As indicated above, the efficacy of other drugs, such as amphotericin B, flucytosine, voriconazole, and fluconazole, was previously evaluated in systemic infection by *S. capitata* using a murine model which showed that fluconazole at a high dose (80 mg/kg) was the most effective in prolonging the survival of mice and reducing the fungal burden in the liver, spleen, and kidney (20). This was similar to posaconazole activity in the present study. Despite good results obtained with fluconazole in the treat-



**FIG 5** Histological findings in kidneys of immunosuppressed mice infected with *S. capitata* (strain IHEM 16105) 7 days postinfection. (A, B) Control mice showing massive invasion of renal parenchyma by hyphae without inflammatory response or necrosis. (C, D) Mice treated with PSC 10 showing decrease of hyphae in renal parenchyma level. (E, F) Mice treated with PSC 20 showing less presence of hyphae within renal tubules. Stain for A, C, and E was PAS. Stain for B, D, and F was GMS. Magnification,  $\times 400$ .

ment of the experimental infection by *S. capitata*, an important limitation to its use is the reported resistance to that drug *in vitro* (1). Other reports indicate the lack of susceptibility of *S. capitata* to fluconazole and/or echinocandins, given that these antifungal compounds are administered empirically to prevent or treat infections by other fungi in patients with hematological malignancies (9). Considering the little experience in the management of systemic infections with *S. capitata* and the risk of acquired resistance to fluconazole and echinocandins, our results are of special

interest. Posaconazole, which is a well-tolerated drug treatment, could be another useful tool in our fight against this difficult-to-treat infection, especially when other therapeutic options fail.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Institute of Hygiene and Epidemiology (IHE) located in Brussels for the strains used in this study.

This project received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development, and



demonstration under grant agreement HEALTH-2013-INNOVATION-2-601963.

## REFERENCES

- D'Antonio D, Mazzoni A, Lacone A, Violante B, Capuani MA, Shioppa F, Romano F. 1996. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Blastoschizomyces capitatus* causing nosocomial infections in cancer patients. *J Clin Microbiol* 34:753–755.
- Buchta V, Zák A, Kohout P, Otcenášek M. 2001. Case report: disseminated infection of *Blastoschizomyces capitatus* in a patient with acute myelocytic leukemia. *Mycoses* 44:505–512. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00699.x>.
- Christakis G, Perlorentzou S, Aslanidou M, Megalakaki A, Velegraki A. 2005. Fatal *Blastoschizomyces capitatus* sepsis in a neutropenic patient with acute myeloid leukemia: first documented case from Greece. *Mycoses* 48: 216–220. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01098.x>.
- Darlesa C, Ponsa S, Gaillarda T, Roméob E, Brisoua P. 2012. Disseminated infection due to *Geotrichum capitatum*. *Med Mal Infect* 42:574–575. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2012.09.003>.
- Villa López I, Doblas Claros A, Saavedra JM, Herrera-Carranza M. 2013. Multiorgan failure in a patient with fungaemia due to *Saprochaete capitata*. *Rev Iberoam Micol* 30:261–263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2012.12.003>.
- Trabelsi H, Néji S, Gargouri I, Sellami H, Guidara R, Cheikhrouhou F, Bellaaj H, Makni F, Elloumi M, Ayadi A. 2015. *Geotrichum capitatum* septicemia: case report and review of the literature. *Mycopathologia* 179: 465–469. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-015-9869-2>.
- Schermans C, van Bergen M, Coorevits L, Verhaegen J, Lagrou K, Surmont I. 2011. Breakthrough *Saprochaete capitata* infections in patients receiving echinocandins: cases report and review of the literature. *Med Mycol* 49:414–418. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2010.535179>.
- Birrenbach T, Bertschy S, Aebersold F, Mueller N, Achermann Y, Muehlethaler K, Zimmerli S. 2012. Emergence of *Blastoschizomyces capitatus* yeast infections, central Europe. *Emerg Infect Dis* 18:98–101. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1801.111192>.
- García-Ruiz JC, López-Soria L, Olazábal I, Amutio E, Arrieta-Aguirre I, Velasco-Benito V, Pontón J, Moragues M. 2013. Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with hematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy. *Rev Iberoam Micol* 30:248–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.02.004>.
- Pemmaraju N, Shetty AV, Prieto VG, Jain N, Kontoyiannis DP, Borthakur G. 2014. Disseminated *Saprochaete capitata* (formerly known as *Geotrichum capitatum* and *Blastoschizomyces capitatus*) in a patient with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 93:543–544. <http://dx.doi.org/10.1111/ejh.12303>.
- Martino R, Salavert M, Parody R, Tomás J, De la Cámara R, Vásquez L, Jarque I, Prieto E, Sastre J, Gadea I, Pemán J, Sierra J. 2004. *Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases. *Clin Infect Dis* 38:335–341. <http://dx.doi.org/10.1086/380643>.
- Ikuta K, Torimoto Y, Yamamoto M, Okamura N, Hosoki T, Sato K, Fujiya M, Kohgo Y. 2010. Successful treatment of systemic *Geotrichum capitatum* infection by liposomal amphotericin-B, itraconazole, and voriconazole in a Japanese man. *Intern Med* 49:2499–2503. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.49.3887>.
- Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group, European Confederation of Medical Mycology. 2014. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 20:76–98. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12444>.
- Mazzocato S, Marchionni E, Fothergill AW, Sutton DA, Staffolani S, Gesuita R, Skrami E, Fiorentini A, Manso E, Barchiesi F. 2015. Epidemiology and outcome of systemic infections due to *Saprochaete capitata*: case report and review of the literature. *Infection* 43:211–215. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-014-0668-3>.
- Cantón E, Pemán J, Orero A, Viudes A, Gil J, Rubio MC, Gobernado M. 2002. *In vitro* activity of posaconazole against yeasts isolated in blood cultures. *Rev Esp Quimioter* 15:335–340. (In Spanish.)
- Girmeria C, Pizzarelli G, D'Antonio D, Cristini F, Martino P. 2003. *In vitro* susceptibility testing of *Geotrichum capitatum*: comparison of the Etest, disk diffusion, and Sensititre colorimetric methods with the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3985–3988. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.12.3985-3988.2003>.
- Thompson G, Wiederhold N, Sutton D, Fothergill A, Patterson T. 2009. *In vitro* activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Pichia* species. *J Antimicrob Chemother* 64:79–83. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp138>.
- Carrillo-Muñoz J, Tur-Tur C, Hernández-Molina J, Quindós G, Marcos-Arias C, Eraso E, Cárdenes D, Ortiz-Maestro O, Santos P, Estivill D, Guardia C, Giusiano G. 2010. Antifungal activity of posaconazole against *Candida* spp. and non-*Candida* clinical yeasts isolates. *Rev Esp Quimioter* 23:122–125.
- Guinea J, Recio S, Escribano P, Peláez T, Gama B, Bouza E. 2010. *In vitro* antifungal activities of isavuconazole and comparators against rare yeast pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4012–4015. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00685-10>.
- Serena C, Mariné M, Mariné R, Pastor F, Guarro J. 2007. Effect of antifungal treatment in a murine model of blastoschizomycosis. *Int J Antimicrob Agents* 29:79–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.08.025>.
- Salas V, Pastor FJ, Rodríguez MM, Calvo E, Mayayo E, Guarro J. 2011. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of posaconazole in treatment of murine infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 55:676–679. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00736-10>.
- Paredes K, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Guarro J. 2014. Experimental treatment of curvularia infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79:428–431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.004>.
- Lewis RE, Ben-Ami R, Best L, Albert N, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. 2013. Tacrolimus enhances the potency of posaconazole against *Rhizopus oryzae* *in vitro* and in an experimental model of mucormycosis. *J Infect Dis* 207:834–841. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis767>.
- Treviño-Rangel Rde J, López LJ, Palma-Nicolás JP, Hernández-Bello R, González JG, González GM. 2014. Therapeutic efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated trichosporonosis. *J Antimicrob Chemother* 69:1075–1078. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt466>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard—3rd ed. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaller MA. 1997. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1392–1395.
- Cantón E, Peman J, Valentín A, Bosch M, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. 2008. Comparison of posaconazole and voriconazole *in vitro* killing against *Candida krusei*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62:177–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.001>.
- Chiller TM, Capilla J, Sobel RA, Farrokhsad K, Clemons KV, Stevens DA. 2002. Development of a murine model of cerebral aspergillosis. *J Infect Dis* 186:574–577. <http://dx.doi.org/10.1086/341567>.
- Andes D, Marchillo K, Conklin R, Gopal K, Farkad E, Cacciapuoti A, Loebenberg D. 2004. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole in a murine model disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 48:137–141. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.1.137-142.2004>.
- Salas V, Pastor J, Calvo E, Sutton D, Chander J, Mayayo, Álvarez E, Guarro J. 2012. Efficacy of posaconazole in a murine model disseminated infection caused by *Apophysomyces variabilis*. *J Antimicrob Chemother* 67:1712–1715. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks090>.
- Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A. 2012. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin Microbiol Infect* 18:1229–1235. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03732.x>.
- Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. 2005. Evaluation of a (1-3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 43:5957–5962. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.12.5957-5962.2005>.
- Cuéstara MS, Alhambra A, Moragues MD, González-Elorza E, Pontón J, del Palacio A. 2009. Detection of (1-3)-beta-D-glucan as an adjunct to diagnosis in a mixed population with uncommon proven invasive fungal diseases or with an unusual clinical presentation. *Clin Vaccine Immunol* 16:423–426. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00009-09.1>.

**Efficacy of amphotericin B combined to voriconazole in a neutropenic murine model  
of systemic infection by *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii***

Running title: Antifungal therapies against *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii*

Pamela Thomson<sup>1</sup>, Javier Capilla<sup>1</sup>, Emilio Mayayo<sup>2</sup>, Josep Guarro<sup>1\*</sup>

Unitat de Microbiologia<sup>1</sup> and Unitat de Anatomia Patològica<sup>2</sup>, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV; Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain.

\*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](mailto:josep.guarro@urv.cat)

## **Abstract**

*C. albicus* and *C. laurentii*, are yeast which in recent decades have gained importance cause by opportunistic in human infections, mainly in immunocompromised patients. The best therapy for this severe infection is still unknown. We evaluated the efficacy of monotherapies with amphotericin B (AMB) 0,8 mg/kg administered intravenously (i.v.), fluconazole or voriconazole both administered orally (p.o.) at 25 mg/kg; or combination of AMB plus VRC in a murine model of systemic infection against three *C. albicus* and two *C. laurentii* strains. The results show that all treatments significantly reduced de fungal burden in all organs studied in comparison with the control group. The combination of AMB+VRC showed synergistic effect in the reduction of fungal load that was significantly higher to any tested therapy. The histopathological studies reflected in the reduction or absence of fungal load in all organs studied.

**Key words:** therapy, *Cryptococcus albicus*, *Cryptococcus laurentii*, neutropenic, murine model.

## INTRODUCTION

*Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii* are basidiomycetous yeasts worldwide distributed that have been isolated from various environmental sources including air, soil, water, pigeon droppings and food (Arendrup et al., 2014). These species can colonize human beings through the respiratory and gastrointestinal tracts and become opportunistic pathogens in patients with impaired cellular immunity (Miceli et al., 2011). Both species together, are the cause 80% of the related non-*neoformans* and non-*gattii* cryptococcal infections involving blood, central nervous system, skin, eyes and lungs. The mortality has been reported to be more frequent in *C. albidus*-infected patients than in those with *C. laurentii*, especially in cases meningitis involvement (Klawcharoenporn et al., 2007). The few cases of disseminated infections by these species have been associated to underlying diseases as hematologic malignancy, AIDS, solid tumor, invasive devices and immunosuppressant therapy (Cheng et al., 2001; Klawcharoenporn et al., 2007; Kuklinska et al., 2009; Kulkarni et al., 2012; Banerjee et al., 2013; Liu et al., 2014; Conti et al., 2015).

Due to the low incidence of infections by *C. albidus* and *C. laurentii*, few data about the management of such disease exist. Amphotericin B (AMB) is used as the gold standard treatment for cryptococcosis used alone or in combination with flucytosine (5-FC) being fluconazole (FLC) used in maintenance therapy or prophylaxis (Perfect et al., 2010). Despite the effectiveness of AMB with or without 5-FC, their use may be limited due to the related nephrotoxic and hepatotoxic effects (Saag et al., 2000; Catalán & Montejo, 2006; Perfect et al., 2010). On other hand, the treatment based on FLC must be carefully monitored due to the reported increase of resistant strains (Sar et al., 2004). In general, AMB and triazoles such as itraconazole, posaconazole or voriconazole had shown the

lowest MICs values against *Cryptococcus* spp. including *C. albidus* y *C. laurentii* (Serena et al., 2004; Bernal-Martínez et al., 2010; Teodoro et al., 2013). While echinocandins, such as micafungin, anidulafungin and caspofungin, seems inactive (Bernal-Martínez et al., 2010).

Previously, Serena et al 2005, tested the interaction of micafungin in association to AMB or different azoles against *C. albidus* and *C. laurentii*, showing between 40% and 71% of synergism for the all strains tested (Serena et al., 2005).

The use of AMB associated to azoles in the treatment of fungal infection is still a controversial issue. In theory, due to mechanism of action the azoles could antagonize the effects of AMB, however experimental data have demonstrated that the effects of this type of interaction can range from antagonistic to synergistic; for example the use of AMB+FLC or AMB + itraconazole against *C. neoformans* in mice resulted in synergistic effect. (Barchiesi et al., 2010). Others studies in murine model of meningitis, pulmonary and systemic infection caused by *C. neoformans* have demonstrated the efficacy of AMB combined to VRC (Mavrogiorgos., 2006; Serena et al., 2007; Gazzoni et al., 2012; Silva et al., 2012).

Currently, the infections caused by *C. albidus* and *C. laurentii*, lack of specific guidelines for their management. The aim of the present study was to determine the *in vitro* activity of AMB combined to VRC and FLC; and the *in vivo* efficacy of amphotericin B combined to voriconazole in a neutropenic murine model of systemic cryptococcosis by *C. albidus* and *C. laurentii*.

## **MATERIAL AND METHODS**

### Strains and inocula

Three clinical strains of *C. albicans* (IHEM 4786, IHEM 2740 and IHEM 10432) and two of *C. laurentii* (IHEM 8063 and FMR 8123) were included in this study. The identification was confirmed by comparing the sequences of large-sub unit ribosomal RNA gene of the isolates with that of the type species. The fungal isolates were stored lyophilized and subcultured twice on potato dextrose agar (PDA) at 30°C for 72 hours for its use.

### *In vitro* studies

Minimal inhibitory concentration (MIC) of AMB (Sigma Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain), FLC (Pfizer S.A., Madrid, Spain) and VRC (Pfizer S.A., Madrid, Spain) obtained as pure powder, were assayed by microdilution broth methodology according to the document M27-A3 (CLSI, 2008). MICs were defined as the lowest drug concentration that produced 100% and 50% inhibition of visible fungal growth after 72 h of incubation with AMB and azoles, respectively. The *in vitro* activity of AMB plus VRC or plus FLC was assayed by using a two-dimensional checkerboard microdilution method. The fractional inhibitory concentration index (FICI) was used to classify drug interactions as synergistic if the FICI was  $\leq 0.5$ ; additive if the FICI index was  $> 0.5$  to  $\leq 1.0$ ; indifferent if the FICI index was  $> 1$  to  $\leq 2.0$  and antagonistic if the FICI index was  $> 2$  (Barchiesi et al., 2000).

### In vivo studies

To investigate the effects of AMB+VRC combination therapy *in vivo*, we established an experimental model of systemic infection. Four-week-old male OF1 mice weighing 28-30 g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used. Mice were immunosuppressed by intraperitoneal administration of a single dose of 200 mg/ kg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk SA, Barcelona, Spain), beginning 2 days prior to the infection and then every 5 days until the end of the experiment (Chiller et al., 2002). Mice were inoculated intravenously (i.v.) through the lateral tail vein with a suspension of  $5 \times 10^7$  CFU per animal in 0,2 mL of sterile saline solution. Preliminary experiments of virulence demonstrated that this inoculum was appropriate for producing an acute infection (Pedroso et al., 2009).

### Antifungal therapy

Groups consisting on thirteen mice, 5 for survival and 8 for tissue burden studies, serum levels histopathology studies, were randomly established. Animals received antifungal monotherapies consisting on: AMB deoxycholate (Farmacia Xalabarder, Barcelona, Spain) administered intravenously (i.v) at 0,8 mg/kg once daily, FLC (Diflucan ®; Vinci Farma, Madrid, Spain) and VRC (Vfend ® Pfizer S. A. Madrid. Spain) both administered orally (p.o.) at 25 mg/kg once daily by gavage. The doses were selected based on time-kill result and previous studies (Graybill, 2000; Andes & Ogtrop, 1999; Serena et al., 2007). Combined treatments consisting on AMB i.v + VRC p.o. were administered at the same concentration and schedule as when administered monotherapy. This combination was selected by the synergism and additive effect shown *in vitro* experiments. Control groups received no antifungal treatment. All treatments began 24 h after challenge and lasted for 7 days. To prevent bacterial infections, all animals received ceftazidime at 5

mg/kg subcutaneously once daily during the experimental period. From 3 days before infection until the end of the experiment mice treated with VRC was given 50% grapefruit juice instead of water (Sugar & Liu., 2000; Graybill et al., 2003). Animals were housed under standard conditions with food and water *ad libitum* and care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee.

#### Determination of drug levels and fungal load

Control and treated mice from the tissue burden study group, were anaesthetized by inhalation of sevoflurane (Sevorane; Abbott, Madrid, Spain) on day 8 post infection and 4 h after the last dose and 1 ml of blood from each mouse was extracted by cardiac puncture. Serum samples were obtained by centrifugation of the blood at 3500 rpm and were stored at -20 ° C until its use. Drug levels were determined by bioassay, as previously described (Cendejas-Bueno et al., 2012). Right after blood, animals were euthanized by cervical dislocation and liver, spleen, lungs, kidneys and brain of animals were aseptically removed and approximately one half of each organ was weighed and mechanically homogenized in 1 ml of sterile saline solution. Homogenates were serially diluted (1:10), placed onto PDA plates and incubated for 72 h at 30°C for fungal load calculation (CFU/g of tissue).



## Histopathology

For the histopathology study, the remaining of each organ was fixed with 10% buffered formaldehyde. Then samples were paraffin embedded and stained with hematoxylin-eosin (H-E), periodic acid-Shiff (PAS) stain and Grocott methenamine silver (GMS) and examined in blinded fashion by light microscopy.

## Statistical analysis

The mean survival time was estimated by Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. The tissue burden studies results were analyzed using the Mann-Whitney *U*-test and the bioassay data so that they could be analyzed by using *t* test by Graph Pad Prism 6.0 for Microsoft Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). A *P* value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

The *in vitro* susceptibility testing showed MICs of AMB and VRC of  $\leq 1$  and  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  respectively, against all strains. Higher variability on MIC values of FLC was found within the studied strains ranging from 2  $\mu\text{g/ml}$  to 64  $\mu\text{g/ml}$ . The *in vitro* interactions between AMB + VRC it resulted in synergism or addiction in the all strains studied. While, AMB + FLC showed indifference in the mostly strains tested (Table 1).

The results of survival studies are shown in Fig. 1. All control animals began to die between 6-9 days post infection achieving the 100% of mortality between 13-17 days postinfection. In all cases the three monotherapy significantly prolonged survival compared to the control groups ( $P \leq 0.05$ ). No differences were observed among monotherapies, with the exception of AMB for the IHEM 1296 strain which was

significantly more effective in prolonging survival than the other monotherapies ( $P \leq 0.047$ ). Using AMB plus VRC at day 30, the survival of the animals is prolonged to 100% with any the strains used, showing better results than control ( $P \leq 0.002$ ). However, show no significant differences with the monotherapies ( $P \geq 0.05$ ). Fungal load determination showed high fungal load in all organs studied ranging from 3.96 to 6.49 CFU/g without a clear affectation of one organ over the others. In addition, all organs were similarly affected independently of the strain. Fungal loads were significantly reduced in all animals infected with any strain and receiving AMB, VRC or FLC in comparison to the control groups in all organs studied ( $P \leq 0.045$ ) Interestingly, FLC showed higher efficacy in reducing burden in brain, than the other monotherapies with exception of strain IHEM 2740 which showed a MIC value of FLC as high as. The combination AMB + VRC resulted in a great reduction of fungal load in comparison to the control and to the monotherapies proved, resulting in a clearance of CFU/g in most cases of the *C. albicans* strains ( $P \leq 0.0162$ ).

Four hours after the end of the treatment serum levels of drug were all above the MIC values, with the exception FLC for *C. albicans* strains IHEM 2740 and IHEM 4786 (Table 2).

Infection by *C. albicans* and *C. laurentii* strains, the histological study showed tissue invasion without inflammatory response, with occasionally foci of hemorrhage in all organs studied. Spheroid structures measuring 3 to 8  $\mu\text{m}$  of diameter showing a small capsule or absence of it were recognized in all studied organs, it is more presence in lungs and spleen. In mice receiving the different monotherapies, it has been observed decrease in fungal cells and reduction in tissue invasion without foci of hemorrhage in organs studied. The use of AMB + VRC resulted in the absence of fungal cells and damage in all organs studied (Figure 3).

## DISCUSSION

Antifungal therapies to treat infection by non-*neoformans* *Cryptococcus* species are limited to date due to small number of empirically treated cases and lack of controlled trial data. Although toxicity, AMB with or without 5-FC are used to treat these infections. Also, FLC after of assessing the susceptibility. The newer azoles such as VRC and PSC, have been proved active and effective against *C. albidus* and *C. laurentii*. However, clinical experience with these drugs is scare.

In this study, AMB and VRC showed low MICs against all the isolated tested, being these results similar to those published by other authors, who pointed AMB as the most active drug (Serena et al., 2004; Bernal-Martínez et al., 2010; Teodoro et al., 2013). High MIC of FLC was obtained being similar to previous published data (García-Martos et al., 2002; Serena et al., 2004).

The interaction study, consisting on AMB plus VRC shown synergism or additive effect in all studied strains. While, AMB plus FLC shown indifference in the mostly strains tested. Previously, other authors have obtained similar results using combination of AMB + FLC or AMB + VRC against *C. neoformans* and *Sarocladium kiliense* respectively (Barchiesi et al., 2000; Fernández-Silva et al., 2014). Although others reports, have pointed out that the use of AMB and azoles are a still a controversial issue for the potential antagonism showed *in vitro* studies (Sugar, 1995; Barchiesi et al., 2000).

The *in vitro* results were confirmed by studying the effects of AMB + VRC therapy in a murine model of systemic infection caused by *C. albidus* and *C. laurentii*. These studies showed that combination therapy was more effective than AMB, FLC or VRC used in monotherapy. Our data agree with those previously reported by Serena et al and Gazzoni et al, in these studies, tested the efficacy of AMB and VRC in murine model of CNS

infection caused by *C. neoformans*, showing reduced fungal load in the brain after treatment with these drugs (Serena et al, 2007; Gazzoni et al, 2012). While, Silva et al demonstrated the effectiveness of this combination in a model of pulmonary infection caused by *C. neoformans* (Silva et al., 2012). To date, exist few clinical data available on the interaction between antifungal compounds, with exception of AMB plus 5-FC or FLC used in combination for the treatment of severe systemic mycoses caused by *Cryptococcus* sp (Saag et al., 2000; Catalán & Montejo, 2006; Perfect et al., 2010; Loyse et al., 2012) or *C. albidus* and *laurentii* (Saag et al., 2000; Cheng et al., 2001; Perfect et al., 2010; Gulló et al., 2013; Kulkarni et al ., 2012; Banerjee et al., 2013; Conti et al., 2015). It is interesting to explore new antifungal therapies against systemic infections caused by these species of fungi.

Considering the promising results obtained with AMB+VRC in improving survival, reducing the fungal load and histopathological features, deserve be considered a therapeutic approach in patients with systemic infection caused by *C. albidus* and *C. laurentii*.

## REFERENCES

1. Andes D, Ogtrop M. Characterization and quantitation of the pharmacodynamics of fluconazole in a neutropenic murine disseminated candidiasis infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**: 2116-20.
2. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; European Confederation of Medical Mycology. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect.* 2014; **20**: 76-98.
3. Averbuch D, Boekhout T, Falk R, Engelhard D, Shapiro M, Block C, Polacheck I. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. *Med Mycol.* 2002; **40**: 275-278.
4. Banerjee P, Haider M, Trehan V, Mishra B, Thakur A, Dogra V, Loomba P. *Cryptococcus laurentii* fungemia. *Indian J Med Microbiol.* 2013; **31**: 75-77.
5. Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani S, Giannini D, Arzeni D, Di Cesare S, Di Francesco LF, Fortuna M, Giacometti A, Carle F, Mazzei T, Scalise G. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; **44**: 2435-2441.

6. Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Castelli M, Mesa-Arango A, Zaragoza O, Rodriguez-Tudela J Manuel Cuenca-Estrella M. Susceptibility profile of clinical isolates of non-*Cryptococcus neoformans*/ non-*Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. 2000; **48**: 90-96.
  
7. Catalan M, Montejo J C. Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. Rev Iberoam Micol. 2006; **23**: 39-49.
  
8. Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. Clin Microbiol Infect. 2012; **18**:1229-1235.
  
9. Cheng M F, Chiou C C, Liu Y C, Wang H Z, Hsieh K S. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. J Clin Microbiol. 2001; **39**: 1608-1611.
  
10. Chiller T M, Capilla J, Sobel R A, Farrokhshad K, Clemons K V, Stevens D A. Development of a murine model of cerebral aspergillosis. J. Infect. Dis. 2002; **186**: 574-577.

11. Cleveland K, Gelfand M, Rao V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to *Cryptococcus albidus* in a liver transplant recipient. Q J Med. 2013; **106**: 361-362.
  
12. Conti F, Spinelli FR, Colafrancesco S, Truglia S, Ceccarelli F, Fattapposta F, Sorice M, Capozzi A, Ferretti G, Priori R, Martinelli F, Pirone C, Alessandri C, Valesini G. Acute longitudinal myelitis following *Cryptococcus laurentii* pneumonia in a patient with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2015; **24**:94-7.
  
13. De Bernardis F, Palliola E, Lorenzini R, Antonucci G. Evaluation of the experimental pathogenicity of some *Cryptococcus* species in normal and cyclophosphamide-immunodepressed mice. Microbiol Immunol. 1987; **31** : 449-460.
  
14. Fernández-Silva F, Capilla J, Mayayo E, Sutton D, Guarro J. Combination therapy in the treatment of experimental invasive fungal infection by *Sarocladium (Acremonium) kiliense*. Int J Antimicrob Agents. 2014; **44**:136-139.
  
15. García-Martos P, Noval JF, García-Tapia A, Marín P, Puerto JL, Sepúlveda A. Susceptibility to antifungal agents of *Cryptococcus* species of clinical interest. Med Clin (Barc). 2002; **119**: 211-213.
  
16. Graybill J. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. Drug Resistance Updated. 2000; **3**: 364-383.

17. Graybill J R, Najvar L K, Gonzalez G M, Hernandez S, Bocanegra R. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *J Antimicrob Chemother.* 2003; **51**:1373-1376.
18. Gazzoni AF, Capilla J, Mayayo E, Guarro J. Efficacy of intrathecal administration of liposomal amphotericin B combined with voriconazole in a murine model of cryptococcal meningitis. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; **39**:223-7.
19. -Gullo FP, Rossi SA, Sardi Jde C, Teodoro VL, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; **32**: 1377-1379.
20. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; **48**:693-715.
21. Klawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy L M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection.* 2007; **35**: 51-58.
22. Kulkarni A, Sinha M, Anandh U. Primary cutaneous *Cryptococcus laurentii* in a renal transplant recipient. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2012; **23**: 102-105.
23. Kuklinska F, Naumnik B, Mysliwiec M. Fungemia due to *Cryptococcus laurentii* as a complication of immunosuppressive therapy- a case report. *Adv Med Sci.* 2009; **54**: 116-119.



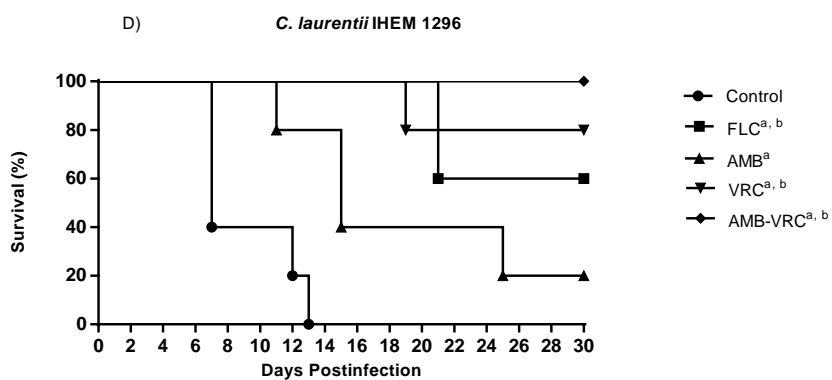
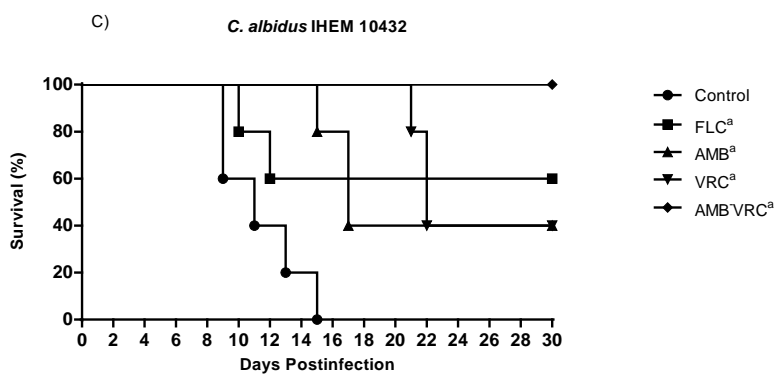
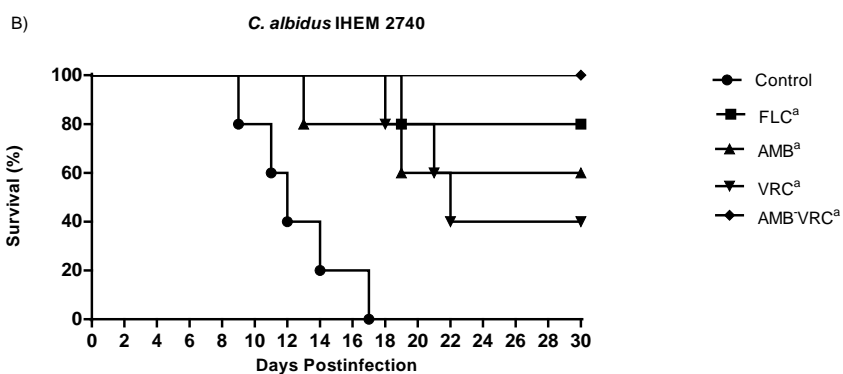
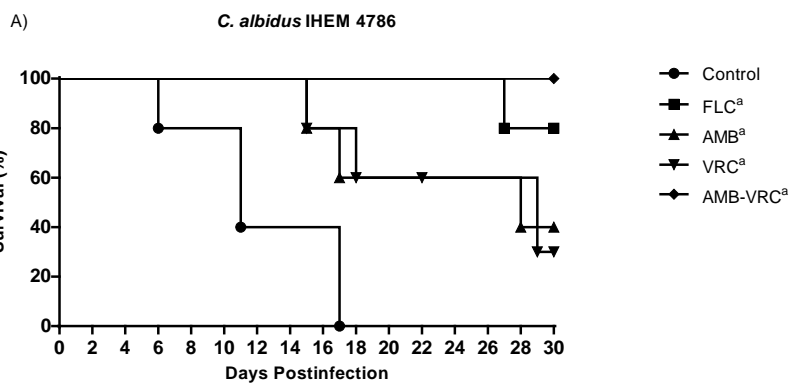
24. Loyse A, Wilson D, Meintjes G, Jarvis JN, Bicanic T, Bishop L, Rebe K, Williams A, Jaffar S, Bekker LG, Wood R, Harrison TS. Comparison of the early fungicidal activity of high-dose fluconazole, voriconazole, and flucytosine as second-line drugs given in combination with amphotericin B for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis*. 2012; **54**: 121-128.
25. Liu Y, Ma S, Wang X, Xu W, Tang X. *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV- patient and literature review. *Med Mycol. Case Reports*. 2014; **3**: 8-10.
26. Mendes FE, Oliveira LV, Faria ES, Albarenga DG, Pinto MR, Taborda CP, Soares BM, Cisalpino PS, Santos DA. Correlation of the *in vitro* antifungal drug susceptibility with the *in vivo* activity of fluconazole in a murine model of cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; **29**: 1525-1532.
27. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*. 2011; **11**: 142–151
28. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3.

29. Pedroso RS, Ferreira JC, Lavrador MA, Maffei CM, Candido RC. Evaluation of the experimental inoculation of *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii* in normal mice: virulence factors and molecular profile before and after animal passage. *Mycopathologia*. 2009; **168**: 59-72.
30. Perfect J R, Dismukes W E, Dromer F, Goldman D L, Graybill J R, Hamill R J, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clin Inf Dis*. 2010; **50**: 291-322.
31. Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, and Dismukes WE. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin. Infect. Dis*. 2000; **30**: 710–718.
32. Sar B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou JL, Buisson Y. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; **54**: 563-565.
33. Serena C, Pastor F, Ortoneda M, Capilla J, Nolard N, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of uncommon basidiosmycetous yeast. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; **48**: 2724-2726.

34. Serena C, Pastor FJ, Mariné M, Rodríguez MM, Guarro J. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. *J. Antimicrob Chemother.* 2007; **60**: 162-165.
35. Silva EG, Paula CR, Assis BF, Gambale W. Voriconazole combined with amphotericin B, in the treatment for pulmonary cryptococcosis caused by *C. neoformans* (serotype A) in mice with severe combined immunodeficiency (SCDI). *Mycopathologia.* 2012; **173**: 445-449.
36. Sugar AM. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing?. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; **39**: 1907–1912.
37. Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med Mycol.* 2000; **38**: 209-212.
38. Teodoro V, Gullo P, Sardi J, Torres E, Fusco-Almeida A, Mendes-Giannini. Environmental isolation, biochemical identification and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; **46**:759-764.

Table 1. *In vitro* antifungal activity of antifungal drugs and their interactions against clinical isolated of *C. albidus* and *C. laurentii*

Species and isolated	MIC (µg/ml)			FICI for AMB-VRC	MIC (µg/ml)		FICI for AMB-FLC
	AMB	VRC	AMB-VRC		FLC	AMB-FLC	
<i>C. albidus</i>							
IHEM 4786	0.5	0.5	0.125/0.125	0.5	16	0.125/8	2.25
IHEM 2740	0.25	0.25	0.03/0.125	0.62	64	0.25/32	1.52
IHEM 10432	0.25	2	0.03/0.125	0.18	16	0.125/8	1
<i>C. laurentii</i>							
IHEM 1296	0.5	1	0.125/0.125	0.5	2	0.03/2	1.06
FMR 8123	0.25	0.25	0.03/0.125	0.62	16	0.03/8	2.12



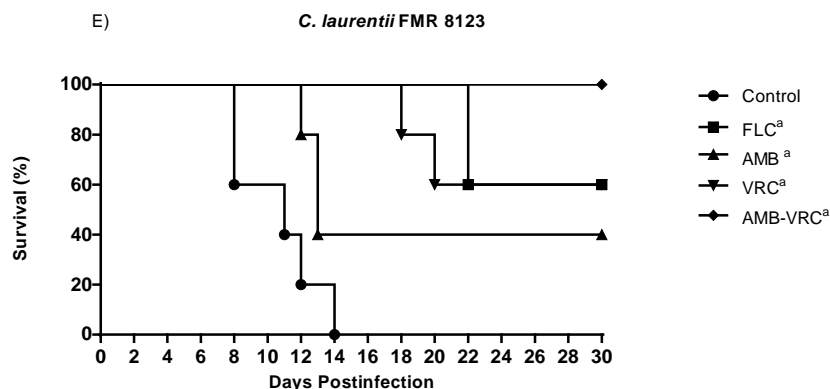
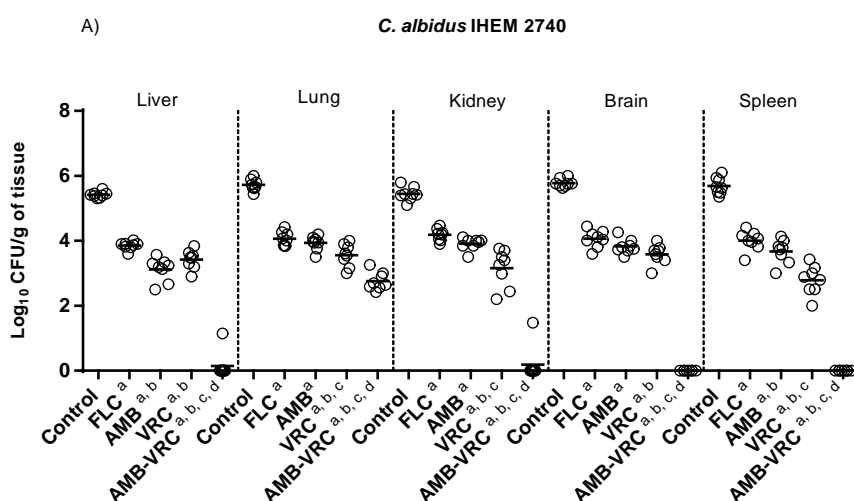
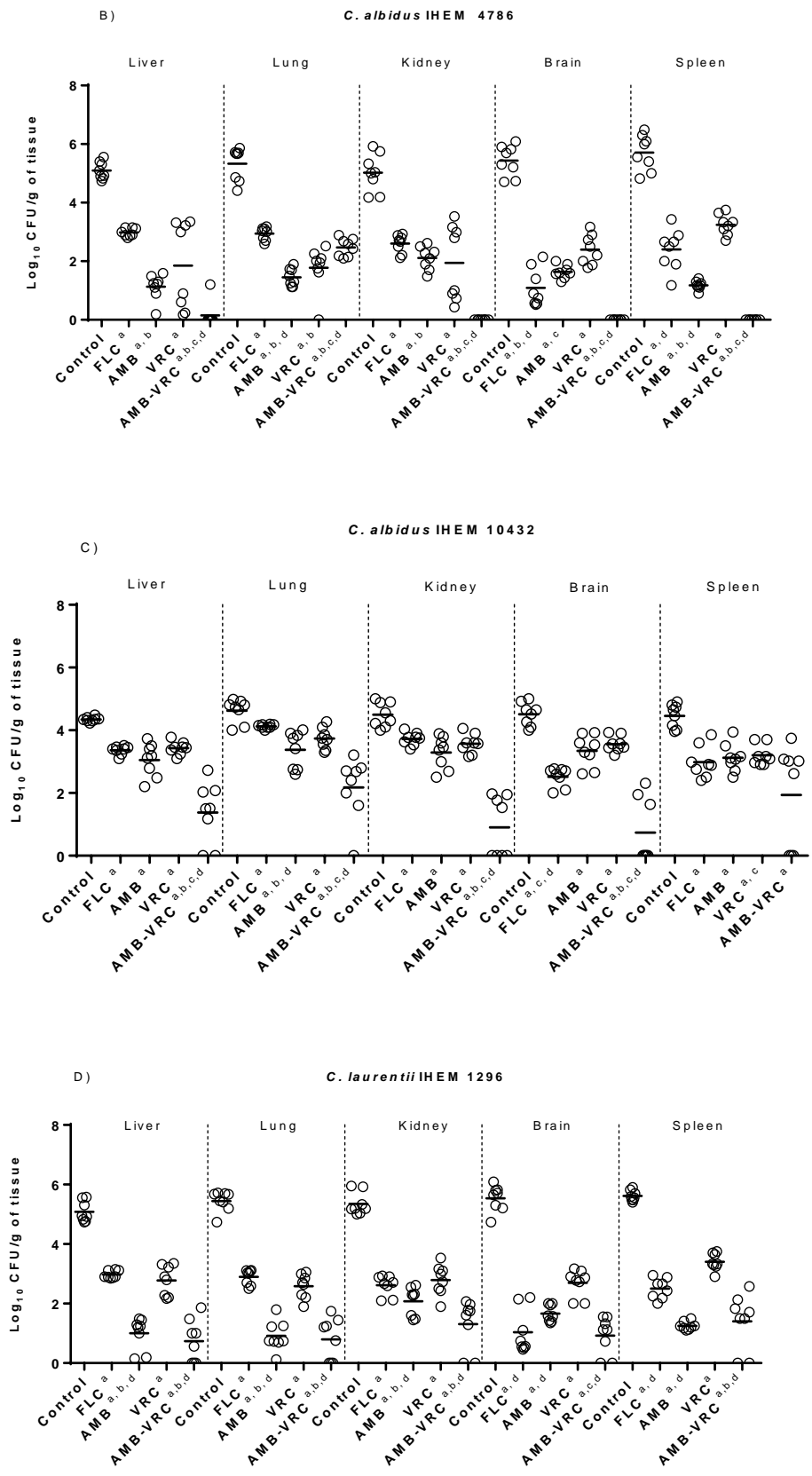


Figure 1. Percentage of survival of neutropenic mice infected intravenously (i.v.) with  $5 \times 10^7$  colony-forming units (CFU) of *C. albicans* IHEM 2740, IHEM 4786 and IHEM 1432 (A, B and C, respectively) and *C. laurentii* IHEM 1296 and FMR 8123 (D and E, respectively). One day post infection and for 7 days, animals received fluconazole (FLC) at 25 mg/kg; amphotericin B (AMB) at 0.8 mg/kg; voriconazole (VRC) at 25 mg/kg or AMB+VRC. All treatments were administered once daily and control animals received no treatment <sup>a</sup>.  $P \leq 0,05$  versus control; <sup>b</sup>  $P \leq 0,05$  versus FLC; <sup>c</sup>  $P \leq 0,05$  versus AMB; <sup>d</sup>  $P \leq 0,05$  versus VRC; <sup>e</sup>  $P \leq 0,05$  versus AMB+VRC.





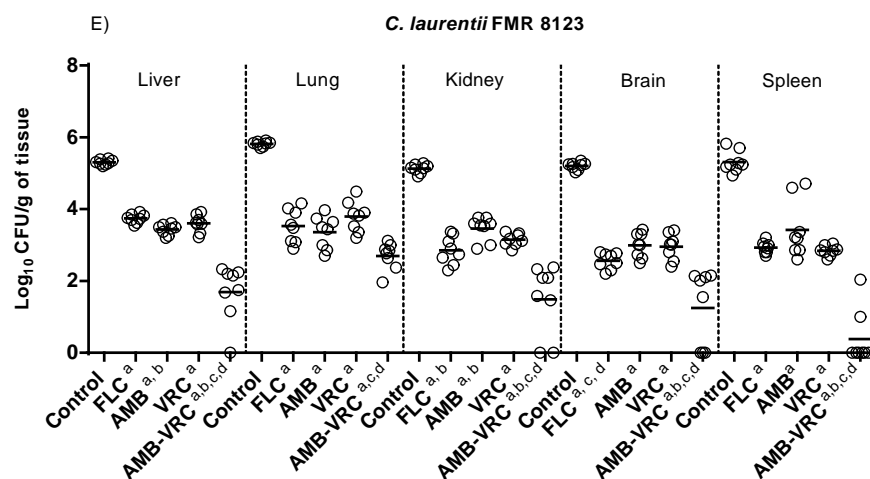


Figure 2. Effects of antifungal treatment on colony counts of neutropenic mice infected with  $5 \times 10^7$  CFU of *C. albicans* IHEM 2740, IHEM 4786 and IHEM 10432 (A, B and C, respectively) and *C. laurentii* IHEM 1296 and FMR 8123 (D and E, respectively). The animals were treated for 7 days with fluconazole (FLC) at 25 mg/kg; amphotericin B (AMB) at 0.8 mg/kg; voriconazole (VRC) at 25 mg/kg or AMB+VRC. All treatments were administered once daily and control animals received no treatment <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  versus control; <sup>b</sup>  $P \leq 0,05$  versus FLC; <sup>c</sup>  $P \leq 0,05$  versus AMB; <sup>d</sup>  $P \leq 0,05$  versus VRC.



**Table 2. The drug levels in serum ( $\mu\text{g/ml}$ ) measured by bioassay on day 8 post infection and 4 h after final dosing. Results are expressed as the means  $\pm$  standard deviation.**

	AMB	VRC	FLC
<i>C. albidus</i> IHEM 2740	2.70 $\pm$ 0.90	7.51 $\pm$ 1.36	21.55 $\pm$ 4.07
<i>C. albidus</i> IHEM 4786	2.09 $\pm$ 0.47	8.05 $\pm$ 1.05	15.83 $\pm$ 1.16
<i>C. albidus</i> IHEM 10432	2.74 $\pm$ 0.50	8.60 $\pm$ 0.72	16.58 $\pm$ 0.89
<i>C. laurentii</i> IHEM 1296	2.48 $\pm$ 0.96	8.27 $\pm$ 1.08	16.67 $\pm$ 1.21
<i>C. laurentii</i> FMR 8123	2.37 $\pm$ 0.75	8.49 $\pm$ 0.82	18.83 $\pm$ 3.318

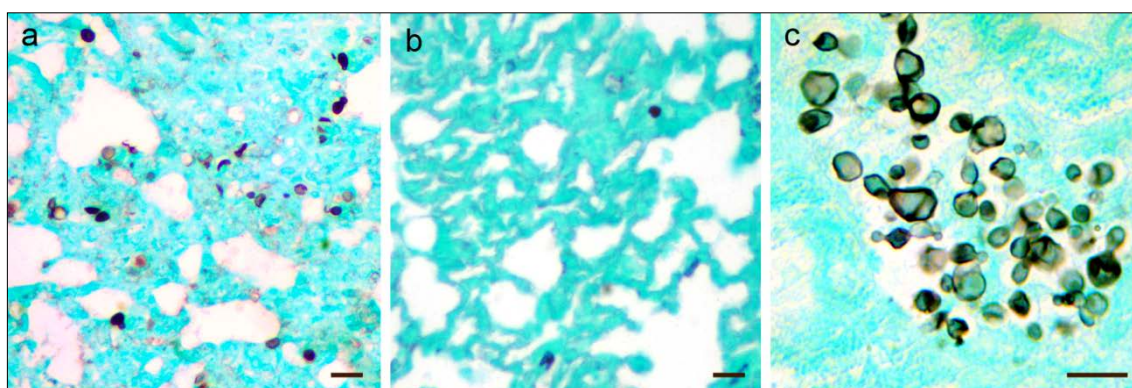


Figure 3: Histological findings in lung of immunosuppressed mice infected with *C. albidus*, 8 days post-infection **(A)** Lung section correspond to control mice showed tissue invasion without inflammatory response, with spheroid structure with a small capsule or absence of it there **(B)** Animals treated with VRC, showing decrease in fungal cells and reduction in tissue invasion without foci of hemorrhage; representative figurehead of the three monotherapies **(C)** Unusual microscopic forms and nonencapsulated fungal cells are observed in tissue of infected animals. A-B-C stain GMS. A-B x200 and C x630.

**Antifungal susceptibility, virulence and antifungal therapy of *Rhodotorula mucilaginosa* in a murine model of disseminated infection.**

Pamela Thomson <sup>1</sup>, Javier Capilla <sup>1</sup>, Josep Guarro <sup>1\*</sup>

Unitat de Microbiologia<sup>1</sup>, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, IISPV Reus, Tarragona, Spain

\*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.

## Abstract

*Rhodotorula mucilaginosa* is an emergent fungal pathogens able of causing invasive infection, primarily fungaemia. This infection is more frequent in immunosuppressed patients when using a central venous catheter. Amphotericin B is antifungal drug recommended to treat such infections, but its renal toxicity limits its use, VRC and PSC are drugs commonly used in clinic and have proven effective against others basidiomycetous yeast. We have evaluated the *in vitro* activity of different drugs against *R. mucilaginosa* using broth microdilution method; and developed a murine model of disseminated infection to evaluate the virulence of this fungus. The mice were challenger intravenously with four different inocula ( $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2.5 \times 10^7$  or  $5 \times 10^7$ CFU/animal). Later, the inoculum  $2.5 \times 10^7$  was selected for proven the efficacy of amphotericin at 0.8 mg/kg, voriconazole 25 mg/kg per day or posaconazole 20 mg/kg twice day. The control animals showed high fungal loads in all studied organs. In all cases, brain was the most affected ( $P \leq 0.05$ ). All treatment used, showed efficacy in reducing tissue independently of the infective strains.

**Keywords:** virulence, antifungal, susceptibility, therapy, *Rhodotorula mucilaginosa*.

## Introduction

*Rhodotorula* spp. is a common environmental basidiomycetous yeast usually found in air, soil, continental and ocean-water, milk and fruit juices; characterized by production of carotenoid pigments and somatic growth with the production of multilateral budding cells and rudimentary pseudohyphae (Tuon and Costa, 2008). The genus contains about 46 species three of them; *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* and *R. minuta* have been related to human infections [De Almeida et al., 2008; Miceli et al., 2011; Wirth et al., 2012]. *R. mucilaginosa* is the most prevalent species within the genus and has been recognized as an emerging pathogen in the last two decades especially among immunocompromised patients, where fungemia, endocarditis, peritonitis and meningitis are the most common clinical manifestations. [Braun and Kauffman et al., 1992; Lo Re V et al., 2003; Tuon et al., 2007; Tuon and Costa., 2008; Chitasombat et al., 2012; Forés et al., 2012; Ramos et al., 2012; Wirth and Goldoni., 2012; Mohd et al., 2015]. In immunocompromised patients showing fungemia the mortality achieve 14.4% [Krcmery et al., 1999; Tuon and Costa., 2008]. In immunocompetent patients non-systemic *Rhodotorula* infections such as endophthalmitis and onychomycosis have been reported [Pernioloa R et al., 2006; Wirth and Goldoni., 2012] and recently it reported an case of fungemia in immunocompetent patient [Pereira el al., 2015]

Due the scarce clinical experience in the management of infections by *Rhodotorula* spp. no therapeutically recommendations have been established. *In vitro* studies have demonstrated the activity of amphotericin B (AMB) and 5-flucytosine (5-FC), while intrinsically resistance to fluconazole (FLC) and echinocandins such as caspofungin have been reported during their clinical use [Barchiesi et al., 2000; Preney et al., 2003; Zaas et al., 2003; Serena et al., 2004; Pfaller et al., 2004; Gómez-lopez et al., 2005; Nunez et al., 2013]. In addition, the preferred treatment of choice consisting on AMB not fully

satisfactory with a reported overall of 13.8% mortality [Lunardi et al., 2006; Tuon et al., 2008; Kim et al., 2013; Simon et al., 2014].

The *in vitro* studies carried on with triazoles such as itraconazole (ITC) and voriconazole (VRC) have shown a variable activity [Barchiesi et al., 2000; Diekema et al., 2005; Gomez-Lopez et al 2005; Ramos et al., 2012]. Thus, the role of the triazoles is uncertain and require additional data [Tuon and Costa., 2008; Ramos et al., 2012]. In front of the challenge in the treatment of *Rhodotorula* infections, therapeutic alternatives should be explored. VRC and posaconazole (PSC) are drugs commonly used in the antifungal therapy and have proven effective against variety of fungal species such are *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *Apophysomyces variabilis*, *Sarocladium kiliense*, *Aspergillus fumigatus* or *Candida lusitaniae* among others [Mavrogiorgos et al., 2006; Calvo et al., 2010; Salas et al., 2012; Fernández-Silva et al., 2014; Forastiero et al., 2015; Sanchis et al., 2015].

The aim of this study was to evaluate the virulence of four strains of *R. mucilaginosa*, to determine the *in vitro* activity of AMB, VRC and PSC and their efficacies in neutropenic mouse models of disseminated infection by *R. mucilaginosa*.

## Material and Methods

**Strains.** Four clinical strains of *R. mucilaginosa* were included in this study, three obtained from human blood cultures (IHEM 18459, IHEM 20182 and IHEM 22043), and one from nail (IHEM 1698). The identification was confirmed by comparing the sequences of large-sub unit ribosomal RNA gene of the used strains with these from the type species. The fungal isolates were stored lyophilized and were subcultured twice on potato dextrosa agar (PDA) at 35°C for 48 hours.

**In vitro studies.** AMB (Sigma Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain), ITC (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), FLC (Pfizer S.A., Madrid, Spain), PSC (Schering-Plough Res., Inst., NJ, EUA), VRC (Pfizer S.A., Madrid, Spain), anidulafungin (AFG) (Pfizer S.A., Madrid, Spain), CFG (Merk & Co., Inc., Rahway, EUA), micafungin (MFG) (Astellas Pharma, Madrid, Spain) and 5-FC (Sigma Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain) obtained as pure powder were tested against 4 isolates of *R. mucilaginosa*, following the reference microdilution broth method according to the document M 27-A3 [CLSI, 2008]. Minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest drug concentration that produced 100% inhibition of visible fungal growth in the case of AMB or  $\geq 50\%$  in case of 5-FC, azoles and echinocandins following 48 h of incubation at 35°C. The ranged of serial dilutions used were 64-0.125  $\mu\text{g/ml}$  for FLC and 0.03 to 16  $\mu\text{g/ml}$  for the other antifungal drugs [CLSI, 2008].

According to the results of our *in vitro* studies; AMB, VRC and PSC were selected for time-kill studies for their high activity against this drug. Time kill curves were performed as previously described [Klepser et al., 1997; Cantón et al., 2008], in brief, two-fold serial dilutions of each drug ranged from 32 to 0.06  $\mu\text{g/ml}$  were used. At predetermined time

points (0, 8, 24 and 48 h) aliquots of 100 µl were removed, serially diluted in sterile water, placed onto PDA plates and incubated at 35°C for 24-48 h in order to determine CFU/ml. This procedure allowed a limit of detection of 33 CFU/ ml. All assays were carried out in duplicate and the geometric mean and standard deviation were calculated. A reduction on CFU counts of  $\geq 99.9\%$  or  $3 \log_{10}$  compared to the starting inoculum was considered indicative of fungicidal activity, while a CFU count reduction of  $< 99.9\%$  was considered fungistatic (Cantón et al., 2008).

**In vivo studies.** Four-week-old male OF1 mice weighing 28-30 g (Charles River; Criffa SA, Barcelona, Spain) were used. All mice were immunosuppressed by intraperitoneal administration of a single dose of 200 mg/kg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk SA, Barcelona, Spain) beginning 2 days prior to the infection and then every 5 days until the end of the experiment [Chiller et al., 2002].

To determine the virulence of each strain, groups of eight mice were inoculated intravenously (i.v.) via the lateral tail vein with  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2.5 \times 10^7$  or  $5 \times 10^7$  colony forming units (CFU) per animal in 0.2 ml of sterile saline solution. For efficacy studies, 16 groups of animals consisting on 13 mice/group, i.e., 5 for survival and 8 for tissue burden studies were inoculated i.v. with a viable suspension of each isolated consisting on  $2.5 \times 10^7$  CFU. This inoculum was chosen from the virulence study since it was the inoculum size able to cause an acute infection in mice.

Based on our results of *in vitro* studies and the clinical experience, AMB (Farmacia Xalabarder, Barcelona, Spain) administered i.v at 0.8 mg/kg once daily (QD), VRC (Vfend ® Pfizer S. A. Madrid. Spain) at 25 mg/kg given orally by gavage QD and PSC (Noxafil ® Merck Sharp Dohme Ltda, España) at 20 mg/kg given orally by gavage twice a day (BID). The doses were selected based on previous time-kill and pharmacokinetic

studies [Graybill et al., 2000; Andes et al., 2004; Serena et al 2007; Salas et al., 2012]. From 3 days before infection until the end of the experiment mice treated with VRC were given grapefruit juice instead of water [Sugar & Liu., 2000; Graybill et al., 2003]. All treatments began 24 h after challenge and lasted for 7 days. Control groups received no antifungal treatment. The efficacy of the drugs was evaluated by prolongation of survival and reduction of tissue burden. Animals were housed under standard conditions and care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee.

**Determination of serum drug levels and tissue burden.** Control and treated mice from the tissue burden study group (n=192), were anaesthetized by inhalation with sevoflurane (Sevorane; Abbott, Madrid, Spain) on day 8 post infection and 6 h after the last dose was administered. One millilitre of blood from each mouse was extracted by cardiac puncture. Animals were then euthanased by cervical dislocation. Serum samples were obtained by centrifugation of the blood at 3500 rpm and were stored at -20 ° C until its use. Drug levels were determined by bioassay, as previously described [Cendejas-Bueno et al., 2012; Tonini et al., 2015]. Liver, spleen, lungs, kidneys and brain of animals were aseptically removed and approximately one half of each organ was weighed and mechanically homogenized in 1 ml of sterile saline solution. Homogenates were serially diluted (1:10), placed onto PDA plates and incubated for 48 h at 35°C for fungal load calculation (CFU/g of tissue).

**Statistical analysis.** The mean survival times were estimated by Kaplan-Meier method and compared among groups using the log rank test. Results from the tissue burden studies were analysed using the Mann-Whitney *U*-test by Graph Pad Prism 6.0 for



Microsoft Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). A *P* value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

The *in vitro* susceptibility study shown good activity for 5-FC ( $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ ), AMB ( $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ ), VRC ( $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ ) and PSC ( $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ ) against all strains assayed. Our data confirm that FLC and echinocandins; especially anidulafungin, does not have *in vitro* activity against *R. mucilaginosa* (Table 1).

The time-killing assay shown fungicide activity of AMB at  $32 \mu\text{g/ml}$  48 hours after incubation (Fig. 1). VRC and PSC showed fungistatic activity, with decreases  $\leq 0.73 \log_{10}$  and  $\leq 0.97 \log_{10}$  CFU/ml respectively, at  $32 \mu\text{g/ml}$  and 48 h after incubation (Fig. 2 and 3).

The virulence study, showed an inoculum-dependant response with survival ranged from 17.25 to 20.38 days after infection at low inoculum ( $5 \times 10^6$ ) and from 10.25 to 15.63 days at high inoculum ( $5 \times 10^7$ ).

Similarly, fungal loads recovered from tissues also showed an inoculum-dependent response with lower inoculum showing fungal loads ranged from  $\log_{10} 3.88$  to  $\log_{10} 6.32$  CFU/g and from  $\log_{10} 6.18$  to  $8.07$  CFU/g in all organs in the studied tissues when higher inoculum was used. Although several organs have been studied no tissue tropism has been clearly determined, with all organs affected after infection with any strain at any inoculum size. Interestingly, the experimental infection caused an important brain involvement (Table 3).

The efficacy study, showed no improvement on survival of those animals receiving any treatment in comparison to the corresponding control group; with exception of VRC

against IHEM 18459 and IHEM 22043 strains ( $P \leq 0.0126$ ) and PSC against IHEM strain 20182 ( $P \leq 0.0495$ ).

The figure 3 shows the results of fungal burden. On day 8 postinfection, untreated animals infected with any *R. mucilaginosa* strains showed high fungal loads in all studied organs ranging from  $\log_{10}$  4.20 to 7.98 CFU/g of tissue. In all cases, brain was the most affected organ ranging from  $\log_{10}$  5.29-7.98 CFU/g tissue. All treatment used, showed efficacy in reducing tissue burden from organs in comparison with the control group independently of the infective strains ( $P \leq 0.05$ ). Six hours after the end of the treatment with AMB 0.8, VRC 25 or PSC 20 mg/kg, serum levels of the drugs were all above the MIC values (Table 4).

## **DISCUSSION**

Currently, *R. mucilaginosa* is considered an emerging pathogen affecting principally immunosuppressed patients. The fungemia associated with catheters, endocarditis, peritonitis, meningitis and endophthalmitis are the most common presentation (Tuon & Costa., 2008). Despite the susceptibility of this species and the established treatments mainly with AMB, the mortality is about 14% in patients with fungemia. Although no prospective studies, AMB is considered to be the treatment of choice however, the nephrotoxicity and the high failure of AMB-based treatment, other therapeutic options should be explored.

In the present study, 5-FC and AMB were the most active drugs followed by VRC and PSC, being these results in agreement with those previously published by other authors [Preney et al., 2003; Zaas et al., 2003; Diekema et al., 2005; Pfaller et al., 2004; Gomez-Lopez et al., 2005; Nunes et al., 2013]. AMB has been used in the treatment of invasive *Rhodotorula* infections alone or in combination with 5-FC however their demonstrated

toxics effects limits their use Lunardi et al ., 2006; Tuon et al ., 2008; Kim et al., 2013; Simon et al ., 2014], FLC and echinocandins were inactive against *R. mucilaginosa* [Barchiesi et al., 2000; Preney et al., 2003; Zaas et al., 2003; Serena et al., 2004; Pfaller et al., 2004; Gómez-lopez et al., 2005; Nunez et al., 2013] being consistent with previous studies performed with *R. mucilaginosa* as well as with members of the family *Cryptococcaceae* family such as *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra* or *Trichosporon beigeli* [Espinel-Ingroff., 1998; Zaas et al., 2003; Pfaller et al., 2004].

The modelled infection in mice showed spread of the fungus to all organs studied with high fungal loads in an inoculum-dependant way. The virulence study has demonstrated the ability of *R. mucilaginosa* to cross the blood- brain barrier. This explains the CNS affection in cases of fungemia after dissemination of *R. mucilaginosa* [Capoor et al., 2014; Tsiodras et al., 2014; Mohd et al., 2015]. Contrary to our results, previous experiments carried out in rats showed liver the most affected organ [Wirth and Goldani, 2011]. However, in this study they did not analyse the brain [Toun & Costa, 2008]. So, our animal model reproduces better what happens in clinical.

In all cases the three therapies used were effective, without one drug showing clear efficacy over the others, this were observed in the fungal burden the animals in comparison with the control group. Although there are no previous studies of infection *in vivo* those evaluate the effectiveness of AMB, VRC or PSC against *R. mucilaginosa* if any against other Basidiomycetous yeast, where demonstrated the effectiveness of these drugs [Mavrogiorgos et al., 2006; Calvo et al., 2010]. Voriconazole alone or associated with AMB-liposomal has been used successfully in patients with fungemia caused by *Rhodotorula* spp, however the clinical information on the use of these drugs is limited and together to posaconazole required the future investigations [Riedel et al., 2008; Forés et al., 2012].

In summary, our study has shown the high level of *in vitro* activity for AMB, 5FC, VRC and PSC against *R. mucilaginosa* and demonstrated that AMB, VRC and PSC were experimentally effective in the treatment of an invasive infection by *R. mucilaginosa* in a neutropenic murine model. Contributing to evaluate the efficacy of this drug against clinical isolated of *R. mucilaginosa*, but additional clinical experience is needed.

## References

1. Andes D, Marchillo K, Conklin R, Gopal K, Farkad E, Cacciapuoti A, Loebenberg D. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole in a murine model disseminated candidiasis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2004; 48: 137-141.
2. Barchiesi F, Arzeni D, Fothergill A, Di Francesco L, Caselli F, Rinaldi M, Scalise G. *In vitro* activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens. *Antimicrob Agens Chemother.* 2000; 44: 226–229.
3. Braun DK, Kauffman CA. *Rhodotorula* fungaemia: a life-threatening complication of indwelling central venous catheters. *Mycoses.* 1992; 35:305-308.
4. Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM, Pujol I, Guarro J., Antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:4074-4077.
5. Cantón E, Pemán J, Valentín A, Bosch A, Espinel-Ingroff A, Gobernado A. Comparison of posaconazole and voriconazole *in vitro* killing against *Candida krusei*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 62: 177–181.
6. Capoor MR, Aggarwal S, Raghvan C, Gupta DK, Jain AK, Chaudhary R. Clinical and microbiological characteristics of *Rhodotorula mucilaginosa* infections in a tertiary-care facility. *Indian J Med Microbiol.* 2014; 32: 304-309.

7. Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Quindós G, Marcos-Arias C, Eraso E, Cárdenes D, Ortiz-Maestro O, Santos P, Estivill D, Guardia C, Giusiano G. Antifungal activity of posaconazole against *Candida* spp. and non-*Candida* clinical yeasts isolates. *Rev Esp Quimioter.* 2010; 23:122-125.
8. Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18:1229-1235.
9. Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect* 2012; 64: 68–75.
10. De Almeida GM, Costa SF, Melhem M, Motta AL, Szeszs MW, Miyashita F, Pierrotti LC, Rossi F, Burattini MN. *Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. *Med Mycol.* 2008; 46:547-556.
11. Espinel-Ingroff A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2950-2956.

12. Diekema D, Petroelje B, Messer S A, Hollis R J, Pfaller M A. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species J Clin Microbiol. 2005; 43: 476-478.
13. Fernández-Silva F, Capilla J, Mayayo E, Sutton D, Guarro J. Combination therapy in the treatment of experimental invasive fungal infection by *Sarocladium (Acremonium) kiliense*. Int J Antimicrob Agents. 2014; 44: 136-139.
14. Forastiero A, Bernal-Martínez L, Mellado E, Cendejas E, Gomez-Lopez A. *In vivo* efficacy of voriconazole and posaconazole therapy in a novel invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection. Int J Antimicrob Agents. 2015; 46: 511-517.
15. Forés R, Ramos A, Orden B, de Laiglesia A, Bautista G, Cabero M, Muñoz E, Sánchez-Romero I, Navarro B, Bravo J, Cabrera R. *Rhodotorula* species fungaemia causes low mortality in hematopoietic stem-cell transplantation. A case report and review. Mycoses. 2012; 55: 158-162.
16. Graybill J R, Najvar L K, Gonzalez G M, Hernandez S, Bocanegra R. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. J Antimicrob Chemother. 2003; 51:1373-1376
17. Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. J Antimicrob Chemother. 2005; 55: 312-316.

18. Kim HA, Hyun M, Ryu SY. Catheter-Associated *Rhodotorula mucilaginosa* Fungemia in an immunocompetent host. *Infect Chemother.* 2013; 45: 339-342.
19. Kremery V, Krupova I, Denning DW. Invasive yeast infections other than *Candida spp.* in acute leukaemia. *J Hosp Infect.* 1999; 41:181-194.
20. Lo Re V, Fishman NO, Nachamkin I. Recurrent catheter-related *Rhodotorula rubra* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 897-900.
21. Lunardi LW, Aquino VR, Zimmerman RA, Goldani LZ. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 60-63.
22. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11: 142-51.
23. Nunes JM, Bizerra FC, Ferreira RC, Colombo AL. 2013. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 382-389.
24. Perniola R, Faneschi *Rhodotorula mucilaginosa* ML, Manso E, Pizzolante M, Rizzo A, Sticchi Damiani A, Longo R. Outbreak in neonatal intensive care unit:



microbiological features, clinical presentation, and analysis of related variables.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006; 25: 193-196.

25. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4419-4431.
  
26. Pereira C, Ribeiro S, Lopes V, Mendonça T. *Rhodotorula mucilaginosa* fungemia and pleural tuberculosis in an immunocompetent patient: an uncommon association. Mycopathologia. 2015 Sep 14. [Epub ahead of print]
  
27. Preney L, Théraud M, Guiguen C, Gangneux JP. Experimental evaluation of antifungal and antiseptic agents against *Rhodotorula* spp. Mycoses. 2003; 46: 492-495.
  
28. Petrocheilou-Paschou V, Prifti H, Kostis E, Papadimitriou C, Dimopoulos MA, Stamatelopoulos S. *Rhodotorula* septicemia: case report and minireview. Clin Microbiol Infect. 2001; 7: 100-102.
  
29. Ramos A, Cabero M, Orden B, Ángel-Moreno A, Forés R. Fungemia caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. Report of two cases. Rev Esp Quimioter. 2012; 25: 76-78.
  
30. Riedel DJ, Johnson JK, Forrest GN. *Rhodotorula glutinis* fungemia in a liver-kidney transplant patient. Transpl Infect Dis. 2008; 71: 428-429.

31. Salas V, Pastor J, Calvo E, Sutton D, Chander J, Mayayo, Álvarez E, Guarro J. Efficacy of posaconazole in a murine model disseminated infection caused by *Apophysomyces variabilis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2012; 67: 1712-1715.
32. Sanchis M, Guarro J, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold N, Capilla J. Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitanae* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Sep 18
33. Serena C, Pastor FJ, Mariné M, Rodríguez MM, Guarro J. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. *J. Antimicrob Chemother.* 2007; 60: 162-165.
34. Simon MS, Somersan S, Singh HK, Hartman B, Wickes BL, Jenkins SG, Walsh TJ, Schuetz AN. Endocarditis caused by *Rhodotorula* infection. *J Clin Microbiol.* 2014; 52: 374-378.
35. Tsiodras S, Papageorgiou S, Meletiadis J, Tofas P, Pappa V, Panayiotides J, Karakitsos P, Armaganidis A, Petrikkos G. *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review. 2014;6: 46-50
36. Tuon FF, Costa SF. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25:135-140.
37. Tuon FF, de Almeida GM, Costa SF. Central venous catheter-associated fungemia due to *Rhodotorula* spp. a systematic review. *Med Mycol.* 2007; 45:441-447.

38. Zaas AK, Boyce M, Schell W, Lodge BA, Miller JL, Perfect JR. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 5233-5235.
39. Mavrogiorgos N, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD. Efficacy of voriconazole in experimental *Cryptococcus neoformans* infection. *Mycopathologia.* 2006; 162: 111-114.
40. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11: 142-151.
41. Mohd Nor F, Tan L, Na S, Ng K. Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in HIV-infected patient: a case report and review of the literature. *Mycopathologia.* 2015; 180: 95-98.
42. Wirth F, Goldani LZ. Experimental Rhodotorulosis in rats. *APMIS.* 2011; 120: 231-235.
43. Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2012; 2012:465717.
44. Tonini J, Bailly S, Gautier-Veyret E, Wambergue C, Pelloux H, Thiébaud-Bertrand A, Cornet M, Stanke-Labesque F, Maubon D. Contribution of a simple

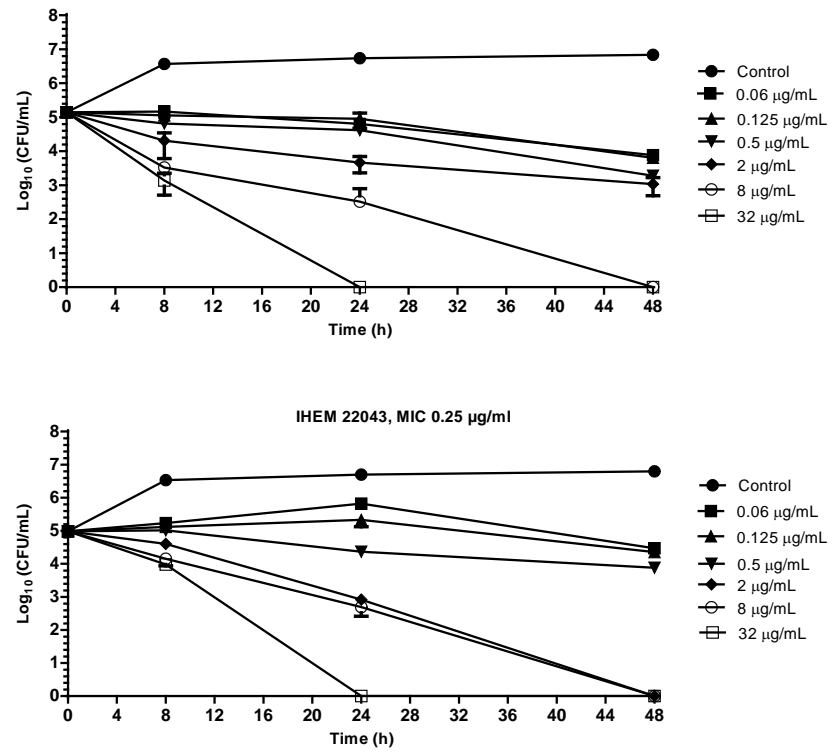
bioassay in effective therapeutic drug monitoring of posaconazole and voriconazole. *Ther Drug Monit.* 2015; 3: 685-688.

45. Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med Mycol.* 2000; **38**: 209-212.

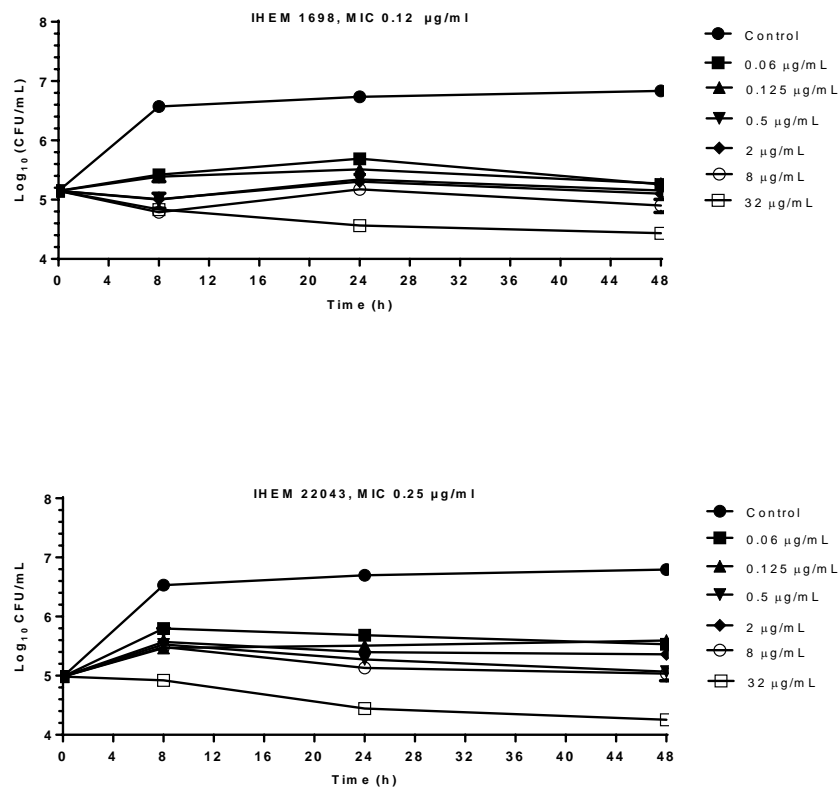
46. Chiller T M, Capilla J, Sobel R A, Farrokhshad K, Clemons K V, Stevens D A. Development of a murine model of cerebral aspergillosis. *J. Infect. Dis.* 2002; **186**: 574-577.

**Table 1.** *In vitro* activity of antifungal drugs against isolates of *R. mucilaginosa* using CLSI broth microdilution assay, MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ).

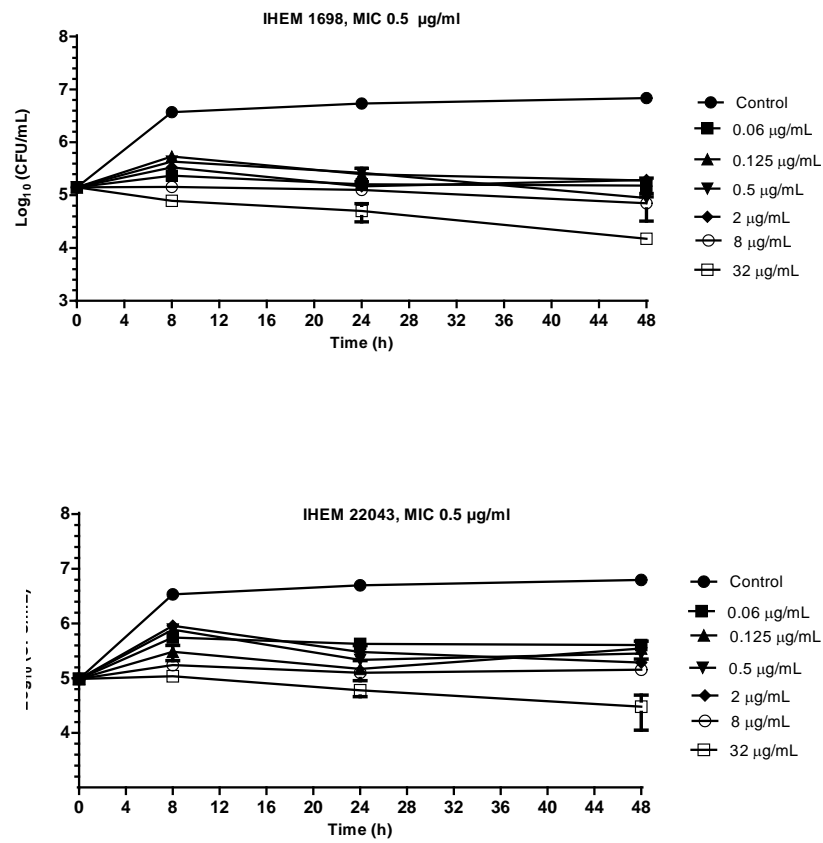
	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	AMB	FLC	ITC	PSC	VRC	MFG	AFG	CFG	5FC
IHEM 1698	0.5	$\geq 32$	1	0.5	0.12	4	$\geq 16$	8	0.03
IHEM 18459	0.5	$\geq 32$	1	0.5	0.25	4	$\geq 16$	1	0.03
IHEM 20182	0.5	$\geq 32$	0.5	0.25	0.12	2	$\geq 16$	1	0.03
IHEM 22043	0.25	$\geq 32$	0.5	0.5	0.25	4	$\geq 16$	8	0.06



**Fig 1.** Time-kill kinetic assay of AMB at various concentrations against two strains of *R. mucilaginosa*.



**Fig 2.** Time-kill kinetic assay of VRC at various concentrations against two strains of *R. mucilaginosa*



**Fig 3.** Time-kill kinetic assay of PSC at various concentrations against two strains of *R. mucilaginosa*.



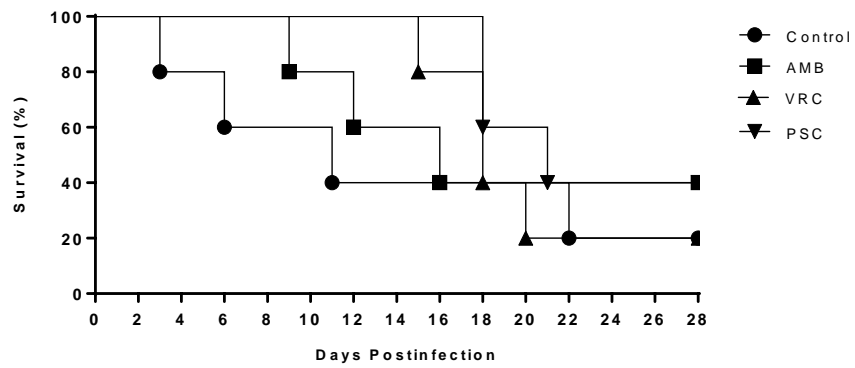
**Table 2.** Survival of mice infected with four different inocula of *R. mucilaginosa*.

Mean Survival Time $\pm$ Standard deviation (SD)				
Inocula UFC/mice				
Strain	$5 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$5 \times 10^7$
IHEM 1698	19.75 $\pm$ (3.54)	17 $\pm$ (6.26)	15.75 $\pm$ (7.49)	10.25 $\pm$ (8.94)
IHEM 18459	19.00 $\pm$ (3.42)	17.50 $\pm$ (4.8)	14.44 $\pm$ (5.30)	11.38 $\pm$ (7.80)
IHEM 20182	20.38 $\pm$ (1.77)	19.13 $\pm$ (2.95)	16.63 $\pm$ (4.98)	15.63 $\pm$ (6.14)
IHEM 22043	17.25 $\pm$ (4.20)	14.25 $\pm$ (7.19)	12 $\pm$ (8.37)	10.88 $\pm$ (8.54)

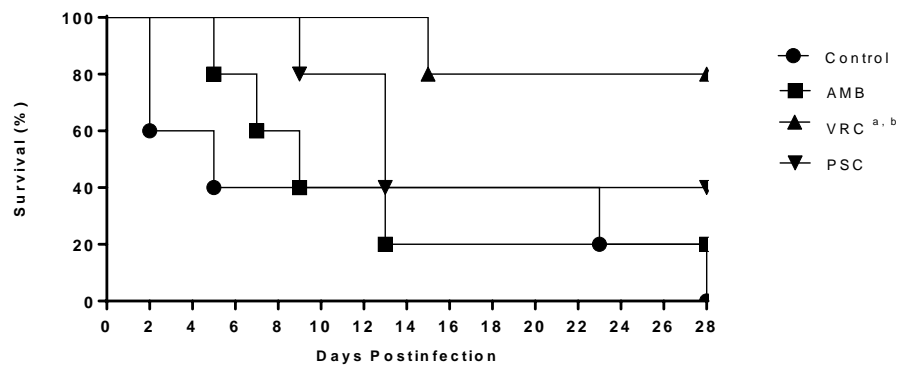
Table 3: Tissue burden 8 days postinfection of mice challenged with four strains. Median log<sub>10</sub> CFU/gr of tissue and confidence interval [CI].

Strains	Liver	Lung	Kidney	Brain	Spleen
<b>IHEM 18459</b>					
5x10 <sup>6</sup>	4.96 [4.41-5.75]	5.61 [5.07-6.16]	5.96 [5.68-6.39]	6.32 [5.49-6.98]	6.09 [4.76-6.90]
1x10 <sup>7</sup>	5.44 [5.44-5.75]	7.09 [5.90-8.02]	6.21 [5.14-6.81]	6.30 [5.14-7.16]	6.88 [5.80-7.75]
2.5x10 <sup>7</sup>	6.15 [5.55-7.13]	6.55 [5.62-7.20]	5.91 [5.61-6.11]	6.03 [5.70-6.65]	6.35 [5.43-6.82]
5x10 <sup>7</sup>	7.46 [6.91-7.76]	7.84 [7.01-8.22]	7.80 [7.37-8.32]	7.53 [6.87-8.46]	7.70 [6.41-8.29]
<b>IHEM 22043</b>					
5x10 <sup>6</sup>	4.50 [4.29-4.71]	4.62 [3.88-5.07]	4.76 [5.67-5.90]	5.73 [5.41-7.16]	5.00 [4.34-5.48]
1x10 <sup>7</sup>	6.38 [5.66-7.13]	5.97 [5.76-6.04]	5.48 [3.85-6.11]	5.83 [5.65-6.26]	5.73 [5.33-6.13]
2.5x10 <sup>7</sup>	6.87 [5.33-7.59]	7.20 [6.87-8.07]	7.36 [6.74-7.78]	7.17 [6.40-7.94]	6.36 [6.80-7.23]
5x10 <sup>7</sup>	7.82 [7.51-7.76]	7.82 [7.01-8.26]	7.80 [7.37-8.04]	7.15 [7.06-8.07]	6.89 [6.40-7.37]
<b>IHEM 20182</b>					
5x10 <sup>6</sup>	4.90 [4.30-5.82]	5.51 [4.60-6.10]	5.68 [5.20-5.98]	6.30 [5.49-6.97]	6.11 [4.78-6.98]
1x10 <sup>7</sup>	5.53 [5.34-6.15]	5.87 [5.70-6.12]	5.00 [4.32-6.21]	6.18 [5.67-6.98]	5.60 [5.31-6.23]
2.5x10 <sup>7</sup>	6.25 [5.25-7.10]	6.53 [5.60-7.29]	6.00 [5.51-6.12]	6.13 [5.60-6.75]	6.22 [5.36-6.90]
5x10 <sup>7</sup>	7.24 [6.11-7.70]	7.80 [7.11-8.16]	7.83 [7.35-8.22]	7.33 [6.57-8.16]	7.50 [6.31-8.19]
<b>IHEM 1698</b>					
5x10 <sup>6</sup>	4.74 [4.14-5.16]	5.13 [4.15-5.70]	5.00 [4.25-5.48]	5.65 [5.28-6.11]	5.00 [4.34-5.76]
1x10 <sup>7</sup>	6.52 [6.34-7.15]	5.97 [5.69-6.10]	5.64 [4.42-6.19]	6.16 [5.65-6.96]	5.80 [5.51-6.02]
2.5x10 <sup>7</sup>	6.58 [5.33-7.53]	6.93 [6.05-8.07]	6.84 [5.69-7.98]	6.82 [6.32-7.94]	6.26 [5.16-6.78]
5x10 <sup>7</sup>	7.30 [6.91-7.71]	7.26 [6.18-8.13]	7.52 [7.14-7.88]	7.59 [7.03-8.07]	7.90 [7.19-7.41]

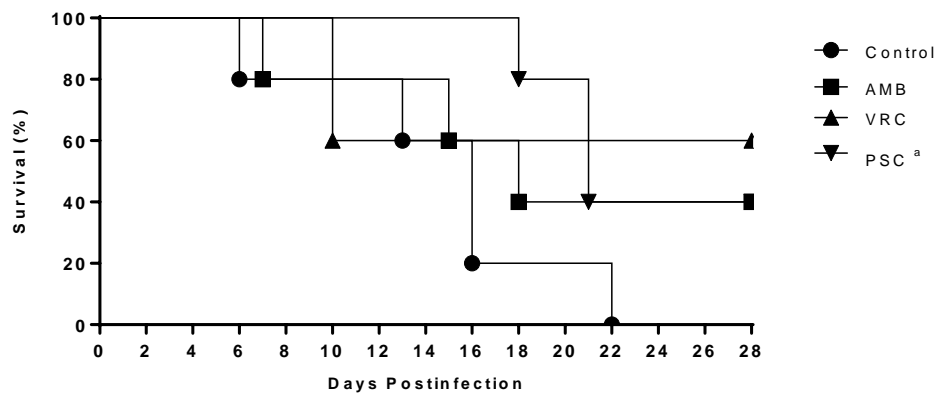
*R. mucilaginosa* IHEM 1698

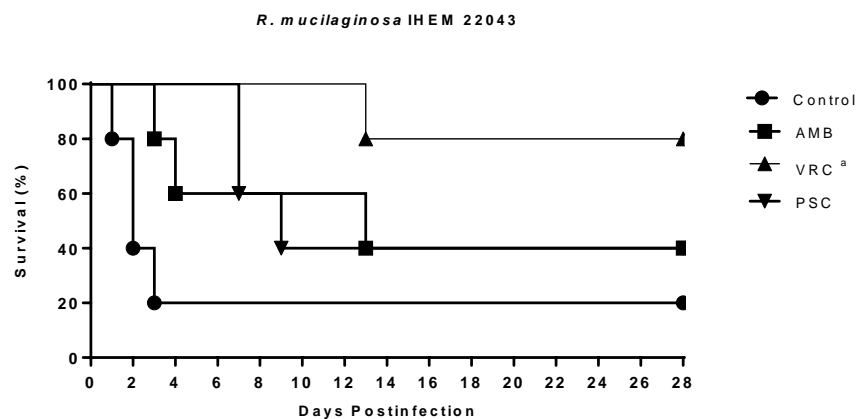


*R. mucilaginosa* IHEM 18459

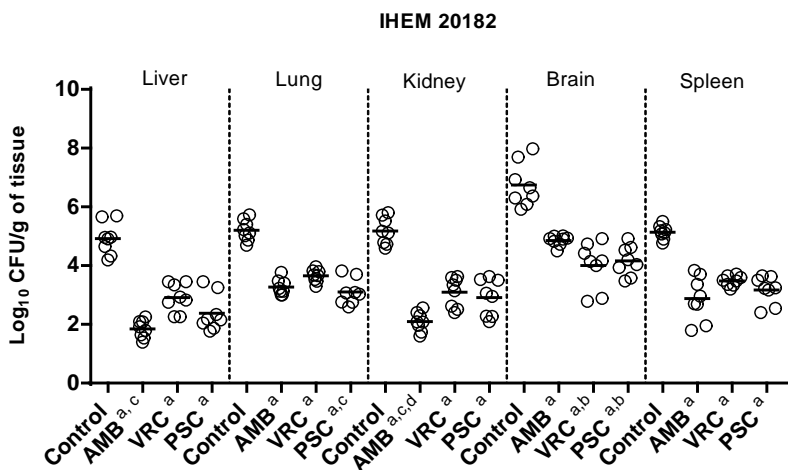
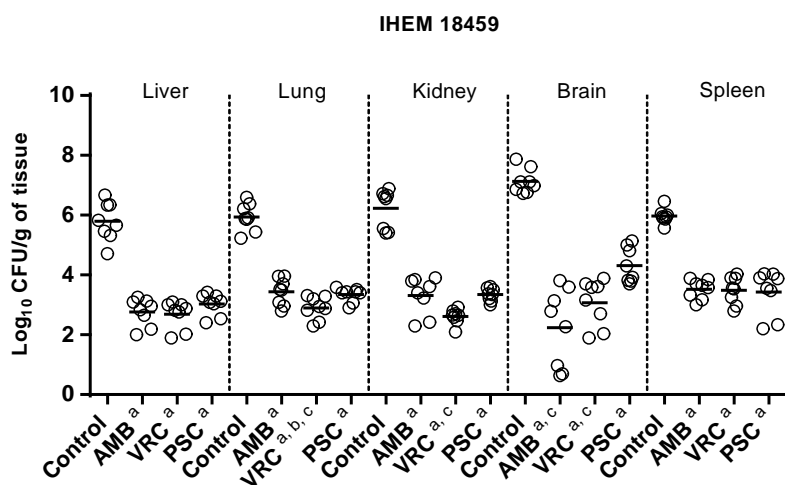
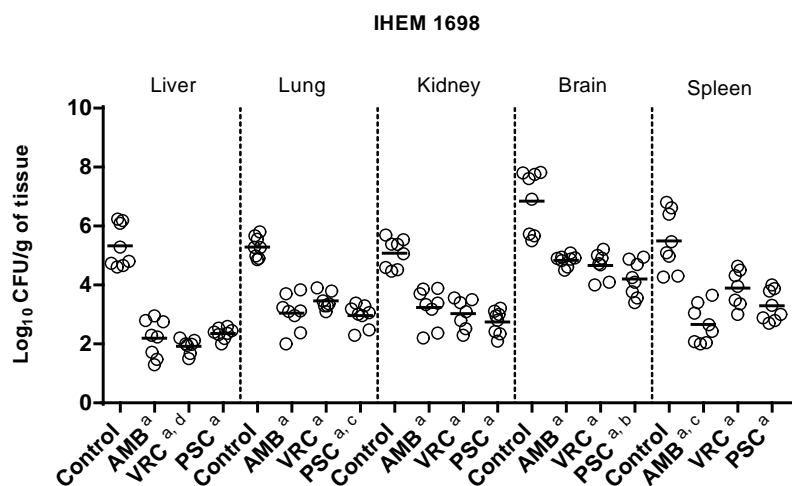


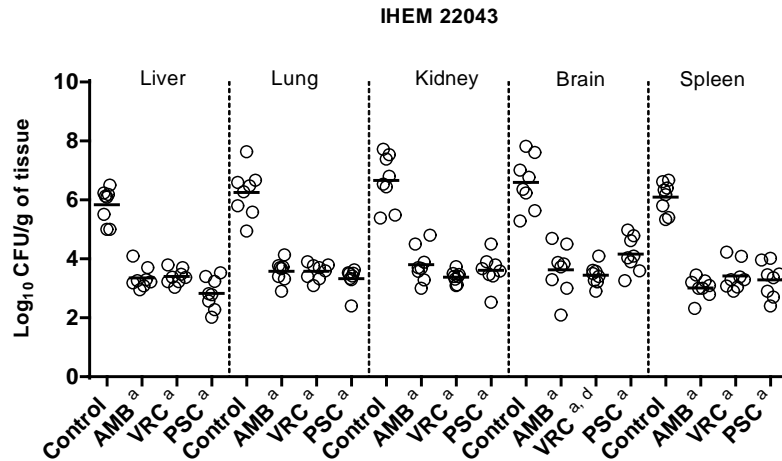
*R. mucilaginosa* IHEM 20182





**Fig 1.** Survival of neutropenic mice infected i.v. with  $2.5 \times 10^7$  CFU/animal of *R. mucilaginosa* and treated for 7 days with AMB 0.8 mg/kg QD VRC 25 mg/kg QD or PSC 20 mg/kg BID. <sup>a</sup>  $P \leq 0.05$  versus control; <sup>b</sup>  $P \leq 0.05$  versus AMB.





**Fig 2.** Effects of antifungal treatment on colony counts in neutropenic mice infected with  $2.5 \times 10^7$  CFU/animal of *R. mucilaginosa*. Colony forming units (CFU) obtained from liver, lung, kidney, brain and spleen after 7 days of treatment with AMB 0.8 mg/kg QD VRC 25 mg/kg QD or PSC 20 mg/kg BID. <sup>a</sup>  $P \leq 0.05$  versus control; <sup>b</sup>  $P \leq 0.05$  versus AMB; <sup>c</sup>  $P \leq 0.05$  versus VRC; <sup>d</sup>  $P \leq 0.05$  versus PSC.

**Table 4.** The drug levels in serum ( $\mu\text{g/ml}$ ) measured by bioassay on day 8 post infection and 4 h after final dosing. Results are expressed as the means  $\pm$  standard deviation.

<b>Strain</b>	<b>AMB</b>	<b>VRC</b>	<b>PSC</b>
IHEM 1698	$11.60 \pm 0.73 \mu\text{g/ml}$	$12.15 \pm 1.13 \mu\text{g/ml}$	$9.14 \pm 0.50 \mu\text{g/ml}$
IHEM 18459	$7.15 \pm 1.47 \mu\text{g/ml}$	$7.05 \pm 2.60 \mu\text{g/ml}$	$9.13 \pm 0.78 \mu\text{g/ml}$
IHEM 20182	$7.47 \pm 1.90 \mu\text{g/ml}$	$8.20 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$	$8.37 \pm 0.66 \mu\text{g/ml}$
IHEM 22043	$10.33 \pm 2.2 \mu\text{g/ml}$	$12.21 \pm 1.29 \mu\text{g/ml}$	$8.91 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$

**Antifungal susceptibility, virulence and antifungal therapy of *Saccharomyces cerevisiae* in a murine model of disseminated infection.**

Pamela Thomson <sup>1</sup>, Josep Guarro <sup>1</sup>, Javier Capilla <sup>1\*</sup>

Unitat de Microbiologia<sup>1</sup>, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, IISPV Reus, Tarragona, Spain

\*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: javier.capilla@urv.cat.



## **Abstract**

In the last decades, the fungus *Saccharomyces cerevisiae* causes opportunistic human infections, mainly in immunocompromised patients using this yeast as a probiotic.

The best therapy for this severe infection is still unknown. We evaluated the *in vitro* killing activity and the *in vivo* efficacy of amphotericin B liposomal at 5 mg/kg, voriconazole at 25 mg/kg or anidulafungin at 5 mg/kg in a murine neutropenic model of systemic infection with *S. cerevisiae*. Amphotericin B and anidulafungin showed fungicidal activity, while voriconazole showed fungistatic activity. The different therapies used especially amphotericin B liposomal and anidulafungin, showed good efficacy measured by tissue burden reduction.

**Keywords:** virulence, antifungal, susceptibility, therapy, *Saccharomyces cerevisiae*

## Introduction

*Saccharomyces cerevisiae* is well-known yeast used since antiquity in the production of foods and beverages and recently as part of biotechnological processes. *S. cerevisiae* is a ubiquitous microorganism found in plants, fruits soils and as part of the human microbiota in the gastrointestinal and respiratory tract. Despite its wide benefits, *S. cerevisiae* can cause infections in immunocompromised individuals, mostly involving the genitourinary system, but also esophagitis, vaginitis, pneumonia, liver abscess or peritonitis have been reported (Muñoz et al., 2005). Dissemination is the most serious illness which has been related to its use as probiotic compound (Eren et al., 2014).

Antifungal therapy against this systemic infection is poorly studied and do not exist guidelines for its treatment. Despite the scarce clinical experience in the management of such infection, fluconazole (FLC) and amphotericin B (AMB) have driven to successful outcome in 60% and 77.7% of patients respectively (Enache-Angoulvant et al., 2005; Muñoz et al., 2005; Souza et al., 2013; Elkhinhal et al., 2015). AMB with or without 5-flucytosine (5-FC) has been used in recurrent case with a favorable response (Hamound et al., 2011). On the other hand, the clinical experience with echinocandins is also favorable response (Lolis et al., 2008; Choi et al., 2012; Popiel et al., 2015). Different *in vitro* studies shown resistance to FLC; while low MICs of flucytosine (5-FC), amphotericin B (AMB), azoles mainly voriconazole (VRC) and echinocandins in front *S. cerevisiae* (Quindós et al., 2004; Richter et al., 2005; Thompson et al 2009; Castanheira., 2012; Pfaller et al., 2013; Minea et al., 2015; Sanglad et al., 2015; Seddik et al., 2015).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of AMB, VRC and AFG against *S. cerevisiae* whose previously have been assayed successfully against *Candida* spp. (Mariné et al 2005; Mariné et al., 2009; Dimopolou et al., 2014) and to determine the efficacy of the Amphotericin B liposomal (LAMB), VRC and AFG in neutropenic mice.

## **Material and Methods**

**Strains.** Three clinical strains of *S. cerevisiae* were included in this study, (FMR 13211, FMR 13212 and FMR 13213). The identification was confirmed by comparing the sequences of large-sub unit ribosomal RNA gene of the used strains with these from the type species. The fungal isolates were stored lyophilized and subcultured twice on potato dextrosa agar (PDA) at 35°C for 48 hours before their use.

**In vitro studies.** AMB (Sigma Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain), itraconazole (ITC) (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), FLC (Pfizer S.A., Madrid, Spain), posaconazole (PSC) (Schering-Plough Res., Inst., NJ, EUA), VRC (Pfizer S.A., Madrid, Spain), anidulafungin (AFG) (Pfizer S.A., Madrid, Spain), caspofungin (CFG) (Merk & Co., Inc., Rahway, EUA), micafungin (MFG) (Astellas Pharma, Madrid, Spain) and 5-FC (Sigma Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain) obtained as pure powder were assayed, following the reference microdilution broth method according to the document M 27-A3 (CLSI, 2008). Minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest drug concentration that produced 100% inhibition of visible fungal growth in the case of AMB or  $\geq 50\%$  in case of 5-FC, azoles and echinocandins following 48 h of incubation at 35°C. As, AMB, VRC and AFG showed the higher *in vitro* activity against the assayed strains, these drugs were selected for time-kill and *in vivo* assays. Time-kill studies were performed as previously described (Klepser et al., 1997; Cantón et al., 2008). Briefly, two-fold serial dilutions ranged from 32 to 0.06  $\mu\text{g/ml}$  were used and at predetermined time points (0, 8, 24 and 48 h) aliquots of 100  $\mu\text{l}$  were removed, serially diluted in sterile water, placed onto PDA plates and incubated at 35°C for 24-48 h in order to determine CFU/ml. This procedure allowed a limit of detection of 33 CFU/ ml. All assays were carried out in duplicate and the geometric mean and standard deviation were calculated. A

reduction on CFU counts of  $\geq 99.9\%$  or  $3 \log_{10}$  compared to the starting inoculum was considered indicative of fungicidal activity, while a CFU count reduction of  $< 99.9\%$  was considered fungistatic.

**In vivo studies.** Four-week-old male OF-1 mice weighing 28-30 g (Charles River; Criffa SA, Barcelona, Spain) were used. All mice were immunosuppressed by intraperitoneal administration of a single dose of 200 mg/kg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk SA, Barcelona, Spain) beginning 2 days prior to the infection and then every 5 days until the end of the experiment (Chiller et al., 2002).

To determine the virulence of each strain, groups of eight mice were inoculated intravenously (i.v.) via the lateral tail vein with  $2.5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  or  $5 \times 10^8$  colony forming units (CFU) per animal in 0.2 ml of sterile saline solution.

For efficacy studies, 12 groups of animals consisting on 8 for tissue burden studies were inoculated i.v. with  $5 \times 10^7$  CFU. This inoculum was chosen since it was the inoculum size able to cause an acute infection in mice.

### **Antifungal therapy**

Animals received antifungal monotherapies consisting on: LAMB (Farmacia Xalabarder, Barcelona, Spain) administered intravenously i.v at 5 mg/kg once daily (QD), VRC (Vfend ® Pfizer S. A. Madrid. Spain) at 25 mg/kg given orally by gavage QD or AFG (Ecalta ® Pfizer S. A. Madrid. Spain) QD at 5 mg/kg administered intraperitoneally (i.p).

The doses were selected based on previous studies (Richter et al., 2005; Thompson et al 2009; Castanheira., 2012; Pfaller et al., 2013; Minea et al., 2015; Seddik et al., 2015).

From 3 days before infection until the end of the experiment mice treated with VRC were given grapefruit juice instead of water (Sugar & Liu., 2000; Graybill et al., 2003). Control groups received no antifungal treatment. Treatments began 24 h after challenge and lasted for 7 days. To prevent bacterial infections, all animals received ceftazidime at 5 mg/kg

subcutaneously once daily during the experimental period. The efficacy of the drugs was evaluated by reduction of tissue burden from liver, lungs, kidneys, brain and spleen. Animals were housed under standard conditions and care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee.

#### **Determination of drug serum levels and tissue burden.**

On day 8 post infection and 6 h after the last dose of control and treated mice from the tissue burden groups, were anaesthetized by inhalation of sevoflurane (Sevorane; Abbott, Madrid, Spain) and one milliliter of blood from each mouse was extracted by cardiac puncture. Animals were then euthanized by cervical dislocation and liver, spleen, lungs, kidneys were aseptically removed. Serum samples were obtained by centrifugation of the blood at 3.500 r.p.m. and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until its use. Drug levels were determined by bioassay, as previously described (Cendejas-Bueno et al., 2012; Tonini et al., 2015). Approximately one half of each organ was weighed and mechanically homogenized in 1 ml of sterile saline solution. Homogenates were serially diluted (1:10), placed onto PDA plates and incubated for 48 h at  $35^{\circ}\text{C}$  for fungal load calculation (CFU/g of tissue).

**Statistical analysis.** Results from the tissue burden studies were analysed using the Mann-Whitney *U*-test by Graph Pad Prism 6.0 for Microsoft Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). A *P* value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

The *in vitro* susceptibility study shown good activity of 5-FC with MIC ( $\leq 0.03\ \mu\text{g/ml}$ ), AMB ( $\leq 0.5\ \mu\text{g/ml}$ ), VRC and echinocandins ( $\leq 0.25\ \mu\text{g/ml}$ ) against all strains assayed.

The activity of PSC and ITC shown the MIC  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ . Our data confirm poor *in vitro* activity of FLC against *S. cerevisiae* (MIC  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ) (Table 1).

The time-killing assay shown fungicide activity of AMB and AFG at 2  $\mu\text{g/ml}$  and 0.5  $\mu\text{g/ml}$  respectively, 48 hours after incubation. However, VRC showed fungistatic activity (Fig. 1).

The fungal loads recovered from tissues showed an inoculum-dependent response with lower inoculum ( $2.5 \times 10^7$ ) showing fungal loads ranged from  $\log_{10}$  4.36 to  $\log_{10}$  6.30 CFU/g and from  $\log_{10}$  6.15 to 7.73 CFU/g in all organs in the studied tissues when higher inoculum was used ( $5 \times 10^8$ ). Si, los rangos correspondes a lo que dice lower y higher inóculo, de todas formas lo anoté en paréntesis para que quede más claro.

In all cases, brain and spleen were the most affected organs when inocula  $2.5 \times 10^7$ . On the other hand, with  $5 \times 10^7$  and  $5 \times 10^8$  no tissue tropism has been clearly observed, with all organs affected after infection (Table 2). He vuelto a revisar y lo he corregido. He dejado parte de lo que habías anotado, porque como al inicio menciono lo del inóculo 2.5. All assayed treatments, showed efficacy in reducing tissue burden from organs in comparison with the control group independently of the infecting strains ( $P \leq 0.0022$ ). LAMB and AFG cleared fungal loads from the mostly studied organs, especially in the strains 13211 and 13213. However, the strain 13212 no treatment is observed better than another (Figure 2).

Six hours after the last dose of treatment the three therapies used showed the therapeutic serum concentrations above the corresponding MICs values. LAMB 5 mg/kg, VRC 25 mg/kg or AFG 5 mg/kg mean serum levels of drug were  $\leq 12.78$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $\leq 18.05$   $\mu\text{g/ml}$  and  $\leq 9.53$   $\mu\text{g/ml}$  respectively, including all strains (Table 3). He mejorado la redacción de esta frase. Lo que estaba anotado no era un cálculo, sino el mayor valor de cada fármaco por eso estaba el signo  $\leq$

## **DISCUSSION**

We evaluated the *in vitro* activity, killing kinetics, and the *in vivo* efficacy of AMB, VRC and AFG against three strains of *S. cerevisiae*. These drugs were selected based on *in vitro* results. 5-FC was excluded from the efficacy study; due to its toxicity and currently used associated with another antifungal (Simon et al., 2014). He cambiado el inicio de la discusión, me pareció bien dejar el comentario de la 5-FC acá, luego me dices que te parece

In the present study 5-FC, AMB and echinocandins were the most active drugs followed by VRC, being these results in agreement with those previously published by other authors (Thompson et al 2009; Castanheira., 2012; Pfaller et al., 2013; Minea et al., 2015; Seddik et al., 2015). On the other hand, FLC was inactive against *S. cerevisiae*, same as that reported previously by other authors (Quindós et al., 2004; Castanheira., 2012; Pfaller et al., 2013; Minea et al., 2015; Sanglad et al., 2015) although, has been used in different cases such as urinary infection and fungemia by *S. cerevisiae*, showing different results (Muñoz et al., 2005; Souza et al 2013; Popiel et al., 2015; Elkhinhal et al., 2015). He vuelto a redactar y mencionar los tipos de casos clínicos

On the other hand, there are three clinical cases treated with echinocandins, which have worked successfully in infection spread by *S. cerevisiae* (Lolis et al., 2008; Choi et al., 2012; Popiel et al., 2015)

The three therapies used showed efficacy against infections by *S. cerevisiae*, with all treatments being able to significantly reduce the fungal burden in animals infected with any of the strains in comparison to their respective controls. LAMB and AFG showed best efficacy. This might be due to the fungicidal activity of both drugs against *S. cerevisiae* in two strains, from the concentration 0.125 µg/ml. However, in the strain FMR 13212 this occurs from the 32 µg/ml and 2 µg/ml for AMB and AFG respectively;

which could explain the difference in efficacy outcomes. This phenomenon has been similarly reported by other authors testing LAMB and AFG against experimental *C. guilliermondii* infection (Paredes et al., 2015). The fungistatic activity of voriconazole showed in this study, has been previously reported by Sanchis et al., against strains of *C. glabrata* (Sanchis et al., 2016).

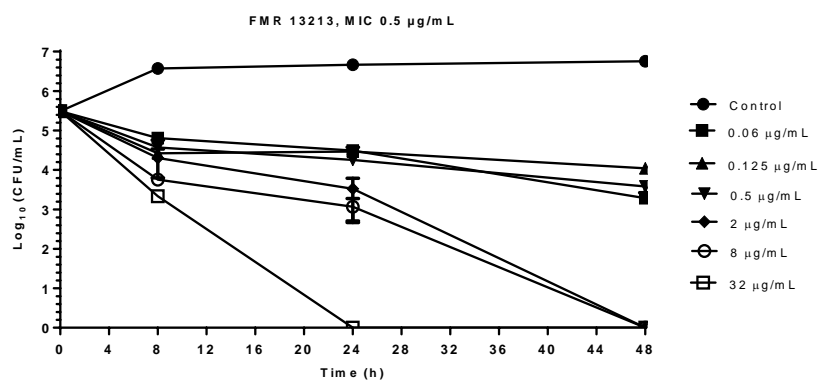
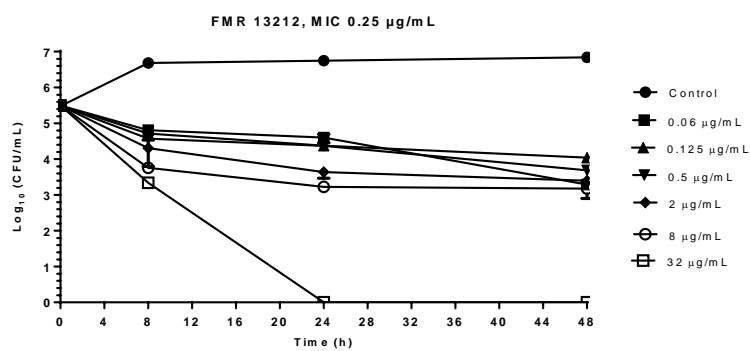
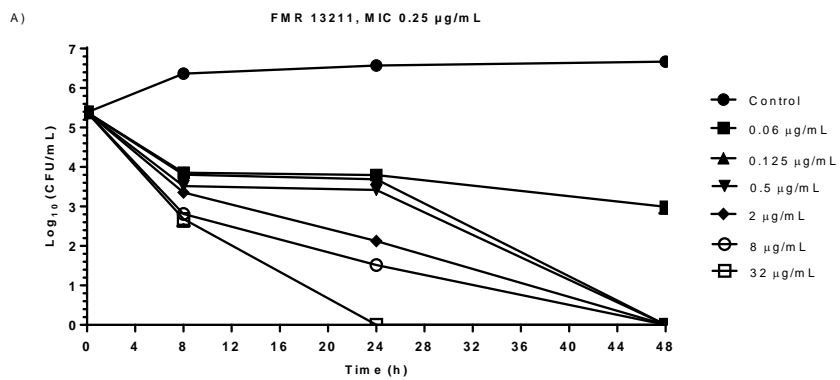
At present, there are not previous studies evaluating the LAMB, VRC or AFG effectiveness against *S. cerevisiae*. However, previously research has demonstrated efficacy against other yeast taxonomically related (Mariné et al., 2005; Mariné et al., 2009; Dimopolou et al., 2014).

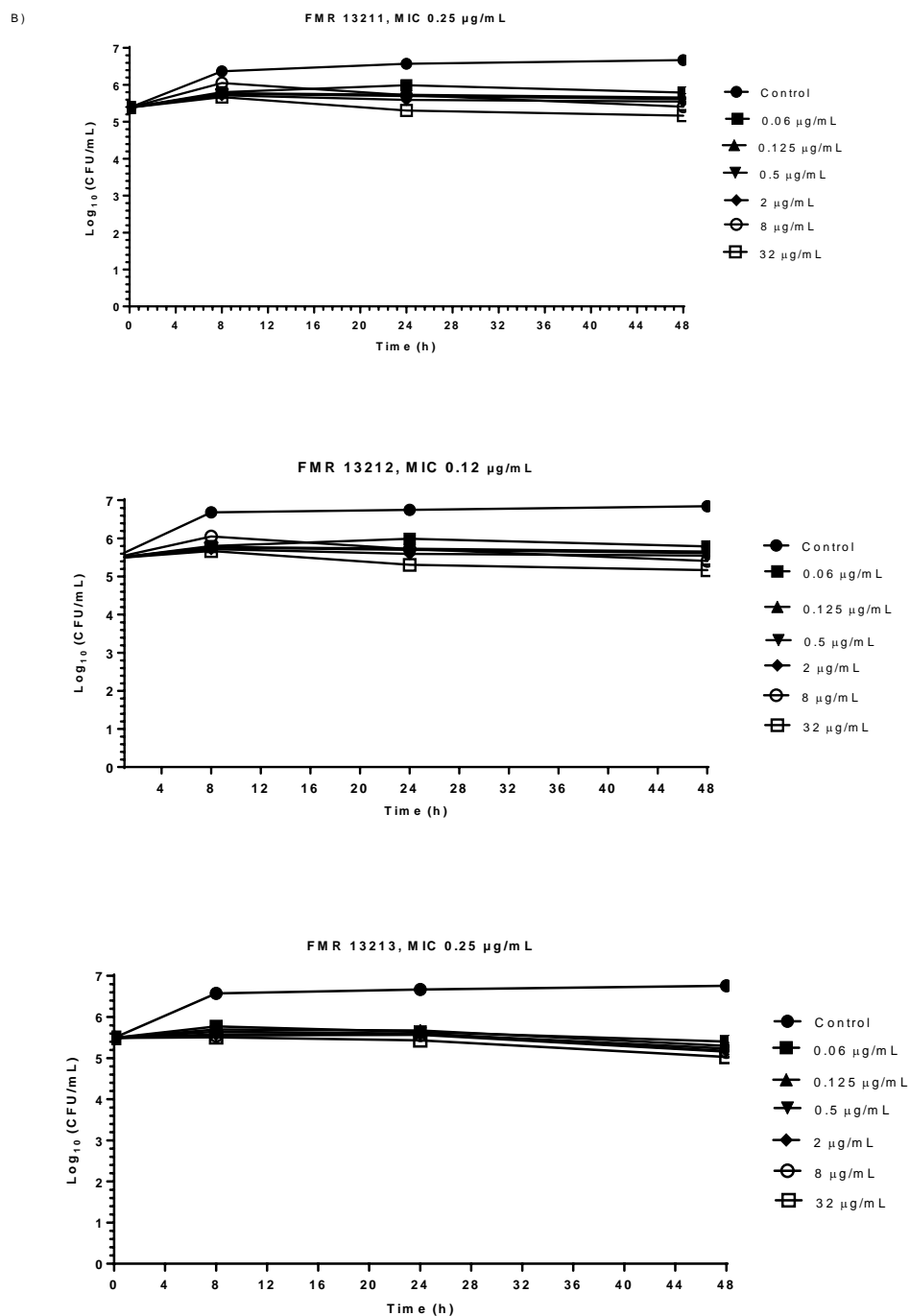
In conclusion, our study showed the higher activity of 5-FC, AMB, VRC and AFG against the three strains of *S. cerevisiae* and the efficacy of LAMB and AFG in two strains.

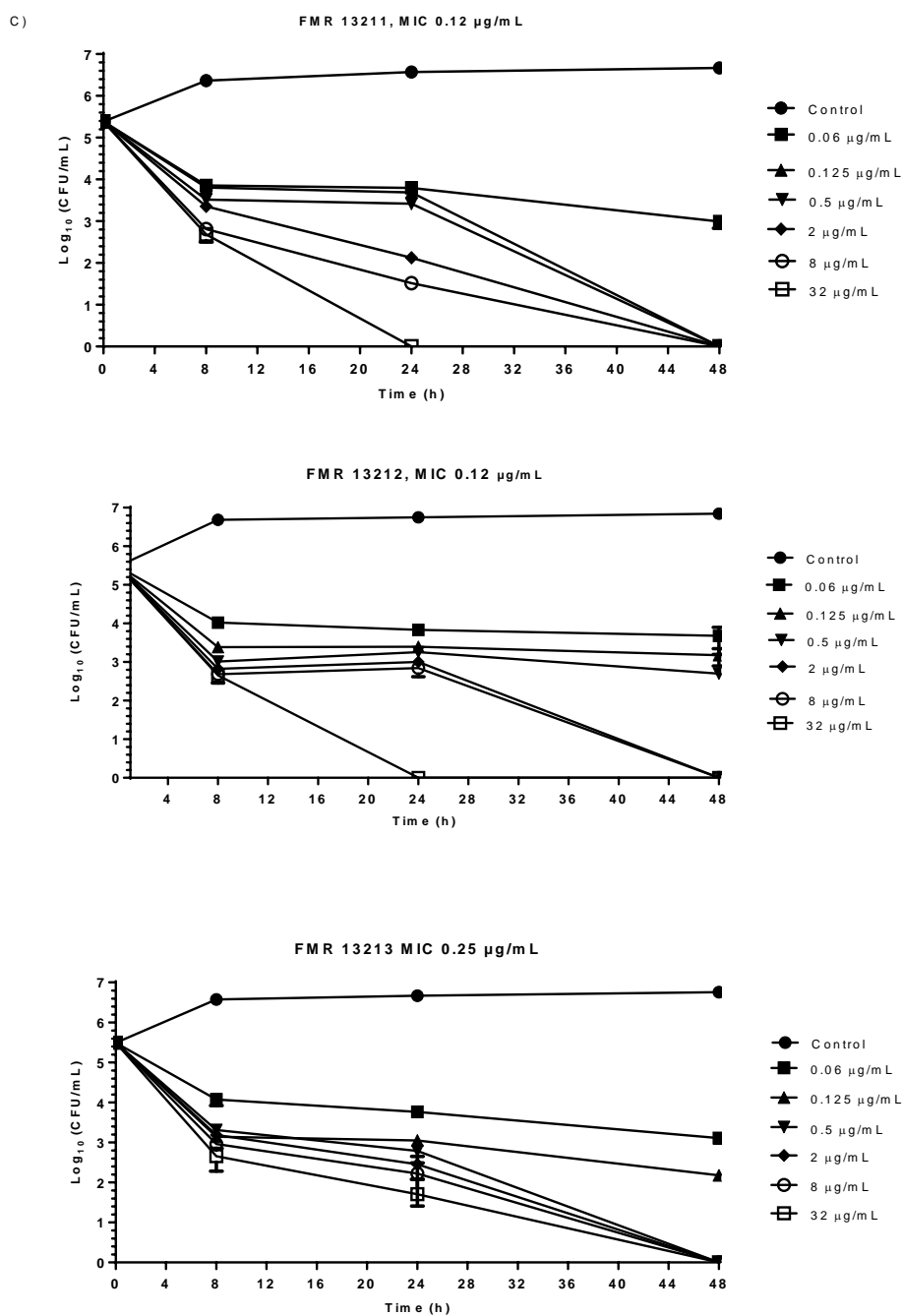


Table 1. In vitro activity of antifungal drugs against isolates of *S. cerevisiae* using CLSI broth microdilution assay, MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ).

	<b>AMB</b>	<b>FLC</b>	<b>ITC</b>	<b>PSC</b>	<b>VRC</b>	<b>MFG</b>	<b>AFG</b>	<b>CFG</b>	<b>5-FC</b>
FMR 13211	0.25	$\geq 32$	1	0.5	0.25	0.25	0.12	0.25	0.03
FMR 13212	0.25	$\geq 32$	1	0.5	0.12	0.25	0.12	0.25	0.03
FMR 13213	0.5	$\geq 32$	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.03





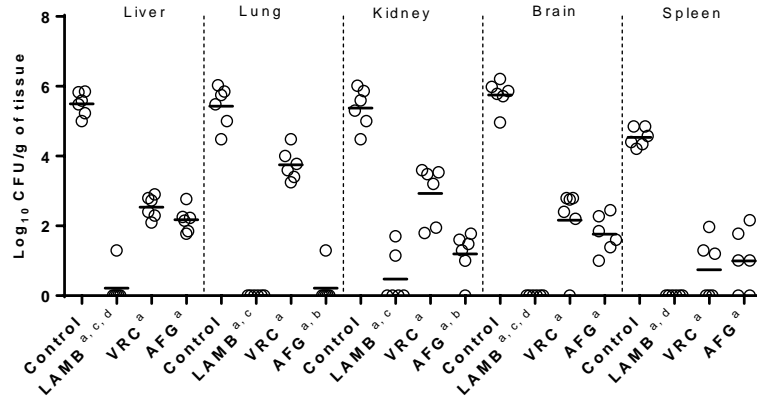


**Fig 1.** Time-kill kinetic assay of AMB (A), VRC (B) and AFG (C) at various concentrations against three strains of *S. cerevisiae*.

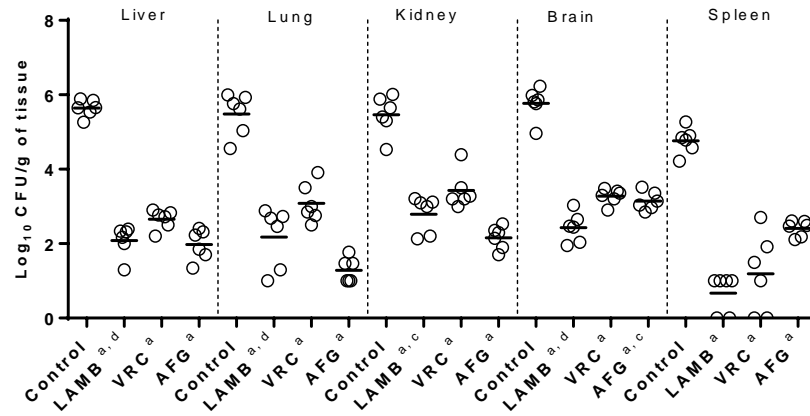
**Table 3:** Tissue burden 8 days postinfection of mice challenged with for three strains. Median log<sub>10</sub> CFU/gr of tissue and confidence interval [CI].

Strains	Inocula	Liver	Lung	Kidney	Brain	Spleen
<b>FMR 13211</b>						
	2.5x10 <sup>7</sup>	4.36 [4.01-5.75]	5.31 [5.37-6.16]	5.76 [5.78-5.79]	6.22 [5.29-6.78]	6.00 [4.96-6.80]
	5x10 <sup>7</sup>	5.54 [5.44-5.95]	7.29 [5.88-7.52]	6.21 [5.11-6.71]	6.30 [5.14-7.06]	6.18 [5.80-6.75]
	5x10 <sup>8</sup>	6.18 [6.01-6.51]	6.65 [6.08-6.98]	6.41 [5.78-6.98]	7.03 [7.02-7.49]	6.66 [6.80-6.93]
<b>FMR 13212</b>						
	2.5x10 <sup>7</sup>	4.47 [4.29-4.71]	4.52 [4.78-5.07]	4.86 [5.77-5.90]	5.73 [5.41-7.16]	5.00 [4.34-5.48]
	5x10 <sup>7</sup>	6.38 [5.66-7.13]	5.97 [5.76-6.04]	5.48 [3.85-6.11]	5.83 [5.65-6.26]	5.73 [5.33-6.13]
	5x10 <sup>8</sup>	7.23 [6.99-7.37]	7.48 [6.87-7.71]	7.52 [7.32-7.70]	7.56 [7.38-7.91]	7.16 [6.80-7.23]
<b>FMR 13213</b>						
	2.5x10 <sup>6</sup>	4.90 [4.30-5.82]	5.51 [4.60-6.10]	5.68 [5.20-5.98]	6.30 [5.49-6.97]	6.11 [4.78-6.98]
	5x10 <sup>7</sup>	5.60 [5.17-5.99]	5.84 [5.22-6.62]	5.46[4.89-6.09]	6.10 [5.60-6.82]	5.10 [4.31-6.23]
	5x10 <sup>8</sup>	6.15 [5.15-7.20]	6.73 [5.66-7.39]	6.20 [5.33-6.35]	6.23 [5.66-6.75]	6.54 [5.66-6.90]

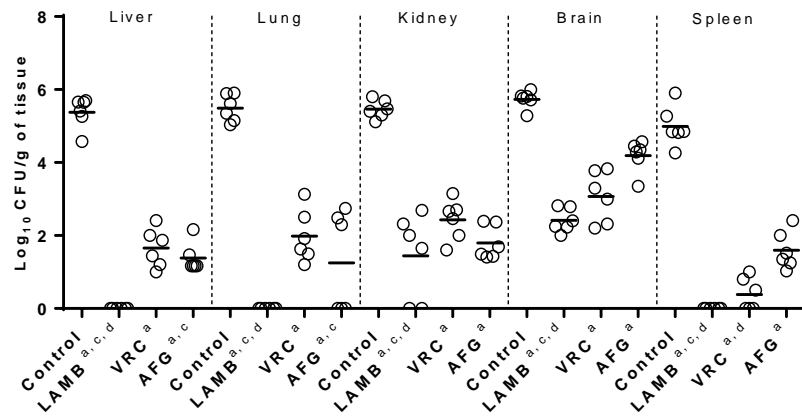
*S. cerevisiae*, FMR 13211



*S. cerevisiae*, FMR 13212



*S. cerevisiae*, 13213



**Fig 2.** Effects of antifungal treatment on colony counts in liver, lungs, kidneys, brain and spleen of neutropenic mice 8 days after infection with  $5 \times 10^7$  CFU/animal of *S. cerevisiae*. Animals received liposomal amphotericin B (LAMB) at 5 mg/kg QD, voriconazole (VRC) at 25 mg/kg QD or anidulafungin (AFG) at 5 mg/kg QD. <sup>a</sup>  $P \leq 0.05$  versus control; <sup>b</sup>  $P \leq 0.05$  versus LAMB; <sup>c</sup>  $P \leq 0.05$  versus VRC; <sup>d</sup>  $P \leq 0.05$  versus AFG.

**Table 3.** Drug levels in serum ( $\mu\text{g/ml}$ ) measured by bioassay on day 8 post infection and 6 h after final dosing three drugs in neutropenic mice infected with  $5 \times 10^7$  CFU/animal of *S. cerevisiae*

Strain	Serum level ( $\mu\text{g/mL}$ ), mean $\pm$ SD		
	AMB	VRC	AFG
FMR 13211	12.78 $\pm$ 0.67 $\mu\text{g/ml}$	12.15 $\pm$ 0.93 $\mu\text{g/ml}$	8.21 $\pm$ 0.66 $\mu\text{g/ml}$
FMR 13212	9.45 $\pm$ 0.55 $\mu\text{g/ml}$	18.05 $\pm$ 0.40 $\mu\text{g/ml}$	9.53 $\pm$ 0.72 $\mu\text{g/ml}$
FMR 13213	9.17 $\pm$ 0.90 $\mu\text{g/ml}$	18.03 $\pm$ 0.56 $\mu\text{g/ml}$	9.41 $\pm$ 0.16 $\mu\text{g/ml}$

## **REFERENCES**

G. Quindós, M.T. Ruesga, E. Martín-Mazuelos, R. Salesa, R. Alonso-Vargas, A.J. Carrillo-Muñoz, S. Brena, R. San Millán, J. Pontón. ***In-vitro* activity of 5-fluorocytosine against 1021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts.** Rev Iberoam Micol, 21 (2004) pp. 63-69.

G.R. III Thompson, N.P. Wiederhold, D.A. Sutton, A. Fothergill, T.F. Patterson. ***In vitro* activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Pichia* species.** J Antimicrob Chemother, 64 (2009) pp. 79-83.

M. Castanheira, S.A. Messer, R.J. Jones, D.J. Farrell, M.A. Pfaller MA. **Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections.** Int J Antimicrob Agents, 44 (2014) pp. 320-326.

M.A. Pfaller, S.A. Messer, P.R. Rhomberg, R.N. Jones, M. Castanheira. ***In vitro* activities of isavuconazole and comparator antifungal agents tested against a global collection of opportunistic yeasts and molds.** J Clin Microbiol, 51 (2013) pp. 2608-2616.

D. Sanglard, A.T. Coste. **Activity of isavuconazole and other azoles against *Candida* clinical isolates and yeast model systems with known azole resistance mechanisms.** Antimicrob Agents Chemother, 60 (2015) pp. 229-238.

H.A. Seddik, A. Ceugniez, F. Bendali, B. Cudenneq, D. Drider. **Yeasts isolated from Algerian infants' feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-*albicans***



***Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*.** Arch Microbiol, 24 (2015) pp. . [Epub ahead of print]

P. Trevisi, M. Colombo, D. Priori, L. Fontanesi, G. Galimberti, G. Calò, V Motta, R. Latorre, F. Fanelli, M. Mezzullo, U. Pagotto, Y. Gherpelli, R. D'Inca, P. Bosi. **Comparison of three patterns of feed supplementation with live *Saccharomyces cerevisiae* yeast on postweaning diarrhea, health status, and blood metabolic profile of susceptible weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4ac.** J Anim Sci, 93 (2015) pp. 2225-2233.

K.Y. Popiel, P. Wong, M.J. Lee, M. Langelier, D.C. Sheppard, D.C. Vinh DC. **Invasive *Saccharomyces cerevisiae* in a liver transplant patient: case report and review of infection in transplant recipients.** Transpl Infect Dis, 17 (2015) pp. 435-441.

B. Minea, V. Nastasa, R.F. Moraru, A. Kolecka, M.M. Flonta, I. Marincu, A. Man, F. Toma, M. Lupse, B. Doroftei, N. Marangoci, M. Pinteala, T. Boekhout, M. Mares. **Species distribution and susceptibility profile to fluconazole, voriconazole and MXP-4509 of 551 clinical yeast isolates from a Romanian multi-centre study.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2 (2015) pp. 367-383.

M.C. Arendru, T. Boekhout, M. Akova, J.F. Meis, O.A. Cornely, O. Lortholary; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; European Confederation of Medical Mycology. **ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections.** Clin Microbiol Infect, 3 (2014) pp. 76-98.

C. Souza Goebel, F. de Mattos Oliveira, L.C. Severo. *Saccharomyces cerevisiae* **infections**. Rev Iberoam Micol, 30 (2013) pp. 205-208.

Z. Eren, Y. Gurol, M. Sonmezoglu, H.S. Eren, G. Celik, G. Kantarci G. *Saccharomyces cerevisiae* **fungemia in an elderly patient following probiotic treatment**. Mikrobiyol Bul, 48 (2014) pp. 351-355.

Z. Jiang, S. Wei, Z. Wang, C. Zhu, S. Hu, C. Zheng, Z. Chen, Y. Hu, L. Wang, X. Ma, X. Yang. **Effects of different forms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, intestinal development, and systemic immunity in early-weaned piglets**. J Anim Sci Biotechnol, 6 (2015) pp.47-52.

P. Muñoz, E. Bouza, M. Cuenca-Estrella, J.M. Eiros, M.J. Pérez, M. Sánchez-Somolinos, C. Rincón, J. Hortal, T. Peláez. *Saccharomyces cerevisiae* **fungemia: an emerging infectious disease**. Clin Infect Dis, 40 (2005) pp. 1625-1634.

B. Elkhihal, M. Elhalimi, B. Ghfir, A. Mostachi, M. Lyagoubi, S. Aoufi. **Urinary infection by *Saccharomyces cerevisiae*: Emerging yeast?**. J Mycol Med, 25 (2015) pp. 303-305.

A. Enache-Angoulvant, C. Hennequin. **Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review**. Clin Infect Dis, 41 (2005), pp. 1559–1568.

R. N. Tiballi, J. E. Spiegel, L.T. Zarins, C.A. Kauffman. ***Saccharomyces cerevisiae* infections and antifungal susceptibility studies by colorimetric and broth macrodilution methods.** Diagn Microbiol Infect Dis, 23 (1995), pp. 135–140

S. Hamoud, Z. Keidar, T. Hayek. **Recurrent *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an otherwise healthy patientm.** Isr Med Assoc J, 13 (2011), pp. 575–576

N. Lolis, D. Veldekis, H. Moraitou. ***Saccharomyces boulardii* fungaemia in an intensive care unit patient treated with caspofungin.** Crit Care, 12 (2008) pp. 414-416.

G. Choi, S.L. Meijer, M.D. Hazenberg. **Disseminated bread yeast fungaemia in a baker's wife with acute myeloid leukaemia.** Br J Haematol, 158 (2012) pp. 298-301.

D. Dimopoulou, G. Hamilos, M. Tzardi, R.E. Lewis, G. Samonis, D.P. Kontoyiannis. **Anidulafungin versus caspofungin in a mouse model of candidiasis caused by anidulafungin-susceptible *Candida parapsilosis* isolates with different degrees of caspofungin susceptibility.** Antimicrob Agents Chemother, 58 (2014) pp. 229-236.

D. Andes, K. Marchillo, R. Conklin, K. Gopal, E. Farkad, A. Cacciapuoti, D. Loebenberg. **Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole in a murine model disseminated candidiasis.** Antimicrob Agents Chemother, 48 (2004) pp. 137-141.

J.R. Graybill, L.K. Najvar, G.M. Gonzalez, S. Hernandez, R. Bocanegra. **Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole,** 51 (2003) pp. 1373-1376.

A.M. Sugar, X.P. Liu. **Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse.** *Med Mycol*, 38 (2000) pp. 209-212.

E. Cendejas-Bueno, A. Forastiero, J.L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, A. Gomez-Lopez. **HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples.** *Clin Microbiol Infect*, 18 (2012) pp. 1229-1235.

T.M. Chiller, J. Capilla, R.A. Sobel, K. Farrokhshad, K.V. Clemons, D.A. Stevens. **Development of a murine model of cerebral aspergillosis.** *J Infect Dis*, 186 (2002) pp. 574-577.

E. Cantón, J. Pemán, A. Valentín, A. Bosch, A. Espinel-Ingroff, A. Gobernado. **Comparison of posaconazole and voriconazole *in vitro* killing against *Candida krusei*.** *Diagn Microbiol Infect Dis*, 62 (2008) pp. 177-181.

M. Mariné, R. Espada, J. Torrado, F.J. Pastor, J. Guarro. **Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*.** *Int J Antimicrob Agents*, 34 (2009) pp. 566-569.

M. Mariné, R. Espada, J. Torrado, F.J. Pastor, J. Guarro. **Efficacy of a new formulation of amphotericin B in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*.** *J Antimicrob Chemother*, 61 (2008) pp. 880-883.

J. Tonini, S. Bailly, E. Gautier-Veyret, C. Wambergue, H. Pelloux, A. Thiébaud-Bertrand, M. Cornet, F. Stanke-Labesque, D. Maubon. **Contribution of a simple bioassay in effective therapeutic drug monitoring of posaconazole and voriconazole.** Ther Drug Monit, 3 (2015) pp. 685-688.

K. Paredes, F.J. Pastor, J. Capilla, D.A. Sutton, E. Mayayo, A.W. Fothergill, J. Guarro. **Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between in vitro antifungal pharmacodynamics and outcome.** Rev Iberoam Micol, 32 (2015) pp. 34-39.

M. Sanchis, J. Guarro, D.A. Sutton, A.W. Fothergill, N. Wiederhold, J. Capilla. **Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitanae* infection.** Diagn Microbiol Infect Dis, 84 (2016) pp. 48-51.

---

## DISCUSIÓN GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

## 5. Discusión general

A pesar del avance realizado en las últimas décadas en el diagnóstico de las infecciones fúngicas, junto al desarrollo de nuevos fármacos y la mejor monitorización de los procesos infecciosos y sus tratamientos, las infecciones fúngicas diseminadas continúan representando un reto para la micología médica.

La variedad de especies no relacionadas con capacidad de producir infecciones, la aparición de resistencia al tratamiento y las enfermedades de base que suelen presentar los pacientes, conforman un escenario que precisa ser abordado desde todas sus perspectivas. Mientras que *Candida* spp. sigue siendo la causa más común de enfermedades fúngicas invasivas, ha habido un aumento significativo en las tasas de infecciones sistémicas causadas por otros hongos considerados oportunitas emergentes.

Esta investigación se enfocó en cinco especies de hongos oportunistas, de tipo levaduriformes, que además de ser poco estudiadas, presentan una elevada morbilidad y mortalidad en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos. En la actualidad no existe ningún protocolo terapéutico establecido para el tratamiento de las infecciones causadas por estas especies, lo que ha motivado especialmente la realización de estas investigaciones.

### 5.1. *Saprochaete capitata*

Las infecciones sistémicas causadas por *Saprochaete capitata*, afectan principalmente a individuos inmunocomprometidos con énfasis en aquellos que presentan alguna neoplasia hematológica, como leucemia. Particularmente en este grupo de



pacientes la mortalidad causada por esta levadura es elevada (Christakis *et al.*, 2005; Birrenbach *et al.*, 2012; Parahym *et al.*, 2015; Ulu-Kilic *et al.*, 2015).

En los últimos años se han utilizado distintas terapias para el tratamiento de las infecciones causadas *S. capitata*, sin embargo no se ha llegado al establecimiento de ningún protocolo terapéutico consensuado, probablemente debido a la baja prevalencia. En nuestro estudio evaluamos la actividad del posaconazol *in vitro* y su efectividad a diferentes dosis frente a seis aislados de origen humano de *S. capitata*. Las concentraciones mínimas inhibitorias resultantes fueron especialmente bajas e idénticas para todas las cepas, coincidiendo con lo indicado por otros autores que han estudiado este tipo de hongo (Canton *et al.*, 2002; Girmenia *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2009; Carrilo-Muñoz *et al.*, 2010; Guinea *et al.*, 2010).

En concordancia con estos resultados, los ensayos *in vivo* demostraron la eficacia de las diferentes dosis de posaconazol observándose los mejores resultados con la más alta de ellas (40 mg/kg día). El posaconazol fue capaz de prolongar la supervivencia de los animales en comparación con el grupo control y de reducir significativamente la carga fúngica en todos los órganos estudiados. En estudios previos, se probó la eficacia de otros fármacos como anfotericina B, flucitosina, fluconazol y voriconazol en una infección sistémica por *S. capitata* reproducida en un modelo murino, concluyendo que fluconazol a dosis altas fue el más eficaz (Serena *et al.*, 2007). Siendo este resultado comparable al obtenido en el presente estudio con la dosis de 40 mg/kg día de posaconazol.

Por otro lado, se encontró una correlación entre la disminución de 1,3-β-D-Glucano, la carga fúngica y la dosis del fármaco utilizada. Lo que parece indicar que los niveles séricos de dicho marcador podrían ser de utilidad para evaluar el pronóstico de infecciones por *S. capitata*, pero se necesitan más estudios para confirmar este resultado.

Teniendo en cuenta la poca experiencia en el manejo de las infecciones sistémicas por *S. capitata* y el riesgo de resistencia adquirida al fluconazol y a las equinocandinas; antifúngicos comúnmente utilizados de forma empírica para prevenir o tratar las infecciones por otros hongos, en pacientes con neoplasias hematológicas (Villa-lopez *et al.*, 2013). Nuestros resultados pueden ser considerados de especial interés, ya que además de su demostrada eficacia en esta infección de difícil tratamiento el posaconazol suele ser un compuesto bien tolerado por los pacientes.

## 5.2. *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii*

En las últimas décadas, *C. albidus* y *C. laurentii* se han asociado con infecciones humanas en pacientes inmunocomprometidos. En general el tratamiento de elección frente a la criptococosis se basa en la utilización de anfotericina B con o sin flucitosina; seguido de fluconazol; con tasas variable de curación y de fallo. Por otra parte, dichos fármacos presentan una elevada toxicidad, como la anfotericina B y la flucitosina, o una limitada actividad o resistencia, como el fluconazol, a las especies del género *Cryptococcus* spp. Los nuevos azoles tales como voriconazol y posaconazol, han demostrado ser activos y eficaces contra *C. albidus* y *C. laurentii*. Sin embargo, la experiencia clínica con dichos fármacos es escasa (Averbuch *et al.*, 2002; Bernal-Martínez *et al.*, 2010).

En este estudio, flucitocina, anfotericina B y voriconazol mostraron las concentraciones mínimas inhibitorias más bajas contra todos los aislados ensayados, siendo esta información similar a lo publicados por otros autores, quienes señalan a anfotericina B como la droga más activa (Serena *et al.*, 2004; Bernal-Martínez *et al.*, 2010; Teodoro *et al.*, 2013). En cambio, fluconazol mostró ser resistente frente a los

aislados de *C. albidus* y *C. laurentii*, coincidiendo con información previamente publicada (García-Martos *et al.*, 2002, Serena *et al.*, 2004).

Los resultados *in vitro* de las combinaciones de anfotericina B asociada a voriconazol muestran un efecto de aditivo o de sinergismo frente a todas las cepas de *C. albidus* y *C. laurentii* estudiadas. Mientras que, anfotericina B más fluconazol muestran indiferencia o antagonismo. Anteriormente, otros autores han obtenido resultados similares usando la combinación de anfotericina B más fluconazol o anfotericina B más voriconazol frente a aislados de *C. neoformans* o *Sarocladium kiliense* respectivamente (Barchiesi *et al.*, 2000; Fernández-Silva *et al.*, 2014). Por el contrario, otros informes, señalan que el uso de anfotericina B y azoles son todavía un tema controvertido por el potencial antagonismo demostrado en estudios *in vitro* (Sugar, 1995; Barchiesi *et al.*, 2000).

Los resultados *in vitro* de la combinación anfotericina B más voriconazol, fueron confirmados en un modelo murino de infección sistémica causada por *C. albidus* y *C. laurentii*. Mostrando que la terapia de combinación fue más eficaz que anfotericina B, fluconazol o voriconazol utilizados en monoterapia. Esto coincide con lo informado previamente por Serena *et al.* y Gazzoni *et al.*, donde demuestran exitosamente la eficacia de anfotericina B más voriconazol en modelos murinos de infección del SNC causada por *C. neoformans* (Serena *et al.*, 2007; Gazzoni *et al.*, 2012). Asimismo, lo indican Silva *et al.* al demostrar la eficacia de esta combinación en un modelo de infección pulmonar causada por *C. neoformans* (Silva *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, existen escasos datos clínicos disponibles que evalúen la interacción entre compuestos antifúngicos, con excepción de anfotericina B asociada a flucitosina o fluconazol para el tratamiento de micosis sistémicas graves causadas por *C.*

*albidus* y *C. laurentii* (Saag *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Perfect *et al.*, 2010; Gullo *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013; Conti *et al.*, 2015).

Los prometedores resultados obtenidos en este estudio con anfotericina B más voriconazol reflejados en la supervivencia de los animales, la reducción de la carga fúngica y características histopatológicas, hacen que estos compuestos merezcan ser consideradas dentro de la terapéutica en pacientes con infección sistémica causada por *C. albidus* y *C. laurentii*.

### **5.3. *Rhodotorula mucilaginosa***

Actualmente, *R. mucilaginosa* se considera un patógeno emergente que afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos. La fungemia asociada a catéteres, endocarditis, peritonitis, meningitis y endoftalmitis son las presentaciones más comunes (Tuon y Costa., 2008). Aunque no existen estudios prospectivos, anfotericina B se considera como el tratamiento de elección, sin embargo, la nefrotoxicidad y el alto fracaso terapéutico indican que deben ser exploradas otras opciones terapéuticas.

En el presente estudio, flucitosina y anfotericina B fueron los fármacos más activos seguidos de voriconazol y posaconazol, siendo estos resultados concordantes con lo publicado con anterioridad (Preney *et al.*, 2003; Zaas *et al.*, 2003; Diekema *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 2004; Gómez-López *et al.*, 2005; Núñez *et al.*, 2013). En cambio, anfotericina B, fluconazol y equinocandinas fueron inactivos contra *R. mucilaginosa*, consistente con estudios previos realizados con esta especie, (Barchiesi *et al.*, 2000; Preney *et al.*, 2003; Zaas *et al.*, 2003; Serena *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2004; Gómez-López *et al.*, 2005; Núñez *et al.*, 2013) y con otras levaduras de la familia

*Cryptococcaceae*, tales como *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra* o *Trichosporon beigeli* (Espinel-Ingroff, 1998; Zaas *et al.*, 2003; Pfaller *et al.*, 2004).

El estudio de virulencia demostró, que la infección realizada en ratones con los diferentes inóculos del hongo fue difundida a todos los órganos estudiados de manera dependiente del tamaño del inóculo. Así mismo, se demostró la capacidad de *R. mucilaginosa* de llegar a cerebro, atravesando la barrera hematoencefálica. Esto explicaría la afectación del sistema nervioso central en pacientes con fungemia causada por *R. mucilaginosa* (Capoor *et al.*, 2014; Tsiodras *et al.*, 2014; Mohd *et al.*, 2015). Contrariamente a nuestros resultados, experimentos previos realizados en ratas mostraron al hígado como órgano más afectado (Wirth y Goldani, 2011). Sin embargo, en este estudio no se analizó el cerebro, por lo que nuestro modelo animal reproduce mejor lo que se observa en la clínica (Toun & Costa, 2008). Hasta la fecha, no hay evidencia científica disponible para explicar el rol patogénico de *R. mucilaginosa* asociado a meningitis (Mohd *et al.*, 2015).

El estudio de eficacia, llevado a cabo con el inóculo de  $2.5 \times 10^7$  UFC/animal mostró que anfotericina B, voriconazol o posaconazol fueron efectivos, lo cual fue reflejado en la disminución de la carga fúngica encontrada en los órganos de los animales en comparación con el grupo control. Aunque no existen estudios previos de infección *in vivo*, que evalúen la eficacia de estos fármacos contra infecciones producidas por *R. mucilaginosa*; existen algunos realizados con otras levaduras taxonómicamente relacionadas, donde fue demostrada la eficacia de anfotericina B, voriconazol o posaconazol (Mavrogiorgos *et al.*, 2006; Calvo *et al.*, 2010). La información clínica sobre el uso de estas terapias es limitada y junto al uso de posaconazol requiere de futuras investigaciones.

Nuestro estudio demostró la actividad *in vitro* de flucitosina, anfotericina B, voriconazol y posaconazol frente a aislados de *R. mucilaginosa* y la eficacia de estos fármacos en una infección sistémica invasiva por *R. mucilaginosa* en ratón neutropénico. Estos alentadores resultados indican que estos fármacos, podrían considerarse en el tratamiento de infecciones sistémicas por esta especie.

#### **5.4. *Saccharomyces cerevisiae***

Se evaluó la actividad *in vitro*, curvas de mortalidad y la eficacia *in vivo* de anfotericina B, voriconazol y anidulafungina contra tres cepas de *S. cerevisiae*.

En el presente estudio flucitosina, anfotericina B y equinocandinas fueron los fármacos más activos seguido de voriconazol, siendo estos resultados concordantes con otros autores (Thompson *et al.*, 2009; Castanheira, 2012; Pfaller *et al.*, 2013; Minea *et al.*, 2015; Seddik *et al.*, 2015). Por otro lado, fluconazol fue inactivo frente a los aislados de *S. cerevisiae*, concordando con estudios previos (Quindós *et al.*, 2004, Castanheira, 2012; Pfaller *et al.*, 2013; Minea *et al.*, 2015; Sanglad *et al.*, 2015). A pesar de esta información, fluconazol, ha sido utilizado en el tratamiento de infección urinaria y fungemia causada por *S. cerevisiae*, mostrando resultados variables (Muñoz *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2013; Popiel *et al.*, 2015; Elkhinhal *et al.*, 2015). Por otro lado, hay tres casos clínicos de infección diseminada por *S. cerevisiae* tratados exitosamente con equinocandinas (Lolis *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2012; Popiel *et al.*, 2015).

Las tres terapias utilizadas en esta investigación, mostraron eficacia tras la infección sistémica por *S. cerevisiae*, todos los tratamientos fueron capaces de reducir significativamente la carga fúngica en los animales infectados en comparación con sus respectivos controles. Anfotericina B y anidulafungina mostraron mejor eficacia, esto

podría ser debido a la actividad fungicida de dichos fármacos contra *S. cerevisiae* en dos de las cepas estudiadas. Este fenómeno se ha informado de forma similar por otros autores que evaluaron anfotericina B y anidulafungina contra cepas de *C. guilliermondii* (Paredes et al., 2015). Así mismo, la actividad fungistática de voriconazol demostrada en este estudio, se ha informado anteriormente por Sanchis *et al.*, frente a cepas de *C. glabrata* (Sanchis *et al.*, 2016).

En la actualidad, no existen estudios previos de eficacia que evalúen anfotericina B, voriconazol o anidulafungina frente a una infección sistémica por *S. cerevisiae*. Sin embargo, la eficacia de estos fármacos ha sido reportada previamente en infecciones sistémicas realizadas con otras levaduras taxonómicamente relacionadas (Marine *et al.*, 2005; Marine *et al.*, 2009; Dimopolou *et al.*, 2014).

Este trabajo muestra el primer modelo animal de infección sistémica por *S. cerevisiae* junto a la eficacia de la terapia antifúngica con anfotericina B, voriconazol y anidulafungina. Nuestros resultados indican que los tres agentes antifúngicos fueron eficaces en el tratamiento de la infección sistémica por *S. cerevisiae*. Sin embargo, anfotericina B y anidulafungina mostraron ser más eficaces en dos de las tres cepas ensayadas. Estos prometedores resultados, demuestran que estos fármacos pueden ser considerados para el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por *S. cerevisiae*.

---

CONCLUSIONES



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

## 6. Conclusiones

**6.1. Se ha evaluado la actividad *in vitro* del posaconazol frente a seis aislados de *Saprochaete capitata* y se desarrolló un modelo de infección diseminada por *S. capitata* para evaluar su eficacia *in vivo*.**

- Se observó una buena actividad antifúngica del posaconazol frente a todas las cepas estudiadas.
- Las curvas de mortalidad realizadas con posaconazol mostraron actividad fungistática frente a los aislados de *S. capitata*.
- El posaconazol demostró ser eficaz a diferentes dosis frente a un modelo de infección experimental por *S. capiata*. Esto quedó demostrado con los resultados de supervivencia, carga fúngica e histopatología.
- Los niveles séricos de las diferentes dosis de posaconazol evaluados al final del tratamiento fueron superiores a los valores de su correspondiente concentración mínima inhibitoria.
- La determinación de los niveles séricos del 1, 3-β-D Glucano demostraron ser útiles como marcador de infección por *S. capitata*

**6.2. Se ha estudiado la actividad *in vitro* de anfotericina B, fluconazol y voriconazol frente a diferentes cepas de *C. albidus* y *C. laurentii*. Así mismo, se evaluó la eficacia *in vivo* de los tres fármacos en monoterapia y la combinación de anfotericina B más voriconazol en un modelo de criptococosis diseminada en el ratón inmunocomprometido.**

- La anfotericina B y voriconazol presentaron buena actividad frente a todos los aislados. Contrariamente, fluconazol mostró escasa actividad reflejada en elevadas concentraciones inhibitorias mínimas.
- En base a los resultados de nuestros estudios *in vitro*, las interacciones entre anfotericina B y voriconazol dieron lugar a sinergismo o adición en todas las cepas estudiadas. Mientras que, anfotericina B asociada a fluconazol mostraron indiferencia en la mayoría las cepas probadas.
- Las tres monoterapias evaluadas *in vivo* demostraron ser eficaces. Sin embargo, la combinación de anfotericina B con voriconazol resultó ser significativamente mejor que cualquiera de ellas.
- Los niveles séricos de los antifúngicos evaluados al final del tratamiento fueron superiores a los valores de su correspondiente concentración mínima inhibitoria con la excepción de fluconazol en dos cepas de *C. albidus*.
- El estudio histopatológico corroboró que en los ratones que recibieron las diferentes monoterapias, disminuyó el número de células fúngicas, junto con la

invasión del tejido y focos de hemorragia en los órganos estudiados. El uso de la combinación de anfotericina B más voriconazol dio lugar a la ausencia de células fúngicas y ausencia del daño tisular en todos los órganos estudiados.

**6.3. Se ha investigado la actividad *in vitro* de anfotericina B, flucitosina, itraconazol, posaconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina y micafungina frente a cepas de *R. mucilaginosa*. También se ha determinado la virulencia en un modelo de infección sistémica por *R. mucilaginosa* y se ha probado la eficacia de anfotericina B, voriconazol y posaconazol en un modelo de infección sistémica por *R. mucilaginosa* en ratón inmunodeprimido.**

- Los resultados *in vitro* demostraron que flucitosina, seguido de anfotericina B, voriconazol y posaconazol fueron los fármacos más activos frente a todos los aislados. Nuestros resultados confirman que el fluconazol y las equinocandinas; especialmente anidulafungina, no posee actividad *in vitro* frente a las cepas de *R. mucilaginosa* ensayadas.
- Las curvas de mortalidad realizadas con anfotericina B, voriconazol y posaconazol mostraron actividad fungicida para anfotericina B y fungistática para los dos azoles probados, frente a los aislados de *R. mucilaginosa*.
- Con el modelo de virulencia desarrollado se demostró que el inóculo adecuado para generar una infección aguda por *R. mucilaginosa* en un ratón neutropénico fue de  $2.5 \times 10^7$  UFC/animal.

Los niveles séricos de anfotericina B, voriconazol y posaconazol evaluados al final de la terapia fueron superiores a los valores de su correspondiente concentración mínima inhibitoria.

- Los estudios de eficacia *in vivo*, indican que los tres antifúngicos utilizados son igualmente efectivos en la infección sistémica producida por *R. mucilaginosa*.

**6.4. Se ha evaluado la actividad *in vitro* de anfotericina B, flucitosina, itraconazol, posaconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina y micafungina frente a cepas de *S. cerevisiae*. Se ha determinado la virulencia en un modelo de infección sistémica por *S. cerevisiae* y se ha probado la eficacia de anfotericina B liposomal, voriconazol y anidulafungina en un modelo de infección sistémica por *S. cerevisiae* en ratón inmunodeprimido.**

- Los resultados *in vitro* demostraron buena actividad para flucitosina, anfotericina B, azoles y equinocandinas en general y que fluconazol no tiene actividad frente a los aislados ensayados.
- Las curvas de mortalidad realizadas con anfotericina B, anidulafungina y voriconazol mostraron actividad fungicida para anfotericina B anidulafungina, mientras que para voriconazol fue fungistática.

- Con el modelo de virulencia se estableció que el inóculo adecuado para generar una infección aguda por *S. cerevisiae* en el ratón neutropénico fue de  $5 \times 10^7$  UFC/animal.
  
- Los niveles séricos de los fármacos utilizados evaluados al final de la terapia fueron superior a los valores de su correspondiente concentración mínima inhibitoria.
  
- Los estudios de eficacia *in vivo*, indican que anfotericina B liposomal, voriconazol y anidulafungina fueron efectivos contra una infección sistémica producida por *S. cerevisiae*. Sin embargo, los dos primeros antifúngicos resultaron ser significativamente mejores que voriconazol en la mayoría de las cepas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

---

## BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ACTIVIDAD Y EFICACIA EXPERIMENTAL DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A LEVADURAS CAUSANTES DE MICOSIS SISTÉMICAS

Pamela Evelyn Thomson Morales

## 7. Bibliografía

**-Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL.** 2015. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology Rev Inst Med Trop Sao Paulo 19: 57-64.

**-Al-Nakeeb Z, Petraitis V, Goodwin J, Petraitiene R, Walsh TJ, Hope WW.** 2015. Pharmacodynamics of amphotericin B deoxycholate, amphotericin B lipid complex, and liposomal amphotericin B against *Aspergillus fumigatus* Antimicrob Agents Chemother 59: 2735-2345.

**-Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J.** 2015. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. Expert Rev Anti Infect Ther 13: 787-798.

**-Ameen M.** 2010. Epidemiology of superficial fungal infections. Clin Dermatol 28: 197-201.

**-Ananda-Rajah MR, Grigg A, Downey MT, Bajel A, Spelman T, Cheng A, Thursky KT, Vincent J, Slavin MA.** 2012. Comparative clinical effectiveness of prophylactic voriconazole/posaconazole to fluconazole/itraconazole in patients with acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome undergoing cytotoxic chemotherapy over a 12-year period. Haematologica 97: 459-463.

**-Arenas R, Moreno-Coutiño G, Welsh O.** 2012. Classification of subcutaneous and systemic mycoses. Clin Dermatol 30: 369-371.

**-Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; European Confederation of Medical Mycology.** 2014. ESCMID and

ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. Clin Microbiol Infect 20: 76-98.

**-Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM.** 2014. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the british society for medical mycology. J Antimicrob Chemother 69: 1162-1176.

**-Averbuch D, Boekhout T, Falk R, Engelhard D, Shapiro M, Block C, Polacheck I.** 2002. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. Med Mycol 40: 275-278.

**-Basetti S, Frei R, Zimmerli W.** 1998. Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii*. Am J Med 105: 71-72.

**-Baradkar VP, Kumar S.** 2008. Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in human immunodeficiency virus seropositive patient. Ann Indian Acad Neurol 11: 245-247.

**-Barchiesi F, Arzeni D, Fothergill A, Di Francesco L, Caselli F, Rinaldi M, Scalise G.** 2000. *In vitro* activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens. Antimicrob Agents Chemother 44: 226-229.

**-Banerjee P, Haider M, Trehan V, Mishra B, Thakur A, Dogra V, Loomba P.** 2013. *Cryptococcus laurentii* fungemia. Indian J Med Microbiol 31: 75-77.

**-Bhat R, Monteiro R, Bala N, Dandakeri S, Martis J, Kamath G, Kambil S, Vadakayil R.** 2016. Tropical medicine rounds subcutaneous mycoses in coastal Karnataka in south India. Intern J Dermatol 55: 70-78.

**-Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Castelli MV.** 2010. Susceptibility profile of clinical isolates of non-*Cryptococcus neoformans*/non-*Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. Med Mycol 48: 90-96.

- Birrenbach T, Bertschy S, Aebersold F.** 2012. Emergence of *Blastoschizomyces capitatus* yeast infections, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 18: 98-101.
- Biswas SK, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M.** 2001. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1191-1199.
- Boekhout T, Gueidan C, de Hoog S, Samson R, Varga J, Walther G.** 2009. Fungal taxonomy: new developments in medically important fungi. *Curr Fungal Infect Rep* 3: 170-178.
- Bovers M, Diaz MR, Hagen F.** 2007. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol* 45: 1874-1883.
- Budhavari S.** 2009. What's is new in diagnostic?: Fungitel: 1,3 Beta-D glucan assay. *South Afr J Epidemiol Infect* 24: 37-41.
- Burnik C, Altintas ND, Ozkaya G.** 2007. Acute respiratory distress syndrome due to *Cryptococcus alboidus* pneumonia: case report and review of the literature. *Med Mycol* 45: 469-473.
- Cagnoni PJ.** 2002. Liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother* 49: 81-86.
- Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM, Pujol I, Guarro J.** 2010. Antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4074-4077.

- Calvo E, Pastor FJ, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Salas V, Guarro J.** 2012. Are epidemiologic cut-off values predictors of the *in vivo* efficacy of azoles in experimental aspergillosis?. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74: 158-165.
- Canelo C, Casquero J.** 2000. Fenoloxidasa modificada: clave para identificar cepas de *Cryptococcus neoformans*. *Rev Med Exp* 17: 1-4.
- Cano J, Guarro J, Gené J.** 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 42: 2450-2454.
- Cantón E, Pemán J, Orero A, Viudes A, Gil J, Rubio MC, Gobernado M.** 2002. *In vitro* activity of posaconazole against yeasts isolated in blood cultures. *Rev Esp Quimioter* 15: 335-340.
- Cantón E, Martín-Mazuelos E, Espinel-Ingroff A.** Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC (Eds.). *Identificación y diagnóstico en micología clínica*. 2ª ed. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, España. 2007.
- Cantón E, Pemán J, Sastre M, Romero M, Espinel-Ingroff A.** 2006. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2829-2832.
- Capilla J, Clemons KV, Stevens DA.** 2007. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol* 45: 657-684.
- Capoor MR, Aggarwal S, Raghvan C, Gupta DK, Jain AK, Chaudhary R.** 2014. Clinical and microbiological characteristics of *Rhodotorula mucilaginosa* infections in a tertiary-care facility. *Indian J Med Microbiol* 32: 304-309.

- Carrillo- Muñoz J, Tur-Tur C, Hernández-Molina J, Quindós G, Marcos-Arias C, Eraso E, Cárdenes D, Ortiz-Maestro O, Santos P, Estivill D, Guardia C, Giusiano G.** 2010. Antifungal activity of posaconazole against *Candida* spp. and non-*Candida* clinical yeasts isolates. *Rev Esp Quimioter* 23: 122-125.
- Carrillo-Muñoz AJ, Pemán J, Gobernado M.** 1999. New antifungals drugs. Present and future. *Rev Esp Quimioter* 12: 181-120.
- Casadevall A, Pirofski L.** 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 184: 337-344.
- Castanheira M, Messer SA, Jones RN, Farrell DJ, Pfaller MA.** 2014. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. *Int J Antimicrob Agents* 44: 320-326.
- Catalan M, Montejo J C.** 2006. Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Rev Iberoam Micol* 23: 39-49.
- Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A.** 2012. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin Microbiol Infect* 18: 1229-1235.
- Chae H, Cho SY, Yu H, Cha K, Lee S, Kim M, Kim Y, Kim YJ, Kim HJ, Lee DG.** 2015. Determination of posaconazole concentration with LC-MS/MS in adult patients with hematologic malignancy. *Clin Chim Acta* 23: 220-226.
- Cheng M F, Chiou C C, Liu Y C, Wang H Z, Hsieh K S.** 2001. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J Clin Microbiol* 39: 1608-1611.

**-Chiller T M, Capilla J, Sobel R A, Farrokhshad K, Clemons K V, Stevens D A.**

2002. Development of a murine model of cerebral aspergillosis. *J Infect Dis* 186: 574-577.

**-Cho SY, Lee DG, Choi JK, Lee HJ, Kim SH, Park SH, Choi SM, Choi JH, Yoo JH,**

**Kim YJ, Kim HJ, Min WS, Back H, Kang S, Lee EK.** 2015. Cost-benefit analysis of posaconazole versus fluconazole or itraconazole as a primary antifungal prophylaxis in high-risk hematologic patients: a propensity score-matched. *Analysis Clin Ther* 1: 2019-2027.

**-Choi G, Meijer SL, Hazenberg MD.** 2012. Disseminated bread yeast fungaemia in a

baker's wife with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 158: 298-301.

**-Christakis G, Perlourentzou S, Aslanidou M, Megalaki A, Velegraki A.** 2005. Fatal

*Blastoschizomyces capitatus* sepsis in a neutropenic patient with acute myeloid leukemia: first documented case from Greece. *Mycoses* 48: 216-220.

**-Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP.**

2012. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect* 64: 68-75.

**-Clemons K, Stevens D.** 2006. Animal models testing monotherapy versus combination

antifungal therapy: lessons learned and future directions. *Curr Opin Infect Dis* 19: 360-364.

**-Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008<sup>a</sup>.** Reference method for broth

dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed.

CLSI, Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.

**-Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008<sup>b</sup>.** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved standard M44-A2, 2nd ed. CLSI, Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.

**-Conti F, Spinelli FR, Colafrancesco S, Truglia S, Ceccarelli F, Fattapposta F, Sorice M, Capozzi A, Ferretti G, Priori R, Martinelli F, Pirone C, Alessandri C, Valesini G.** 2015. Acute longitudinal myelitis following *Cryptococcus laurentii* pneumonia in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 24: 94-97.

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

**-Cuenca-Estrella M.** 2010. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Rev Esp Quimioter* 23: 169-176.

**-Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL.** 2010 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* 8: 267-276.

**-Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A, Gómez-López A y Monzón A.** 2013. Estudios de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 3: 53-58.

**-Cuétara MS, Alhambra A, Moragues MD, González-Elorza E, Pontón J, del Palacio A.** 2009. Detection of (1-3)-beta-D-glucan as an adjunct to diagnosis in a mixed population with uncommon proven invasive fungal diseases or with an unusual clinical presentation. *Clin Vaccine Immunol* 16: 423-426.



- Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F.** 2004. *In vitro* evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 970-978.
- deAlmeida GM, Costa SF, Melhem M, Motta AL, Szeszs MW, Miyashita F, Pierrotti LC, Rossi F, Burattini MN.** 2008. *Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. *Med Mycol* 46: 547-556.
- deHoog 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.
- deLlanos R, Querol A, Peman J, Gobernado M, Fernandez-Espinar MT.** 2006. Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *Int J Food Microbiol* 110: 286-290.
- deMaio J, Colman L.** 2000. The use of adjuvant interferon- $\gamma$  therapy for hepatosplenic *Blastoschizomyces capitatus* infection in a patient with leukemia. *Clin Infect Dis* 31: 822-824.
- deSarro A, La Camera E, Fera MT.** 2008. New and investigational triazole agents for the treatment of invasive fungal infections. *J Chemother* 20: 661-671.
- deWet N, Llanos-Cuentas A, Suleiman J, Baraldi E, Krantz EF, Della Negra M, Diekmann-Berndt H.** 2004. 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* 39: 842-849.
- Díaz-Pedroche C, Lumbreras C, Del Valle P, San Juan R, Hernando S, Folgueira D, Andrés A, Delgado J, Meneu JC, Morales JM, Moreno E, Aguado JM.** 2005.

Efficacy and safety of valgancyclovir as preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Transplant Proc* 37: 3766-3767.

**-Diekema DJ, Petroelje B, Messer SA, Hollis RJ, Pfaller MA.** 2005. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *J Clin Microbiol* 43: 476-478.

**-Dimopoulou D, Hamilos G, Tzardi M, Lewis RE, Samonis G, Kontoyiannis DP.** 2014. Anidulafungin versus caspofungin in a mouse model of candidiasis caused by anidulafungin-susceptible *Candida parapsilosis* isolates with different degrees of caspofungin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 229-236.

**-Dodds E, Johnson M.** Combination antifungal therapy. En: *Essential of clinical mycology*: 2nd ed. Kauffman C, Sobel J, Pappas P, Dismukes W (Eds). Springer Science. 2011.

**-Drew RH, Townsend ML, Pound MW.** 2013. Recent advances in the treatment of life-threatening, invasive fungal infections. *Expert Opin Pharmacother* 14: 2361-2370.

**-Edwards-Ingram LC, Gent ME, Hoyle DC, Hayes A, Stateva LI, Oliver SG.** 2004. Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Res* 14 1043-1051.

**-Elkhihal B, Elhalimi M, Ghfir B, Mostachi A, Lyagoubi M, Aoufi S.** 2015. Urinary infection by *Saccharomyces cerevisiae*: Emerging yeast?. *J Mycol Med* 25: 303-305.

**-Enoch D, Ludlam H, Brown N.** 2006. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 55: 809-818.

**-Enache-Angoulvant A, Hennequin C.** 2005. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin Infect Dis* 41: 1559-1568.

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

**-Espinel-Ingroff A.** 1998. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol* 36: 2950-2956.

**-Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, Rinaldi MG, Canton E, Turnidge J .** 2010. 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* 48: 3251-3257.

**-Fernández-Silva F, Capilla J, Mayayo E, Sutton D, Guarro J.** 2014. Combination therapy in the treatment of experimental invasive fungal infection by *Sarocladium (Acremonium) kiliense*. *Int J Antimicrob Agents* 44:136-139.

**-Ferrer R, Gómez de la Cámara A, Jarque I, Quindós G, Tejerina T.** 2013. Estudio comparativo multidisciplinar de las equinocandinas, anidulafungina, caspofungina y micafungina. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica* 11: 146-159.

**-Firacative C, Trilles L, Meyer W.** 2012. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PLOS ONE* 7: e37566.

- Fores R, Ramos A, Orden B et al.** 2012. *Rhodotorula* species fungaemia causes low mortality in haematopoietic stem-cell transplantation. A case report and review. *Mycoses* 55: 158-162.
- Fortún J.** 2011. Antifungal therapy update: new drugs and medical uses. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29: 38-44.
- Gadea I, Cuenca-Estrella M, Prieto E.** 2004. Genotyping and antifungal susceptibility profile of *Dipodascus capitatus* isolates causing disseminated infection in seven hematological patients of a tertiary hospital. *J Clin Microbiol* 42: 1832-1836.
- Garcia-Martos P, Noval JF, Garcia-Tapia A, Marin P, Puerto JL, Sepulveda A.** 2002. Susceptibility to antifungal agents of *Cryptococcus* species of clinical interest. *Med Clin* 119: 211-213.
- García-Ruiz JC, López-Soria L, Olazábal I, Amutio E, Arrieta-Aguirre I, Velasco-Benito V, Pontón J, Moragues M.** 2013. Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with haematological malignancies: Report of five cases and review of the antifungal therapy *Rev Iberoam Micol* 30: 248-255.
- Garcia-Suarez J, Gomez-Herruz P, Cuadros JA, Burgaleta C.** 2011<sup>b</sup>. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients. *Mycoses* 54: 318-324.
- Garcia-Suarez J, Gomez-Herruz P, Cuadros JA, Guillen H, Burgaleta C.** 2011<sup>a</sup>. *Rhodotorula mucilaginosa* catheter-related fungaemia in a patient with multiple myeloma. *Mycoses* 54: 214-216.
- Graybill JR.** 1983. Antifungal agents used in systemic mycoses: activity and therapeutic use. *Drugs* 25: 41-62.

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

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

**-Gazzoni AF, Capilla J, Mayayo E, Guarro J.** 2012. Efficacy of intrathecal administration of liposomal amphotericin B combined with voriconazole in a murine model of cryptococcal meningitis. *Int J Antimicrob Agents* 39: 223-227.

**-Gavalda J, Ruiz I.** 2003. Guidelines for the treatment of invasive fungal infection. Invasive fungal infection by *Candida* spp. invasive fungal infection study group (MICOMED) and Infection in transplantation study group (GESITRA) of the spanish society for infectious diseases and clinical microbiology (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21: 498-508.

**-Ghosh A, Tilak R, Bhushan R, Dhameja N, Chakravarty J.** 2015. Lymphnodal co-infection of *Cryptococcus* and *Histoplasma* in a HIV-infected patient and review of published reports. *Mycopathologia* 180: 105-111.

**-Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 43: 4930-4942.

**-Girmenia C, Pagano L, Martino B.** 2005. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol* 43: 1818-1828.

- Girmania C, Pizzarelli G, D'Antonio D, Cristini F, Martino P.** 2003. *In vitro* susceptibility testing of *Geotrichum capitatum*: comparison of the E-test, disk diffusion, and Sensititre colorimetric methods with the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3985-3988.
- Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M.** 2005. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. *J Antimicrob Chemother* 55: 312-316.
- Greuter W, Ranquín Rodriguez R.** Código internacional de nomenclatura para algas, hongos y plantas. Real Jardín Botánico. CSIC. Madrid, España. 2012.
- Guarro J.** 2011. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 66: 1447-1466.
- Guinea J, Recio S, Escribano P, Peláez T, Gama B, Bouza E.** 2010. *In vitro* antifungal activities of isavuconazole and comparators against rare yeast pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4012-4015.
- Gullo FP, Rossi SA, Sardi Jde C, Teodoro VL, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM.** 2013. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32: 1377-1379.
- Hamoud S, Keidar Z, Hayek T.** 2011. Recurrent *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an otherwise healthy patient. *Isr Med Assoc J* 13: 575-576.
- Hawksworth DL, Crous P, Redhead SA, Reynolds DR, Samson RA, Seifert KA, Taylor J, Wingfield MJ, Abaci O, Aime C, Asan A, Bai FY, de Beer ZW, Begerow D, Berikten D, Boekhout T, Buchanan PK, Burgess T, Buzina W, Cai L, Cannon PF, Crane JL, Damm U, Daniel HM, van Diepeningen AD, Druzhinina I, Dyer PS,**

**Eberhardt U, Fell JW, Frisvad JC, Geiser DM, Geml J, Glienke C, Gräfenhan T, Groenewald JZ, Groenewald M, de Gruyter J, Guého-Kellermann E, Guo LD, Hibbett DS, Hong SB, de Hoog GS, Houbroken J, Huhndorf SM, Hyde KD, Ismail A, Johnston PR, Kadaifciler DG, Kirk PM, Kõljalg U, Kurtzman CP, Lagneau PE, Lévesque CA, Liu X, Lombard L, Meyer W, Miller A, Minter DW, Najafzadeh MJ, Norvell L, Ozerskaya SM, Oziç R, Pennycook SR, Peterson SW, Pettersson OV, Quaedvlieg W, Robert VA, Ruibal C, Schnürer J, Schroers HJ, Shivas R, Slippers B, Spiereburg H, Takashima M, Taşkın E, Thines M, Thrane U, Uztan AH, van Raak M, Varga J, Vasco A, Verkley G, Videira SI, de Vries RP, Weir BS, Yilmaz N, Yurkov A, Zhang N. 2011. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. IMA Fungus 2: 105-112.**

**-Herbrecht R, Nivoix Y. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an adverse effect of *Saccharomyces boulardii* probiotic administration. Clin Infect Dis 40: 1635-1637.**

**-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.** 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Myc Res* 3: 509-547.

**-Hinrichsen L, Di Masso R.** 2010. Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. *J Basic Appl Genet* 21: 1-12.

**-Ikuta K, Torimoto Y, Yamamoto M, Okamura N, Hosoki T, Sato K, Fujiya M, Kohgo Y.** 2010. Successful treatment of systemic *Geotrichum capitatum* infection by liposomal amphotericin B, itraconazole and voriconazole in a japanese man. *Intern Med* 49: 2499-2503.

**-Johnson EM.** 2008. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 61: 13-18.

**-Johnson MD, Perfect JR.** 2010. Use of antifungal combination therapy: agents, order, and timing. *Curr Fungal Infect Rep* 4: 87-89.

**-Johnson M, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect J, Rex J.** 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 693-715.

**-Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM.** 2007. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* 35: 51-58.

**-Kiehn TE, Gorey E, Brown AE, Edwards FF, Armstrong D.** 1992. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis* 14: 841-846.

**-Kim HA, Hyun M, Ryu SY.** 2013. Catheter-Associated *Rhodotorula mucilaginosa* Fungemia in an immunocompetent host. *Infect Chemother* 45: 339-342.



**-Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA.** 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1207-1212.

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

**-Kuklinska F, Naumnik B, Mysliwiec M.** 2009. Fungemia due to *Cryptococcus laurentii* as a complication of immunosuppressive therapy-a case report. *Adv Med Sci* 54: 116-119.

**-Kulkarni A, Sinha M, Anandh U.** 2012. Primary cutaneous *Cryptococcus laurentii* in a renal transplant recipient. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 23: 102-105.

**-LaHoz RM, Baddeley JW.** 2012. Subcutaneous fungal infections. *Curr Infect Dis Rep* 14: 530-539.

**-Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN.** 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol* 26: 223-227.

**-Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A.** 2010. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 53: 1-11

**-Liu Y, Ma S, Wang X, Xu W, Tang X.** 2014. *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV- patient and literature review. *Med Mycol Case Reports* 3: 8-10.

**-Lolis N, Veldekis D, Moraitou H.** 2008. *Saccharomyces boulardii* fungaemia in an intensive care unit patient treated with caspofungin. *Crit Care* 12: 414-417.

**-Lo Re V, Fishman NO, Nachamkin I.** 2003. Recurrent catheter-related *Rhodotorula rubra* infection. *Clin Microbiol Infect* 9: 897-900.

- Loyse A, Wilson D, Meintjes G, Jarvis JN, Bicanic T, Bishop L, Rebe K, Williams A, Jaffar S, Bekker LG, Wood R, Harrison TS.** 2012. Comparison of the early fungicidal activity of high-dose fluconazole, voriconazole, and flucytosine as second-line drugs given in combination with amphotericin B for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 54: 121-128.
- Lunardi LW, Aquino VR, Zimmerman RA, Goldani LZ.** 2006. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis* 43: 60-63.
- Maertens JA.** 2004. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 10: 1-10.
- Mariné M, Espada R, Torrado J, Pastor FJ, Guarro J.** 2008. Efficacy of a new formulation of amphotericin B in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother* 6: 880-883.
- Mariné M, Espada R, Torrado J, Pastor FJ, Guarro J.** 2009. Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*. *Int J Antimicrob Agents* 34: 566-569.
- Martino R, Salavert M, Parody R.** 2004. *Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases. *Clin Infect Dis* 38: 335-341.
- Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R.** 2015. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 162: 81-89.
- Mavrogiorgos N, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD.** 2006. Efficacy of voriconazole in experimental *Cryptococcus neoformans* infection. *Mycopathologia* 162: 111-114.

- Mazzocato S, Marchionni E, Fothergill AW, Sutton DA, Staffolani S, Gesuita R, Skrami E, Fiorentini A, Manso E, Barchiesi F.** 2015. Epidemiology and outcome of systemic infections due to *Saprochaete capitata*: case report and review of the literature. *Infection* 43: 211-215.
- McCurdy LH, Morrow JD.** 2003. Infections due to non-neoformans cryptococcal species. *Compr Ther* 29: 95-101.
- McLaughlin D, Hibbett D, Lutzoni F, Spatafora J, Vilgalys R.** 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiol* 17: 488-497.
- Miceli MH, Diaz JA, Lee SA.** 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 11: 142-151.
- Minea B, Nastasa V, Moraru RF, Kolecka A, Flonta MM, Marincu I, Man A, Toma F, Lupse M, Doroftei B, Marangoci N, Pinteala M, Boekhout T, Mares M.** 2015. Species distribution and susceptibility profile to fluconazole, voriconazole and MXP-4509 of 551 clinical yeast isolates from a Romanian multi-centre study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2: 367-383.
- Mohd Nor F, Tan L, Na S, Ng K.** 2015. Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in HIV-infected patient: a case report and review of the literature. *Mycopathologia* 180: 95-98.
- Montes B, Restrepo A, McEwen.** 2003. Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *J Biomédica* 23: 213-224.
- Mori T, Nakamura Y, Kato J, Sugita K, Murata M, Kamei K, Okamoto S.** 2012. Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa* after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 14: 91-94.

- Muñoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella.** 2005. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. Clin Infect Dis 40: 1625-1634.
- Murray SC, Dawner RP.** 2002. Onychomycosis of toenails: orthopaedic and pediatric considerations. Australas J Dermatol 43: 105-112.
- Nagappan V, Deresinski S.** 2007. Reviews of anti-infective agents: posaconazole a broad-spectrum triazole antifungal agent. Clin Infect Dis 45: 1610-1617.
- Nunes JM, Bizerra FC, Ferreira RC, Colombo AL.** 2013. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. Antimicrob Agents Chemother 57: 382-389.
- Odds FC, Brown AJ, Gow NA.** 2003 Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol 11: 272-279.
- Pagano L, Cornely OA, Busca A.** 2013. Combined antifungal approach for the treatment of invasive mucormycosis in patients with hematologic diseases: a report from the SEIFEM and FUNGISCOPE registries. Haematologica 98: 127-130.
- Pan W, Liao W, Hagen F.** 2012. Meningitis caused by *Filobasidium uniguttulatum*: case report and overview of the literature. Mycoses 55: 105-109.
- Pang KR, Wu JJ, Huang DB, Tyring SK.** 2004. Subcutaneous ungal infections. Dermatol Ther 17: 523-531.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D.** 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis 48: 503-535.
- Parahym AM, Rolim PJ Neto, da Silva CM, Domingos IF, Gonçalves SS, Leite EP, de Moraes VL, Macêdo DP, de Lima RG Neto, Neves RP.** 2015. Invasive infection due

to *Saprochaete capitata* in a young patient with hematological malignancies. Braz J Microbiol 46: 527-530.

**-Paredes K, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Guarro J.** 2015. Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between in vitro antifungal pharmacodynamics and outcome. Rev Iberoam Micol 32: 34-39.

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

**-Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC.** 2006. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 239-243.

**-Pérez C, Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Roselló A, Colella MT, Olaizola C, Landaeta ME.** 2003. Preservation of *Cryptococcus* sp. with the Castellani method. Rev Soc Ven Microbiol 23: 153-157.

**-Pfaller MA.** 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med 125: 3-13.

**-Pfaller MA, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, Diekema D.** 2011<sup>a</sup>. Comparison of the broth microdilution methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical and Laboratory Standards Institute for testing itraconazole, posaconazole, and voriconazole against *Aspergillus* isolates. J Clin Microbiol 49: 1110-1112.

**-Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN.** 2010. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 48: 1592-1599.

**-Pfaller MA, Diekema DJ.** 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 42: 4419-4431.

**-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.** 2009. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazole as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 47: 3142-3146.

**-Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ.** 2011<sup>b</sup>. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *J Clin Microbiol* 49: 845-850.

**-Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN, Castanheira M.** 2013. *In vitro* activities of isavuconazole and comparator antifungal agents tested against a global collection of opportunistic yeasts and molds. *J Clin Microbiol* 5: 2608-2616.

**-Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH.** 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin Microbiol Rev* 17: 268-280.

**-Pfaller MA, Woosley L, Messer SA, Jones RN, Castanheira M.** 2012. Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeast and moulds in a Global Antifungal Surveillance Programme. *Mycopathologia* 174: 259-271.

**-Pemmaraju N, Shetty AV, Prieto VG, Jain N, Kontoyiannis DP, Borthakur G.** 2014. Disseminated *Saprochaete capitata* (formerly known as *Geotrichum capitatum* and *Blastoschizomyces capitatus*) in a patient with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 93: 543-544.

**-Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F.** 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 50: 291-322.

**-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.** 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of América. *Clin Infect Dis* 1: 291-322.

**-Perniola R, Faneschi ML, Manso E** 2006. *Rhodotorula mucilaginosa* outbreak in neonatal intensive care unit: microbiological features, clinical presentation, and analysis of related variables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25: 193-196.

**-Petrocheilou-Paschou V, Prifti H, Kostis E, Papadimitriou C, Dimopoulos MA, Stamatelopoulos S.** 2007. *Rhodotorula* septicemia: case report and minireview. *Clin Microbiol Infect* 7: 100-102.

- Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL.** 2005. Evaluation of a (1-3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 43: 5957-5962.
- Pontón J.** 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina *Rev Iberoam Micol* 25: 78-82.
- Pontón J.** 2009. Utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora. *Rev Iberoam Micol* 26: 8-14
- Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J, Quindós G.** Hongos y actinomicetos alérgicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. Bilbao, España. 2002.
- Popiel KY, Wong P, Lee MJ, Langelier M, Sheppard DC, Vinh DC.** 2015. Invasive *Saccharomyces cerevisiae* in a liver transplant patient: case report and review of infection in transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 17: 435-441.
- Posteraro B, Vella A, Cogliati M et al.** 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol* 50: 2472-2476.
- Preney L, Theraud M, Guiguen C, Gangneux JP.** 2003. Experimental evaluation of antifungal and antiseptic agents against *Rhodotorula* spp. *Mycoses* 46: 492-495.
- Pujol I, Guarro J, Sala J, Riba MD.** 1997. Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against *Fusarium*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 808-811.



- Quindós G, Ruesga MT, Martín-Mazuelos E, Salesa R, Alonso-Vargas R, Carrillo-Muñoz AJ, Brena S, San Millán R, Pontón J.** 2004. *In-vitro* activity of 5-fluorocytosine against 1021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. *Rev Iberoam Micol* 21: 63-69.
- Ramos A, Cabero M, Orden B, Ángel-Moreno A, Forés R.** 2012. Fungemia caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. Report of two cases. *Rev Esp Quimioter* 25: 76-78.
- Revankar SG, Graybill JR.** Antifungal therapy. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (Eds.). *Clinical Mycology*. Elsevier Science, USA. 2003.
- Rex J, Pfaller M.** 2002. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis* 35: 982-989.
- Riedel DJ, Johnson JK, Forrest GN.** 2008. *Rhodotorula glutinis* fungemia in a liver-kidney transplant patient. *Transpl Infect Dis* 71: 428-429.
- Rimek D, Haase G, Luck A, Casper J, Podbielski A.** 2004. First report of a case of meningitis caused by *Cryptococcus adeliensis* in a patient with acute myeloid leukemia. *J Clin Microbiol* 42: 481-483.
- Rodríguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M.** 2008. Epidemiological cut-off and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2468-2472.
- Rubio MC, Gil J, Benito R, Ramírez I, Navarro M.** Micosis más frecuentes en nuestro medio. En: *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica* 2ª ed. *Revista Iberoamericana de Micología*. Bilbao, España. 2007.

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

**-Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE.** 2000. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis* 30: 710-718.

**-Salas V, Pastor FJ, Rodríguez MM, Calvo E, Mayayo E, Guarro J.** 2011. *In vitro* activity and in vivo efficacy of posaconazole in treatment of murine infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 676-679.

**-Sanchis M, Guarro J, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold N, Capilla J.** 2016. Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitanae* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 84: 48-51.

**-Sandoval M.** 2016. Filogenia y sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de Acrophialophora, Cladosporium, Microascus, Scopulariopsis y Trichoderma. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Reus, España.

**-Sangamwar AT, Deshpande UD, Pekamwar SS.** 2008. Antifungals: need to search for a new molecular target. *Indian J Pharm Sci* 70: 423-430.

**-Sanglard D, Coste AT.** 2015. Activity of isavuconazole and other azoles against *Candida* clinical isolates and yeast model systems with known azole resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 229-238.

**-Sar B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou JL, Buisson Y.** 2004. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J Antimicrob Chemother* 54: 563-565.

- Savini V, Sozio F, Catavittello C.** 2008. Femoral prosthesis infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. J Clin Microbiol 46: 3544-3545.
- Scheven M, Schwegler F.** 1995. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeasts depend on azole lipophilia for special test conditions *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 39: 1779-1783.
- Schmidt J.P., Mueller G.M.** 2007. An estimate of the lower limits of global fungal diversity. Biodivers Conserv 16: 99-111.
- Seddik HA, Ceugniz A, Bendali F, Cudennec B, Drider D.** 2015. Yeasts isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-*albicans Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol 198: 71-81.
- Serena C, Mariné M, Mariné R, Pastor F, Guarro J.** 2007. Effect of antifungal treatment in a murine model of blastoschizomycosis. Int J Antimicrob Agents 29: 79-83.
- Serena C, Pastor FJ, Mariné M, Rodríguez MM, Guarro J.** 2007. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. J. Antimicrob Chemother 60: 162-165.
- Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Capilla J, Nolard N, Guarro J.** 2004. *In vitro* antifungal susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts. Antimicrob Agents Chemother 48: 2724-2726.
- Shadomy S, Shadomy HJ.** 1991. Comparative *in vitro* antifungal susceptibility studies with 30 serotype A and B isolates of *Candida albicans*. Diagn Microbiol Infect Dis 14: 21-22.

- Shuermans C, Van BM, Coorevits L, Verhaegen J, Lagrou K, Surmont I.** 2011. Breakthrough *Saprochaete capitata* infections in patients receiving echinocandins: cases report and review of the literature. *Med Mycol* 49: 414-418.
- Silva EG, Paula CR, Assis BF, Gambale W.** 2012. Voriconazole combined with amphotericin B, in the treatment for pulmonary cryptococcosis caused by *C. neoformans* (serotype A) in mice with severe combined immunodeficiency (SCDI). *Mycopathologia* 173: 445-449.
- Simon MS, Somersan S, Singh HK, Hartman B, Wickes BL, Jenkins SG, Walsh TJ, Schuetz AN.** 2014. Endocarditis caused by *Rhodotorula* infection. *J Clin Microbiol* 52: 374-378.
- Singh N, Dromer F, Perfect JR, Lortholary O.** 2008. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients: current state of the science. *Clin Infect Dis* 47: 1321-1327.
- Souza Goebel C, F. Oliveira F de Matos, Severo LC.** 2013. *Saccharomyces cerevisiae* infections. *Rev Iberoam Micol* 30: 205-208.
- Soysal A.** 2015. Prevention of invasive fungal infections in immunocompromised patients: the role of delayed-release posaconazol. *Infect Drug Resist* 8: 321-331
- Spiliopoulou A, Anastassiou ED, Christofidou M.** 2012. *Rhodotorula fungemia* of an intensive care unit patient and review of published cases. *Mycopathologia* 174: 301-309.
- Stajich JE, Berbee ML, Blackwell M, Hibbett DS, James TY, Spatafora JW, Taylor JW.** 2009. The fungi. *Curr Biol* 29: 40-45.
- Stefanatou E, Kompoti M, Paridou A.** 2011. Probiotic sepsis due to *Saccharomyces* fungaemia in a critically ill burn patient. *Mycoses* 54: 643-646.

**-Sugar AM.** Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing?.  
1995. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1907-1912.

**-Teodoro V, Gullo P, Sardi J, Torres E, Fusco-Almeida A, Mendes-Giannini.** 2013.  
Environmental isolation, biochemical identification and antifungal drug susceptibility of  
*Cryptococcus* species. *Rev Soc Bras Med Trop* 46:759-764.

**-Thygesen JB, Glerup H, Tarp B.** 2012. *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by  
treatment with a probioticum. *BMJ Case Report* doi: 10.1136/bcr.06.2011.4412.

**-Thompson GR III, Wiederhold NP, Sutton DA, Fothergill A, Patterson TF.** 2009. *In vitro*  
activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*,  
*Saccharomyces* and *Pichia* species. *J Antimicrob Chemother* 64: 79-83.

**-Tintelnot K, Losert H.** 2005. Isolation of *Cryptococcus adeliensis* from clinical samples  
and the environment in Germany. *J Clin Microbiol* 43: 1007.

**-Tonini J, Bailly S, Gautier-Veyret E, Wambergue C, Pelloux H, Thiébaud-Bertrand  
A, Cornet M, Stanke-Labesque F, Maubon D.** 2015. Contribution of a simple bioassay  
in effective therapeutic drug monitoring of posaconazole and voriconazole. *Ther Drug  
Monit* 3: 685-688.

**-Trabelsi H, Néji S, Gargouri L, Sellami H, Guidara R, Cheikhrouhou F, Bellaaj H,  
Makni F, Elloumi M, Ayadi A.** 2015. *Geotrichum capitatum*. Septicemia: case Report  
and review of the literature. *Mycopathologia* 179: 465-469.

**-Treviño-Rangel Rde J, López LJ, Palma-Nicolás JP, Hernández-Bello R, González  
JG, González GM.** 2014. Therapeutic efficacy of posaconazole in a murine model of  
disseminated trichosporonosis. *J Antimicrob Chemother* 69: 1075-1078.

**Tsiodras S, Papageorgiou S, Meletiadis J, Tofas P, Pappa V, Panayiotides J, Karakitsos P, Armaganidis A, Petrikkos G.** 2014. *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review 6: 46-50

**-Tuon FF, Costa SF.** 2008. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. Rev Iberoam Micol 25: 135-140.

**-Tuon FF, de Almeida GM, Costa SF.** 2007. Central venous catheter-associated fungemia due to *Rhodotorula* spp. a systematic review. Med Mycol 45: 441-447.

**-Ulu-Kilic A, Atalay MA, Metan G, Cevahir F, Koç N, Eser B, Çetin M, Kaynar L, Alp E.** 2015. *Saprochaete capitata* as an emerging fungus among patients with haematological malignancies. Mycoses 58:491-497.

**-Unal A, Koc AN, Sipahioglu MH.** 2009. CAPD-related peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. Perit Dial Int 29: 581-582.

**-Villa López I, Doblas Claros A, Saavedra JM, Herrera-Carranza M.** 2013. Multi-organ failure in a patient with fungaemia due to *Saprochaete capitata*. Rev Iberoam Micol 30: 261-263.

**-Villar JM, Velasco CG, Delgado JD.** 2012. Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa* in an immunocompetent, critically ill patient. J Infect Chemother 18: 581-583.

**-Walsh T, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E.** 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect 10: 48-66.

**-Wills TS, Degryse A, Lavina J, Sinnott JT.** 2004. *Blastoschizomyces capitatus* pneumonia in an immunocompetent male. South Med J 97: 702-704.

**-White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR protocols: a guide to the methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ Eds. New York. Academic Press. 1990.

**-Wirth F, Goldani LZ.** 2012. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. Interdiscip Perspect Infect Dis 46: 57-67.

**-Yoshida M, Obayashi T, Iwama A, Ito M, Tsunoda S, Suzuki T, Muroi K, Ohta M, Sakamoto S, Miura Y.** 1997. Detection of plasma (1-3)- $\beta$ -D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungemias. J Med Vet Mycol 35: 371-374.

**-Zaas AK, Boyce M, Schell W, Lodge BA, Miller JL, Perfect JR.** 2003. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. J Clin Microbiol 41: 5233-5235.