



**DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS
ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS**
Marçal Mariné Mestres

ISBN: 978-84-693-4593-1
Dipòsit Legal: T.1006-2010

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Marçal Mariné Mestres

**DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS
TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER A
INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS**

Tesi doctoral
dirigida pels doctors Josep Guarro Artigas i
Francisco Javier Pastor Molas

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



Universitat Rovira i Virgili

**Reus
2009**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

AGRAÏMENTS

A continuació voldria donar les gràcies a tota la gent que d'una manera o altra ha fet possible la realització d'aquesta tesi:

Al Dr. Josep Guarro per haver-me ensenyat el que significa ser investigador, per haver-me convidat a unes birres i pel seu humor càustic. Al Dr. Xavier Pastor per haver-me apretat tots aquests anys per tal de tirar endavant la feina.

A la Dra. Maria José Figueras per haver-me donat l'oportunitat d'entrar a l'òrbita del departament. A la Dra. Josepa Gené, que sempre ha estat allí per resoldre qualsevol dubte sobre taxonomia i per aguantar estoicament la conya de la tieta. Als doctors Alberto Stchigel, Josep Cano i Emili Mayayo, també per estar sempre disposats a ajudar però sobretot per la seva capacitat d'aprofitar la mínima excusa per celebrar alguna cosa. A la Dra. Isabel Pujol pel seu suport des del laboratori de l'hospital. A les doctores Dania García i Kendra Rodríguez que tampoc s'han estressat mai a l'hora de donar un cop de mà.

A la Dra. Rita Marimón per estar sempre disposada tant a treballar com a xerrar de qualsevol cosa. Al doctors Fèlix Gilgado, Mònica Azor i Anabel Alperi amb qui també he compartit bons moments tots aquests anys. A la Dra. Roxana Beaz i els seus amplis coneixements sobre peixos i cerveses.

Als doctors Xavi Capilla i Montserrat Ortoneda, veus de l'experiència en antifúngics que em van donar una empenyeta quan començava. A la Dra. Belkys Fernández per ajudar-me també durant els inicis i per obsequiar-me amb comentaris hilarantment desafortats. A la Dra. Carol Serena per la seva infinita paciència a l'hora d'ensenyar-me tot el que va caldre sobre antifúngics i d'aguantar les meves bromes. A la Mery per ajudar-me sempre que ha fet falta i per la seva amistat. A la Mar i L'Enric que han estat uns bons companys tot i ser del Sant Josep. Al Fredi que es un paio collonut, i a la Clara.

Als companys del laboratori: a la Mabel per compartir els seus coneixements estadístics i la seva simpatia, a la Carolina per ser un blanc fàcil de les meves tonteries, a la Núria i la Cati per ser tant eficients que espanta i a la Carme i les seves planificacions. A l'armada xilena: el Luís, l'Hugo, l'Eduardo i la Valentina. A la penya tropical: a l'Haybrig, a l'Íngrid, a la Sarah, per tenir sempre un somriure a la cara, i a la

Margarita. Al Juan i l'Esperanza, per tenir cura dels meus ratolins. Als companys que van decidir canviar d'aires abans d'hora: l'Antonio, la Gisela i el Josep. I a tots aquells que han estat un temps al laboratori aportant la seva experiència i el seu bon humor: La Chela, la Mary, el Julio, el Samir, la Michaela, l'Alejandra i el Shivaprakash.

Als de la meva colla, amb qui he compartit la major part de la meva vida i amb qui quasi sempre pots comptar.

Als meus pares, que es van deixar la pell perquè que jo pogués tenir uns estudis, per recolzar-me incondicionalment. Al meu germà Jordi per ser tant o més friki que jo, tot i que no ho vulgui reconèixer.

Moltes gràcies a tots.

1. Introducció

1.1	Generalitats	1
1.2	Els fongs com a agents infecciosos. Micosis	3
1.2.1	<i>Candida</i> spp. com agents causals de micosis sistèmiques	7
1.2.2	<i>Cladophialophora bantiana</i> com agent causal de feohifomicosis cerebrals	10
1.3	Antifúngics	11
1.3.1	Poliens	12
1.3.2	Azoles	13
1.3.2.1	Fluconazole.....	14
1.3.2.2	Itraconazole.....	14
1.3.2.3	Voriconazole.....	14
1.3.2.4	Posaconazole.....	15
1.3.2.5	Ravuconazole.....	15
1.3.3	Anàlegs de precursors d'àcids nucleics	16
1.3.3.1	Flucitosina	16
1.3.4.	Equinocandines	17
1.3.4.1	Caspofungina	17
1.3.4.2	Micafungina	17
1.3.4.3	Anidulafungina	17
1.3.5	Alilamines	18
1.4.5.1	Terbinafina	18
1.4	Determinació de la sensibilitat als antifúngics	19
1.4.1	Mètodes <i>in vitro</i>	20
1.4.1.1	Els llevats	20
1.4.1.2	Els fongs filamentosos	22
1.4.1.3	Interaccions entre antifúngics.....	23
1.4.2	Mètodes <i>in vivo</i>. Models experimentals en animals	24

2. Interès i objectius de l'estudi	27
3. Materials i mètodes	
3.1 Estudis <i>in vitro</i>	35
3.1.1 Soques	35
3.1.2 Conservació de les soques	36
3.1.3 Agents antifúngics	36
3.1.4 Metodologia	37
3.1.4.1 Preparació de microplaques	37
3.1.4.2 Preparació de microplaques de combinacions antifúngiques	38
3.1.4.3 Definicions	40
3.1.4.4 Preparació dels inòculs per als estudis <i>in vitro</i>	40
3.2 Estudis <i>in vivo</i>	41
3.2.1 Soques	41
3.2.2 Animals d'experimentació	42
3.2.3 Immunosupressió	43
3.2.4 Infecció	43
3.2.5 Antifúngics	44
3.2.6 Tractaments i vies d'administració	45
3.2.7 Recuperació fúngica a partir d'òrgans de l'animal infectat	46
3.2.8 Anàlisi estadístic	47
4. Resultats	
4.1 Activities of Flucytosine, Fluconazole, Amphotericin B, and Miconazole in a Murine Model of Disseminated Infection by <i>Candida glabrata</i>.	49
Mariné M, Serena C, Fernández-Torres B, Pastor FJ, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005, 49:4757–4759.	

4.2	Combined antifungal therapy in a murine infection by <i>Candida glabrata</i>.	55
	Mariné M, Serena C, Pastor FJ, and Guarro J. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006, 58:1295–1298.	
4.3	Efficacy of triazoles in a murine disseminated infection by <i>Candida krusei</i>.	61
	Mariné M, Pastor FJ, Serena C, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53: 3585–3588	
4.4	Paradoxical growth of <i>C. dubliniensis</i> does not preclude in vivo response to echinocandin therapy.	67
	Mariné M, Pastor FJ, Sahand IH, Pontón J, Quindós G, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. doi:10.1128/AAC.00980-09	
4.5	Efficacy of posaconazole in a murine disseminated infection by <i>Candida tropicalis</i>	73
	Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. Acceptat a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy.	
4.6	Efficacy of a new formulation of amphotericin B in a murine model of disseminated infection by <i>Candida glabrata</i>.	87
	Mariné M, Espada R, Torrado J, Pastor FJ, Guarro J. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008, 61:880-883.	
4.7	Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by <i>Candida glabrata</i> or <i>Candida tropicalis</i>.	93
	Mariné M, Espada R, Torrado J, Pastor FJ, Guarro J. International Journal of Antimicrobial Agents. 2009, doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.07.005	
4.8	In vitro activity of micafungin combined with itraconazole against <i>Candida</i> spp.	99
	Mariné M, Serena C, Pastor J, Quindós G, Carrillo AJ, Guarro J. International Journal of Antimicrobial Agents. 2007, 30:463-465.	
4.9	Combined antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by <i>Cladophialophora bantiana</i>.	105
	Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. Medical Mycology. 2009, 47:45-49.	
5. Discussió		
5.1	<i>Candia glabrata</i>. Teràpies simples i combinades.....	113
5.2	<i>Candida krusei</i>. Voriconazole i posaconazole: comparativa.....	114
5.3	<i>Candida dubliniensis</i>. Equinocandines: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>.....	115
5.4	<i>Candida tropicalis</i>. Eficàcia del posaconazole.....	117

Índex

5.5	Noves formulacions d'amfotericina B.....	118
5.6	Itraconazole i micafungina: Interaccions <i>in vitro</i> envers <i>Candida</i> spp.	120
5.7	<i>Cladophialophora bantiana</i>. Teràpia combinada.....	121
6.	Conclusions.....	123
7.	Bibliografia.....	127

1. Introducció

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

1.1. Generalitats

Els fongs són organismes eucariotes heteròtrofs que es caracteritzen per absorbir els nutrients del seu medi mitjançant la secreció d'enzims que els degraden fins a permetre'n l'assimilació. La principal característica estructural que els distingeix d'altres eucariotes es una paret cel·lular que consta de quitina i glucans com a components majoritaris. Pel que fa al seu origen evolutiu, existeixen evidències fòssils de l'existència de fongs des de fa 400 milions d'anys (Alexopoulos *et al.*, 1996) però es creu que aquests es van diferenciar dels animals fa 965 milions d'anys (Blackwell, 2000). Actualment es coneixen unes 34.000 espècies de fongs (Index fungorum, 2009), només una fracció del milió i mig d'espècies que es creu que existeixen (Mueller, 2007). Tot i que els fongs s'estudien des de fa 250 anys, no va ser fins fa 40 anys que se'ls va començar a considerar com un grup propi i diferenciat respecte a d'altres grups d'eucariotes (Whittaker, 1969), fent de la micologia com a tal un camp d'estudi relativament recent.

Els fongs intervenen en els processos de biodegradació de restes d'animals i vegetals en components químics bàsics i tenen un paper clau en el cicle del carboni i de diferents minerals. Els fongs que descomponen organismes morts que contenen cel·lulosa o midó s'anomenen sapròfits. Els que formen associacions simbiòtiques amb les plantes, obtenint un benefici mutu es denominen mutualistes, un exemple dels quals són els fongs que viuen associats a les arrels de plantes formant micorrizes (Clay, 1988). Altres fongs produeixen malalties infeccioses a plantes i animals, incloent l'home, i es consideren parasitaris. Els fongs patògens per a les plantes causen greus malalties en llavors, plançons i plantes madures, cosa que dona lloc a un menor creixement i reproducció de les plantes (Shumann, 1991) i ocasionen en alguns casos greus pèrdues econòmiques al sector de l'agricultura. També els fongs provoquen malalties als éssers humans i a d'altres animals. Tot i això, de les 34.000 espècies de fongs que hi ha descrites actualment, menys de 500 s'associen a malalties humanes (Richardson i Warnock, 2003, de Hoog *et al.*, 2000), i encara són menys les espècies capaces de causar infeccions greus en individus immunocompetents. D'altra banda, els fongs tenen un impacte directe sobre la nostra vida quotidiana; qualsevol persona que llegeixi aquestes línies, amb tota seguretat, haurà rebut durant la seva vida algun tipus de tractament antibacterià amb alguna substància provinent o derivada del metabolisme fúngic. A part de l'actual importància en biotecnologia industrial i a nivell

Introducció

sanitari d'aquests antibacterians (cefalosporines, penicil·lina, etc.), i també d'antifúngics (griseofulvina i caspofungina) i vitamines, entre altres, produïts per fongs, aquests han estat i són emprats en la producció d'aliments com el pa, formatge, vi, cervesa, etc. (Carlile et al., 2001) per diverses cultures des de far milers d'anys.

Els fongs es classifiquen segons la seva morfologia en llevats, fongs filamentosos, i fongs dimòrfics. Els llevats són fongs unicel·lulars que es reproduïxen generalment per gemmació, encara que alguns ho fan per fissió binària. Les característiques morfològiques dels llevats s'estableixen per la presència o no de càpsula, la mida i la forma de les cèl·lules, el mecanisme de formació de la cèl·lula filla, la capacitat de formar pseudohifes o hifes veritables, i la capacitat de formar el teleomorf (estadi en el qual el fong es reproduïx de forma sexual, també anomenat forma perfecta). Les característiques fisiològiques són també importants per a la seva identificació. Aquest grup de fongs comprèn gèneres com *Candida*, *Saccharomyces* o *Cryptococcus*, incloent patògens primaris, patògens oportunistes (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*), així com d'altres amb una gran importància en la indústria alimentària (*Saccharomyces cerevisiae*).

Els fongs filamentosos es caracteritzen per tenir una estructura pluricel·lular formada per una xarxa d'hifes ramificades amb creixement apical (micel·li). Creixen amb aquesta estructura filamentosa independentment de les condicions externes, que únicament poden influenciar en la velocitat de creixement i en la major o menor formació d'estructures reproductores, així com en la formació o no del teleomorf. Els diferents gèneres i espècies de fongs filamentosos, en la seva fase asexual, es diferencien principalment per la conidiogènesi, i per les característiques morfològiques observades en els conidis i en les cèl·lules conidiògenes, dades que ens permeten classificar-los (Alexopoulos et al., 1996).

Els fongs dimòrfics expressen fenotípicament dues morfologies diferents en funció de les característiques del medi (temperatura, concentració de CO₂, pH) en què es desenvolupen. Són fongs filamentosos quan creixen en cultius in vitro a 25 ° C i llevats quan es troben infectant un organisme (Rippon, 1988, de Hoog *et al.*, 2000). Els principals representants amb importància mèdica d'aquest grup són: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* i *Sporothrix schenckii*.

1.2. Els fongs com a agents infecciosos. Micosis

A més de la relativa escassetat d'espècies de fongs amb potencial patogènic (Kwon-Chung, 1992), les malalties causades per fongs (micosis) són relativament infreqüents en persones immunològicament competents en comparació a d'altres malalties infeccioses. Així doncs, hi ha un fort contrast entre l'abundància d'espècies fúngiques presents a l'ambient i la baixa freqüència d'infeccions causades per aquest grup de microorganismes.

L'establiment d'una micosi implica la capacitat del microorganisme de créixer en condicions de pH, temperatura i potencial redox presents als teixits de l'hoste, les quals són generalment poc favorables pel creixement dels fongs. Els agents infecciosos han de posseir, per tant, certes característiques que els permetin sobreviure en aquest ambient així com mecanismes per evitar les defenses de l'hoste (Casadevall i Pirofski, 2001; Clemons i Stevens, 2000). Algunes espècies, però, han aconseguit adaptar-se a les condicions desfavorables imposades per l'hoste i desenvolupar-se als seus teixits. De totes maneres, la virulència d'un microorganisme depèn tant de les característiques del microorganisme com de factors propis de l'hoste (Pirofski i Casadevall, 2002), per la qual cosa l'establiment d'una malaltia infecciosa depèn de l'estret equilibri entre l'hoste i el microorganisme.

Depenent de la font d'infecció les micosis es poden classificar com:

Micosis endògenes

Són aquelles causades per fongs presents a la microbiota de la pell i mucoses, com les espècies del gènere *Candida*, i que només es produeixen en el cas d'un desequilibri en la relació entre l'hoste i el microorganisme. Per exemple la candidiasi s'associa a danys a les cobertes naturals, tractaments antibacterians, ús de corticosteroides i immunosupressió.

Micosis exògenes

Són aquelles que es produeixen a causa de la inoculació traumàtica de l'agent infecciosos a la pell o per inhalació o ingestió d'espores. Alguns dels agents infecciosos de procedència ambiental més habituals, són les espècies del gènere *Aspergillus* i els fongs dimòrfics. Majoritàriament, les micosis sistèmiques d'origen exogen es produeixen a partir d'un focus primari pulmonar, com a conseqüència d'haver inhalat espores.

Introducció

Depenent de la localització de la infecció, les micosis es poden classificar com:

Micosis superficials

Són aquelles que afecten la capa externa de l'estrat corni de la pell i la cutícula del pèl. Aquest tipus de micosi afecta teixits inerts per la qual cosa no es dona una resposta immunitària detectable en l'hoste. Entre els agents etiològics causants d'aquest tipus d'infeccions cal destacar *Malassezia* spp. (llevat causant de la pitiriasi versicolor), *Hortaea werneckii* (causant de la tinya negra), *Trichosporon* spp i *Piedraia hortae* (causants de la pedra blanca i negra, respectivament). *Trichophyton mentagrophytes*, *Acremonium* spp., *Scopulariopsis* spp., i *Fusarium* spp. entre altres que poden produir onicomicosis (Torres-Rodríguez i López-Jodra, 2000). El diagnòstic de les infeccions superficials és relativament senzill i la teràpia específica acostuma a proporcionar una bona resposta clínica, encara que amb certes dificultats en el cas de les infeccions d'ungles.

Micosis cutànies

Són infeccions produïdes en general per fongs dermatòfits i que es localitzen a l'epidermis, dermis i estructures queratinitzades (ungles i pèl). Es diferencien de les micosis superficials en que poden afectar a capes més profundes de la pell provocant la resposta immunitària de l'hoste. Els gèneres *Trichophyton*, *Epidermophyton* i *Microsporum* són els més freqüentment implicats en aquest tipus d'infeccions (de Hoog et al., 2000). A part dels dermatòfits, diverses espècies de *Candida*, principalment *C. albicans*, també es troben implicades habitualment en aquest tipus d'infeccions, afectant no només la pell sinó també les ungles i les mucoses (candidiasis mucocutànies). Les micosis cutànies poden evolucionar cap a la producció de lesions subcutànies (Erbagci, 2002; Smith et al., 1991).

Micosis subcutànies

Són infeccions cròniques, localitzades de la pell i del teixit subcutani arran de la implantació traumàtica de l'agent etiològic. Els fongs causants d'aquest tipus d'infeccions conformen un grup molt heterogeni, generalment sapròfits del sòl, la capacitat dels quals per adaptar-se als teixits i provocar la malaltia és molt variable.

Afecten les capes profundes de la dermis i teixit cel·lular subcutani, i es poden estendre cap al múscul i als ossos. Segons el microorganisme causant, podem distingir diversos tipus de micosis subcutànies, entre les quals podem destacar:

- **Eumicetoma.** Es tracta de lesions granulomatoses supuratives, l'exsudat de les quals acostuma a presentar microcolònies en forma de grans. Els agents causals inclouen els gèneres *Madurella*, *Acremonium*, *Pseudallescheria*, *Exophiala*, *Leptosphaeria*, *Curvularia*, *Fusarium* i *Neoscytalidium* entre d'altres.
- **Esporotricosi.** És provocada per membres del complex d'espècies *Sporothrix schenckii* (Marimón et al., 2006). La forma més típica de la malaltia és l'esporetricosi limfocutània aguda i es produeix per la disseminació de l'organisme cap als ganglis limfàtics propers al punt on es produeix la inoculació traumàtica. També es pot arribar a produir una afectació osteoarticular i visceral tant en pacients immunocompetents com immunocompromesos (Morris-Jones, 2002).
- **Cromoblastomicosi.** Aquesta infecció es caracteritza per la presència de lesions ulceroses no exsudants, poc extenses i localitzades preferentment a les extremitats. Poden disseminar-se per via limfàtica. Els agents responsables típics de la cromoblastomicosi són: *Cladophialophora carrioni*, *Fonsecaea* spp. (de Hoog et al., 2000), *Phialophora verrucosa* (Sharma et al., 2002) o *Exophiala dermatitidis* (Clancy et al., 2000).
- **Feohifomicosi.** Causada per una sèrie de fongs dematiacis que es caracteritza per la morfologia micelial de l'organisme en teixits. Això la separa d'altres tipus d'infeccions causades per fongs pigmentats amb una morfologia granular (micetoma) o amb cossos escleròtics (cromoblastomicosi). Els agents etiològics són diferents espècies d'*Exophiala*, *Phialophora*, *Wangiella*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, *Cladophialophora*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia* i *Alternaria* (Ajello et al., 1997).

Hi ha també altres tipus d'infeccions subcutànies menys freqüents com la lobomicosi, la rinosporidiosi, les zigomicosis subcutànies, etc.

Micosis sistèmiques

Les micosis sistèmiques impliquen la disseminació de la infecció a 2 o més òrgans no adjacents o a un òrgan i a la sang (Rubio *et al.*, 2001, Mitchell, 2007). Són les més greus i poden resultar fatals per als individus amb un sistema immunitari deficient o quan el patògen és resistent als tractaments antifúngics. Aquestes infeccions fúngiques generalment son adquirides a partir de la inhalació o inoculació traumàtica d'espores. Tot i que són molt més freqüents en pacients immunocompromesos, també es poden donar en pacients amb el sistema immunitari aparentment intacte. En pacients immunocompetents aquestes infeccions acostumen a ser causades pels fongs dimòrfics; patògens capaços de superar les defenses fisiològiques i cel·lulars de l'hoste humà normal per mitjà de canvis importants en la seva paret cel·lular, morfologia i metabolisme. Per la seva incidència i gravetat en podem destacar les següents espècies: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* i *Coccidioides immitis*. Totes aquestes espècies, en general, es troben geogràficament limitades al les zones àrides d'Amèrica i acostumen a produir una infecció pulmonar inicial després de la inhalació de conidis.

D'altres agents etiològics menys habituals també són capaços de produir infeccions sistèmiques en hostes immunocompetents, com es el cas de *Cladophialophora bantiana*, causant de la majoria de feohifomicosis del sistema nerviós central. Aquest tipus d'infeccions presenten una elevada mortalitat i una minsa resposta al tractament amb antifúngics.

Les infeccions fúngiques en hostes immunocompromesos són cada cop més freqüents a causa de l'envelliment de la població als països desenvolupats, l'augment de la incidència de molts tipus de càncer (que impliquen tractaments molt agressius), la millora dels tractaments per a pacients en estat crític, així com l'increment de la freqüència de trasplantaments d'òrgans. (Richardson i Lass-Flörl, 2008). Tots aquests factors permeten a fongs que normalment serien incapaços de causar infeccions en un hoste sa, produir greus infeccions sistèmiques. Aquests fongs són anomenats oportunistes.

Els factors que afavoreixen l'adquisició d'infeccions oportunistes, són nombrosos i variats. Els més comuns són:

- Alteracions de les barreres naturals:
 - Antibioteràpia múltiple o prolongada
 - Implantació de catèters intravasculars durant períodes llargs de temps
 - Cremades, llagues o traumatismes

- Alteracions quantitatives i/o funcionals del sistema immunitari:
 - Radioteràpia
 - Quimioteràpia
 - Aplàsia medul·lar
 - Malaltia granulomatosa crònica
 - Diabetis
 - SIDA
 - Leucèmies
 - L'ús d'agents immunosupressors en el tractament de malalties autoimmunes, així com en trasplantaments d'òrgans sòlids i de medul·la òssia.

Els fongs oportunistes més habituals són *Candida* spp., *Aspergillus* spp., Mucorals i altres filamentosos com *Fusarium* spp., i *Scedosporium* spp. Quan causen infeccions sistèmiques són difícils de diagnosticar i produeixen una elevada mortalitat tot i l'aplicació de teràpies antifúngiques. La prompta administració d'un tractament antifúngic adequat i la recuperació de l'estat immunològic del pacient són les directrius bàsiques per afrontar aquest tipus d'infeccions.

1.2.1. *Candida* spp. com agents causals de micosis sistèmiques

Les espècies que pertanyen al gènere *Candida* són la causa més comuna de micosis invasives en els éssers humans, produint infeccions que van des de desordres mucocutanis a infeccions sistèmiques que poden afectar qualsevol òrgan. Tot i que l'espècie més comunament aïllada en casos de candidiasi invasiva és *Candida albicans*, hi ha una vintena d'espècies de *Candida* que han estat reconegudes com a agents etiològics per aquest tipus d'infeccions.

L'increment d'aquest tipus d'infeccions és un fenomen que s'ha anat observant des de la segona meitat del segle XX en països desenvolupats amb un alt nivell d'atenció

Introducció

hospitalària, fins al punt que per exemple, el conjunt d'espècies de *Candida* ocupen als EUA el tercer lloc en nombre d'aïllats a partir d'hemocultius, en infeccions adquirides als hospitals (Spellberg *et al.*, 2006). Durant els darrers anys s'ha observat un augment en la freqüència d'infeccions causades per altres espècies de *Candida* a part de *C. albicans*, essent *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, i *C. krusei*, les més habituals (Pfaller *et al.*, 2007a).

L'heterogeneïtat d'espècies de *Candida* capaces de produir micosis sistèmiques, fa que calgui ser molt curós en l'atenció a les característiques pròpies de cada espècie a l'hora d'enfrontar-se a aquest tipus d'infeccions:

Candida albicans

Descrita fa gairebé 90 anys, es tracta d'un llevat capaç de produir pseudomicel·li i micel·li així com de mantenir la forma de llevat tant en cultiu com als teixits d'un hoste. La seva morfologia és molt variable depenent de la soca. Recentment s'ha descobert que és capaç de reproduir-se sexualment, però de manera molt limitada a l'entorn natural (Odds *et al.*, 2007). En general és sensible a la majoria d'antifúngics però esporàdicament s'ha descrit l'aparició de resistències a antifúngics com el fluconazole (Marr *et al.*, 1997), o més recentment al voriconazole (Pfaller *et al.*, 2007b).

Candida glabrata

Inicialment inclosa al gènere *Cryptococcus* i posteriorment dins del gènere obsolet *Torulopsis*, va passar a formar part del gènere *Candida* l'any 1978. Aquest llevat genèticament més proper a *Saccharomyces cerevisiae* que a la resta d'espècies de *Candida*, tendeix a romandre sempre en forma unicel·lular i molt rarament produeix pseudohifes (Csank i Haynes, 2000). Tradicionalment ha estat considerada una espècie pròpia de la microbiota d'individus sans (Stenderup i Pederson, 1962) però l'augment de la població amb el sistema immunitari alterat pels factors anteriorment esmentats, ha fet que actualment es consideri la segona o tercera espècie del gènere en importància clínica (Pfaller *et al.*, 2007a). Aquest gran augment en la incidència d'infeccions sistèmiques causades per *C. glabrata* és quelcom a tenir en compte, ja que la mortalitat associada a aquest fong es la més elevada de totes les espècies de *Candida* (Patterson 2005). Un altre factor preocupant a l'hora d'enfrontar-se a aquest tipus d'infeccions és la resistència que presenten moltes soques de *C. glabrata* a certs antifúngics. La seva resistència al fluconazole es ben coneguda (Fidel *et al.*, 1999), així com un perfil de baixa sensibilitat a l'amfotericina B (Pappas *et al.*, 2004) en comparació a d'altres espècies de *Candida*. Recentment s'ha observat que una

proporció significativa de soques són també resistents al voriconazole (Pfaller *et al.*, 2007b).

Candida parapsilosis

Candida parapsilosis és un dels agents etiològics més comuns de candidèmia neonatal a les unitats de cures intensives (Tortorano *et al.*, 2006) i la seva incidència està típicament relacionada amb l'ús de catèters i l'administració de nutrició parenteral (Bedini *et al.*, 2006). Els aïllats de *C. parapsilosis* són habitualment sensibles als azoles (Bedini *et al.*, 2006), però acostumen a presentar una menor sensibilitat a les equinocandines (Pfaller *et al.*, 2008).

Candida tropicalis

Les infeccions disseminades produïdes per *C. tropicalis* s'associen a unes elevades taxes de mortalitat, comparables a les produïdes per *C. glabrata* (Bedini *et al.*, 2006, Tortorano *et al.*, 2004). Es consideren factors de risc per a aquestes micosis les hemopaties malignes com la leucèmia, la neutropènia persistent, i l'estada prolongada a cures intensives (Kontoyiannis *et al.*, 2001).

Candida krusei

La forma allargada de les seves cèl·lules, una abundant producció de pseudohifes, així com la forma de les seves colònies al créixer en medi Sabouraud dextrosa agar la distingeixen de la resta d'espècies del gènere. També es un tret distintiu d'aquesta espècie el fet que es conegui el seu teleomorf (*Issatchenkia orientalis*); a diferència de la majoria d'espècies de *Candida* d'importància clínica. Tot i que les infeccions causades per *C. krusei* són menys freqüents que les produïdes per les espècies de *Candida* anteriorment mencionades, representen fins a un 4% del total de candidiasis invasives (Pfaller *et al.*, 2004a). Aquesta espècie és coneguda per la seva resistència intrínseca al fluconazole, de tal manera que la colonització prèvia del pacient per part d'aquest llevat conjuntament amb l'aplicació de profilaxi amb aquest fàrmac acostumen a ser força predictives d'una posterior infecció sanguínia (Pfaller *et al.*, 2006b). Tot i això, l'administració prèvia de fluconazole per si sola no es pot considerar un factor de risc per a les candidiasis causades per *C. krusei* (Lin *et al.*, 2005). Aquest llevat presenta una taxa de mortalitat molt elevada, en part atribuïble a la seva pobra resposta als agents antifúngics, ja que a més de la resistència al fluconazole també s'ha observat una disminució de la sensibilitat a l'amfotericina i a la flucitosina en algunes soques d'aquesta espècie. No s'han observat resistències creuades amb

Introducció

altres triazoles més recents com el ravuconazole o el voriconazole per *C. krusei* (Pfaller *et al.*, 2008); tot i això, la idoneïtat de l'administració d'aquests fàrmacs per tractar les infeccions causades per aquesta espècie ha generat certa controvèrsia (Arendrup *et al.*, 2007).

Candida dubliniensis

Candida dubliniensis és una espècie descrita el 1995 que comparteix moltes característiques fenotípiques amb *C. albicans*. La infecció produïda per *C. dubliniensis* s'associa sobretot a la colonització i a la infecció oral en individus infectats pel VIH. Encara que *C. dubliniensis* és freqüentment aïllada en la cavitat oral, també ha estat aïllada en femta, esput, orina, i sang (Al Mosaid *et al.*, 2005; Gee *et al.*, 2002; Marriot *et al.*, 2001). No obstant això, la incidència de *C. dubliniensis* en infeccions sistèmiques és baixa, no superant el 2% de casos de candidèmia al Regne Unit (Kibbler *et al.*, 2003) i als EUA (Sebti *et al.*, 2001), fet que contrasta amb el 65% de candidèmies causades per *C. albicans*. La majoria de soques de *C. dubliniensis* són generalment sensibles als azoles d'ús general, però, la resistència *in vitro* als mateixos ha estat descrita ja en soques d'origen clínic (Pinjon *et al.*, 2005). S'ha observat que moltes soques d'aquesta espècie presenten creixements anòmals quan són exposats a les equinocandines *in vitro* (Fleischhacker *et al.*, 2008), tot i que no hi ha dades clíniques que indiquin una menor efectivitat d'aquest grup d'antifúngics pel tractament d'infeccions causades per *C. dubliniensis*.

Candida lusitanae

Candida lusitanae també produeix infeccions disseminades en pacients amb hemopaties malignes, tot i que amb una incidència menor que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* o *C. krusei* (Hazen, 1995). Les soques de *C. lusitanae* són sensibles als azoles, però presenten una resistència intrínseca a l'amfotericina B (Bedini *et al.*, 2006).

1.2.2. *Cladophialophora bantiana* com agent causal de feohifomicosis cerebrals

El terme feohifomicosis fou utilitzat per primera vegada l'any 1974 per tal de distingir les infeccions que produeixen abscessos micòtics amb hifes pigmentades, de les comoblastomicosis i les esporotricosis (Ajello *et al.*, 1974). El tractament d'aquest tipus d'infeccions es sempre complicat i moltes vegades depèn més de la cirurgia que

de la teràpia amb agents antifúngics (Revankar *et al.*, 2004). La baixa freqüència de casos clínics de feohifomicosis impedeix dur a terme estudis estadísticament robustos sobre l'eficàcia dels antifúngics per tractar-les.

Tot i que les espècies que pertanyen al gènere *Cladophialophora* es poden considerar fongs filamentosos, sovint han estat classificades per les seves característiques colonials dins dels "llevats negres", terme que engloba un grup molt heterogeni de fongs que es defineixen per una paret cel·lular pigmentada, i que es reproduïxen per gemmació, però que en la majoria de casos presenten un creixement micel·liar i fins i tot formació de conidis.

Tot i l'escassetat de casos descrits d'infeccions causades per *Cladophialophora bantiana*, aquestes exhibeixen una taxa de mortalitat preocupantment elevada, que es deu principalment al marcat neurotropisme d'aquesta espècie. En el cas d'infeccions que afecten el sistema nerviós central s'hi afegeix, a més de la dificultat d'una intervenció quirúrgica en un òrgan tan delicat com és el cervell, la incapacitat d'alguns fàrmacs de travessar la barrera hemato-encefàlica.

Cladophialophora bantiana es una espècie de distribució mundial, i tot i que presenta certa preferència pels climes temperats i humits, pot suportar altes temperatures, potencials hídrics molt baixos i fins i tot es pot mantenir viable durant anys en mostres clíniques que han estat sotmeses a processos de tinció. La capacitat de les espècies del gènere *Cladophialophora* per degradar, i fins i tot utilitzar com a única font de carboni, compostos aromàtics com el benzè, ha permès d'especular sobre l'origen del seu neurotropisme, que podria estar relacionat amb la presència al cervell de components d'estructura molt semblant a aquests compostos aromàtics (Prenafeta-Boldu *et al.*, 2006).

Pel que fa a la sensibilitat als antifúngics, *C. bantiana* s'ha mostrat sensible *in vitro* a la majoria d'azoles, a l'amfotericina B i a la flucitosina, mentre que les equinocandines han mostrat certa activitat però en menor grau (Espinel-Ingroff, 1998; Nakai *et al.*, 2003; Al-Abdely *et al.*, 2005). Tot i els resultats *in vitro*, l'efectivitat dels antifúngics en aquest tipus d'infeccions ha estat molt irregular i encara no hi ha recomanacions específiques per al tractament dels abscessos cerebrals causats per *C. bantiana* (Kantarcioğlu i de Hoog, 2003).

1.3. Antifúngics

El terme antifúngic o antimicòtic inclou aquelles substàncies que poden produir modificacions a les estructures bàsiques de la cèl·lula fúngica, inhibint el seu desenvolupament o alterant la seva viabilitat i produint les mínimes alteracions possibles en les cèl·lules de l'hoste (Kerridge i Vande-Bossche, 1990). La similitud de les dianes d'acció d'alguns antifúngics amb estructures o rutes metabòliques de les cèl·lules humanes determina l'escàs nombre d'aquests fàrmacs en comparació amb els antibiòtics antibacterians existents, així com la major possibilitat d'aparició d'efectes secundaris i / o tòxics (Graybill *et al.*, 2003; Gubbins i Anaissie, 2003).

Els antifúngics es classifiquen segons la seva estructura química, el seu origen (natural o de síntesi química), el seu espectre (ampli o restringit), i el seu mecanisme d'acció (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999).

El tractament de les micosis ha sofert una evolució, que va des de l'ús dels antifúngics considerats de "primera generació", derivats de productes o de l'activitat metabòlica de determinats microorganismes, fins els de "segona generació", en què predomina la obtenció per síntesi química. Les primeres substàncies utilitzades amb activitat antifúngica van ser metalls pesats com el iodur potàssic, metal·loides, derivats del sofre i les sulfonamides, i posteriorment es van introduir els primers antibiòtics antifúngics: griseofulvina, nistatina, amfotericina B i flucitosina. Els antifúngics azoles van ser desenvolupats durant els anys 50 i 60 i no es van emprar en la pràctica clínica fins al 1969, malgrat que la primera molècula d'aquest tipus, el benzimidazole, va ser descrita el 1944. Els primers representants del grup van ser el clotrimazole, el miconazole i l'econazole, als quals van seguir altres com el ketoconazole, el fluconazole i l'itraconazole. Posteriorment han aparegut el voriconazole, el posaconazole, i el ravuconazole. Els representants de les alilamines són la terbinafina i la naftifina. La naftifina va ser introduïda a la pràctica clínica el 1985 i la terbinafina el 1991. Per últim, també hi trobem les equinocandines on els seus representants més importants són la caspofungina, la micafungina i l'anidulafungina.

1.3.1. Poliens

Els poliens són substàncies antibiòtiques sintetitzades per actinomicets del gènere *Streptomyces*, i van ser els primers antifúngics que es van desenvolupar. Se'n coneixen més de 100 compostos diferents, dels quals el més important és l'amfotericina B (Figura

1). L'amfotericina B es va obtenir a partir de *Streptomyces nodosus* i va ser comercialitzada per al seu ús clínic l'any 1958. Tot i ser el compost de referència per al tractament de les micosis sistèmiques, la seva nefrotoxicitat limita la seva dosificació i administració (Hsieh *et al.*, 1998). La membrana cel·lular dels fongs té una estructura semblant a la membrana de les cèl·lules animals, de la qual es diferencia per la presència de l'ergosterol en comptes del colesterol. L'activitat antifúngica dels polienis es basa en la capacitat per unir-se l'ergosterol, això provoca la formació de petits canals que permeten la sortida de petites molècules de l'interior de la cèl·lula fúngica i l'entrada d'altres substàncies. La seva acció requereix només alguns minuts per alterar l'equilibri osmòtic de la cèl·lula fúngica i provocar-li la mort. Actualment, i encara que la formulació tradicional continua essent molt utilitzada pel seu baix cost de producció, s'utilitzen altres formulacions que permeten administrar dosis més elevades d'amfotericina B i presenten menys problemes de toxicitat, tot i que resulten molt més costoses de produir. Aquestes noves formulacions són l'amfotericina B liposomal, el complex lipídic de l'amfotericina B i l'amfotericina B en dispersió coloidal. L'actual vigència d'aquest fàrmac com a tractament de primera línia de les infeccions fúngiques és un cas excepcional dins del conjunt dels antibiòtics, ja que l'aparició de resistències envers l'amfotericina B és poc freqüent en la majoria de fongs que no hi són intrínsecament resistents. És per això que encara avui en dia es segueixen desenvolupant noves formulacions d'amfotericina B que permetin administrar aquest fàrmac de manera segura i amb uns costos de producció més raonables.

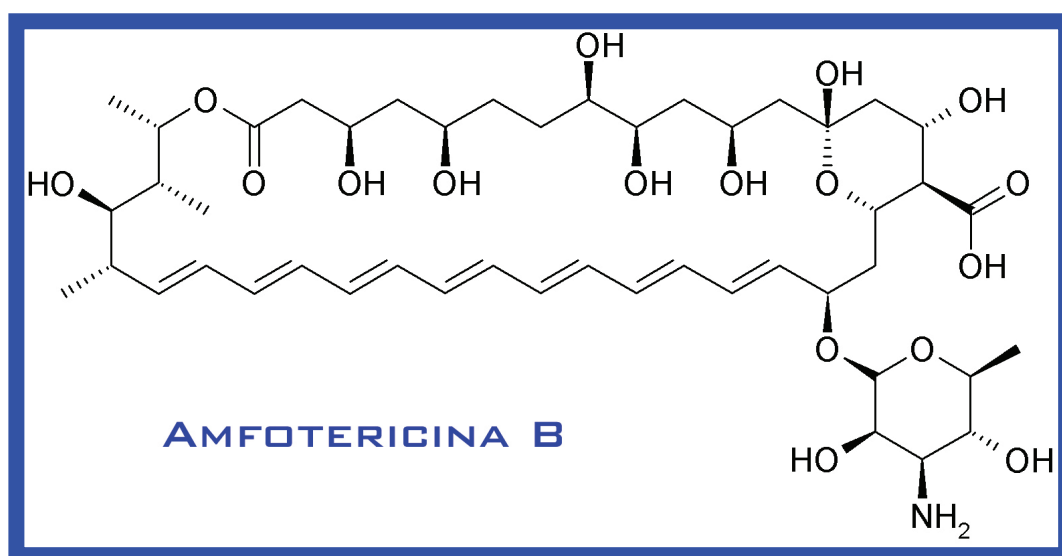


Figura 1. Estructura química de l'amfotericina B

1.3.2. Azoles

Els azoles constitueixen una de les famílies d'antifúngics més nombrosa. La seva estructura química es basa en anells heteropentacíclics amb dos (imidazoles) o tres (triazoles) àtoms de nitrogen units per àtoms d'hidrogen a altres anells aromàtics (Figura 2). En l'actualitat l'ús dels imidazoles es limita al tractament de les micosis superficials, essent els més utilitzats el ketoconazole, el clotrimazole, el miconazole i el sertaconazole. Els triazoles són molècules amb un ampli espectre d'acció, presenten una menor toxicitat i són més estables metabòlicament que els imidazoles. Estan indicats en el tractament de les micosis tant superficials com sistèmiques. Els representants principals d'aquest grup són el fluconazole, l'itraconazole, el voriconazole, el ravuconazole, i el posaconazole. Els azoles són antifúngics que actuen inhibint l'activitat del citocrom P450 del fong, també anomenat lanosterol 14-alfa-desmetilasa o CYP51. Aquest enzim catalitza l'eliminació del grup 14-metilè (C-32) del lanosterol. Aquest sistema enzimàtic és present en un gran nombre de tipus d'éssers vius i la seva funció és la síntesi d'ergosterol (fongs) o colesterol (animals). Els azoles s'uneixen al grup hemo del citocrom i bloquegen la desmetilació del lanosterol a ergosterol, compost essencial de la membrana cel·lular dels fongs que regula la seva fluïdesa i permeabilitat, així com l'activitat dels enzims units a ella. A més en el cas dels llevats l'ergosterol és el principal component de les vesícules que participen en les reaccions de fosforilació oxidativa necessàries per a la producció d'energia. Com a conseqüència de la inhibició d'aquesta síntesi s'altera la membrana del fong i s'acumulen alguns compostos no desmetilats, que n'inhibeixen el creixement.

1.3.2.1. Fluconazole

Els triazoles, i fonamentalment fluconazole, disposen de clars avantatges en relació als imidazoles, com són: menor inhibició hormonal, menor interacció amb medicaments, formulació parenteral, millor distribució en teixits, menor alteració gastrointestinal, major estabilitat en el seu metabolisme i una vida mitjana més prolongada. El fluconazole es soluble en aigua i presenta pocs problemes de toxicitat. Fou introduït a la pràctica clínica el 1990 i la seva formulació oral es la més usada, tot i que també existeix una formulació intravenosa. El seu espectre d'acció inclou llevats com *Cryptococcus neoformans*, la majoria d'espècies del gènere *Candida*, i fongs dimòrfics (Goa i Barradell, 1995).

1.3.2.2. Itraconazole

És un antifúngic altament lipofílic amb un ampli espectre d'acció. Està indicat per al tractament de diferents formes de dermatomicosis i candidiasis, destacant la seva efectivitat sobre *Aspergillus* spp. i fongs dimòrfics. S'administra en càpsules, solució oral i intravenosa.

1.3.2.3. Voriconazole

És un triazole d'ampli espectre aprovat per al seu ús en clínica des de l'any 2002. Es troba disponible tant en formulació intravenosa com en suspensió oral i en comprimits, per a ús hospitalari. Originalment aprovat pel tractament d'infeccions sistèmiques per *Aspergillus* spp., i infeccions causades per *Scedosporium* spp. i *Fusarium* spp. resistents a altres antifúngics, actualment també s'ha aprovat el seu ús per al tractament de candidiasis invasives en pacients no neutropènics.

1.3.2.4 Posaconazole

Aquest nou triazole té un espectre d'activitat molt ampli i inclou llevats del gènere *Candida* i *Cryptococcus*, mostrant una bona activitat davant de soques de *C. albicans* resistents al fluconazole (Carrillo-Muñoz et al., 2005). És actiu envers fongs dimòrfics i altres fongs filamentosos com *Aspergillus* spp (Imai et al., 2004; Meletiadiis et al., 2002b), zigomicets (Tobon et al., 2003), *Paecilomyces lilacinus* (Rodriguez et al. 2009) i fins i tot en el cas de *Cladophialophora bantiana* (Al-Abdely et al., 2005). És poc actiu davant de *Fusarium* (Ruiz-Cendoya et al. 2009) i *Scedosporium apiospermum* (Meletiadiis et al., 2002a). Aquest antifúngic es troba disponible per ús hospitalari com a suspensió oral, i també se n'està desenvolupant una formulació intravenosa. Les seves indicacions d'ús inclouen el tractament d'aspergilosis invasives, fusariosi, cromoblastomicosis i micetoma, coccidioidomicosi i candidiasi orofaríngia.

1.3.2.5. Ravuconazole

Estructuralment molt similar al fluconazole, el ravuconazole és un nou triazole d'ús oral. La seva eficàcia *in vitro* és en general superior a la del fluconazole i a la de l'itraconazole, essent actiu envers *Candida*, *C. neoformans*, *A. fumigatus*, dermatòfits i

Introducció

fongs dematiacis (Fung-Tomc et al., 1998). Tanmateix, la seva activitat sobre *Sporothrix schenckii*, *Scedosporium* spp i *Fusarium* spp és limitada. El seu ús encara no ha estat aprovat i actualment es troba en assaigs clínics en fase II.

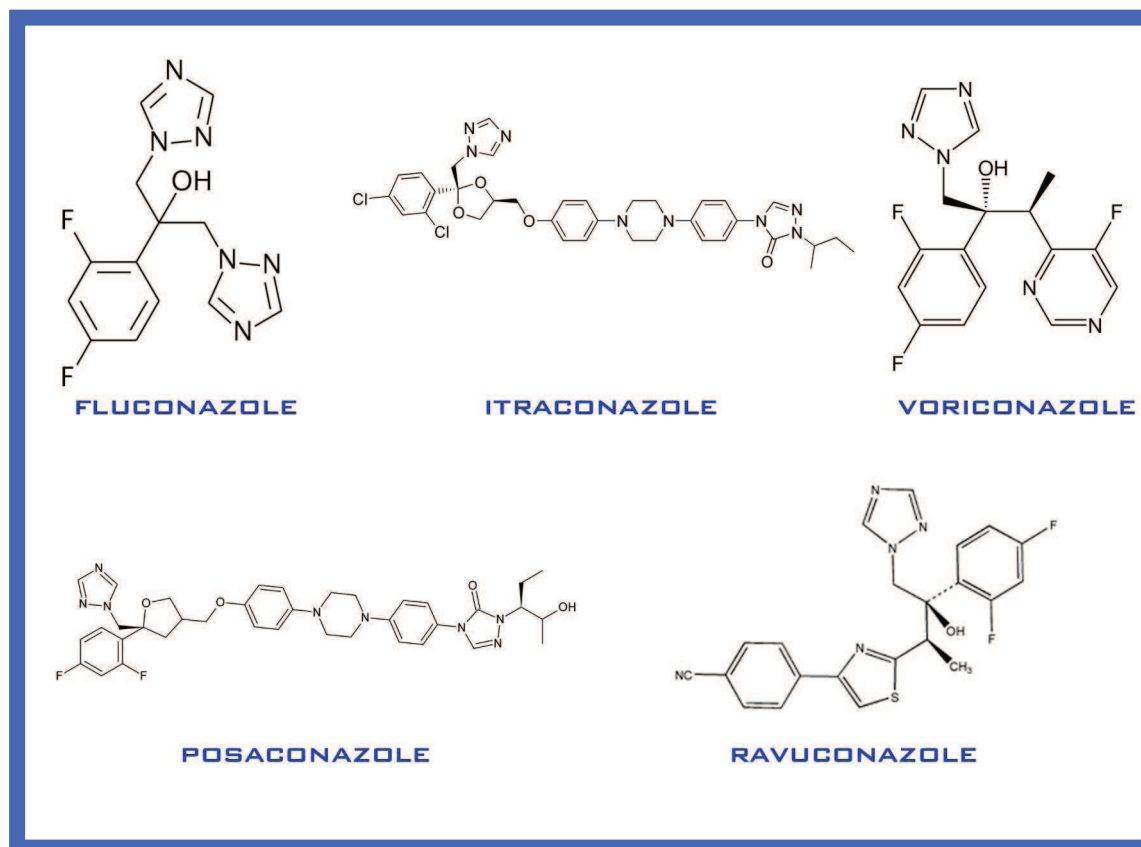


Figura 2. Estructura química dels triazoles

1.3.3. Anàlegs de precursors d'àcids nucleics

Són substàncies d'estructura similar a la citosina. El compost més representatiu d'aquest reduït grup d'antifúngics és la flucitosina.

1.3.3.1. Flucitosina

Aquest compost és una pirimidina fluorada (Figura 3). La penetració d'aquest fàrmac a la cèl·lula fúngica es realitza a través d'una permeasa i un cop al citoplasma és alterada enzimàticament donant com a resultat àcid 5-fluorouridílic que s'incorpora a l'RNA interrompent així la síntesi protèica. La flucitosina també pot ser convertida a 5-fluorodeoxiuridina monofosfat, un inhibidor de la síntesi de DNA i de la divisió nuclear. Tot i haver demostrat eficàcia contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp. i fongs dematiacis causants de cromoblastomicosis (Mauceri et al., 1974), el seu ús es troba actualment

gairebé limitat a l'administració, en combinació amb amfotericina B o itraconazole, en la meningitis per *Cryptococcus* (Dismukes *et al.*, 1987; Mayanja-Kizza *et al.* 1998), tot i que també s'administra en alguns casos d'endocarditis, meningitis o infeccions urinàries causades per *Candida* (Pappas *et al.*, 2009).

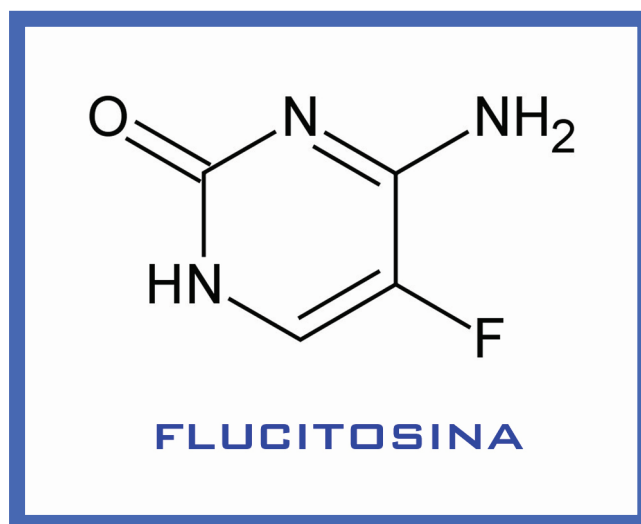


Figura 3. Estructura química de la flucitosina

1.3.4. Equinocandines

El glucà és el polímer que constitueix el principal component de la paret de les cèl·lules fúngiques, mantenint-ne la morfologia i protegint-les dels canvis osmòtics ambientals. Les equinocandines són polipèptids cíclics que bloquegen la síntesi de glucans per mitjà de la inhibició de l'enzim (1,3)- β -D-glucà sintasa, que és l'encarregat de formar aquests polímers, induint una inestabilitat osmòtica a la paret fúngica que pot conduir a la mort de la cèl·lula. Aquest enzim no es troba a les cèl·lules animals, això fa de les equinocandines un grup de fàrmacs amb una toxicitat molt reduïda.

Tot i que son actives envers *Candida* i *Aspergillus*, pràcticament no tenen cap efecte sobre *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* i els mucorals, i la seva activitat sobre els fongs dimòrfics és també qüestionable. D'altra banda, han presentat certa activitat *in vitro* davant de fongs difícils de tractar com *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans* i *Cladophialophora bantiana*.

Introducció

1.3.4.1. Caspofungina

La caspofungina es troba comercialitzada per a ús hospitalari i està indicada per al tractament de candidiasi invasives i infeccions causades per *Aspergillus*.

1.3.4.2. Micafungina

D'ús aprovat a Europa des de l'any 2008, les indicacions d'aquesta equinocandina són el tractament de les candidiasis invasives, la profilaxi de les infeccions fúngiques causades per *Candida* spp. en pacients amb trasplantament de medul·la òssia i tractament de la candidiasi esofàgica en aquells pacients per als quals la teràpia intravenosa es adequada.

1.3.4.3. Anidulafungina

La FDA va autoritzar-ne el seu ús als Estats Units d'Amèrica per al tractament de la candidiasi esofageal i de candidiasis invasives l'any 2006. Actualment el seu us està aprovat a Europa per al tractament de les candidiasis invasives en pacients no neutropènics.

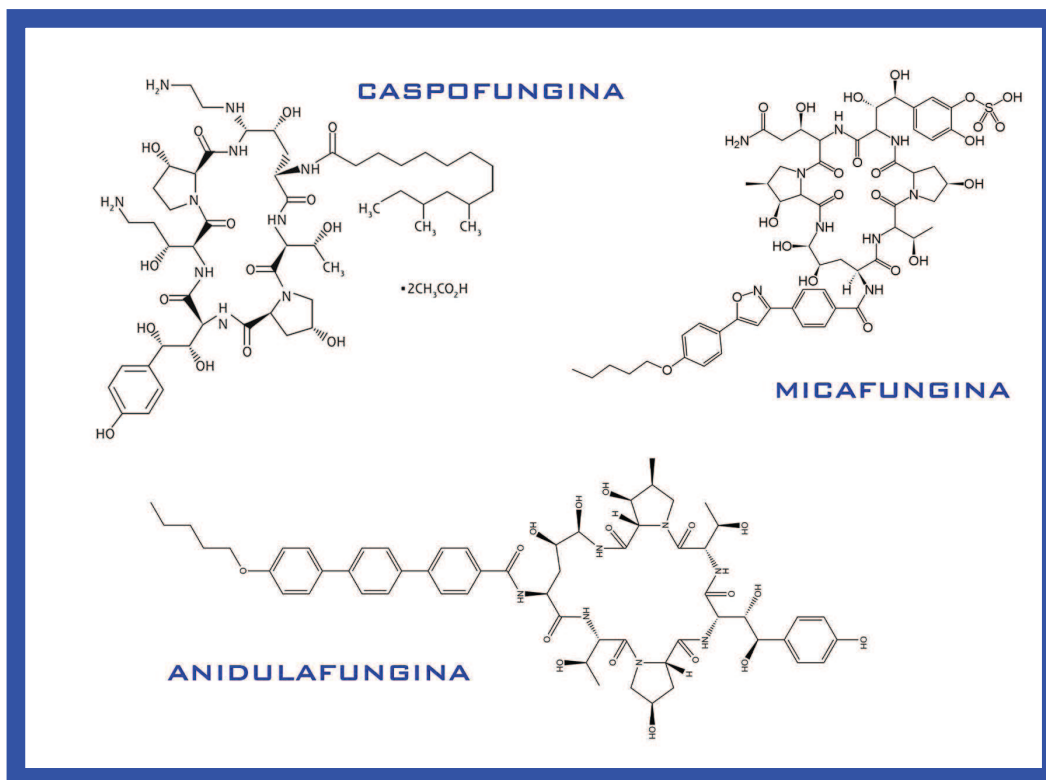


Figura 4. Estructura química de les equinocandines

1.3.5. Alilamines

L'acció antifúngica d'aquestes substàncies ve donada pel bloqueig de la ruta biosintètica de l'ergosterol per la inhibició de l'esqualè epoxidasa, un enzim que no depèn del citocrom P-450. El seu efecte fungicida és degut en part a la reducció del contingut de l'ergosterol de la membrana cel·lular i l'acumulació d'esqualè a l'espai plasmàtic. El representant més important d'aquesta família és la terbinafina (Figura 5).

1.3.5.1. Terbinafina

Com a conseqüència de la seva naturalesa altament lipofílica, es distribueix principalment en teixits com ara la pell, ungles i teixit adipós (Elewski, 1998) amb la qual cosa el seu ús terapèutic es dirigeix principalment al tractament de les dermatomicosis.

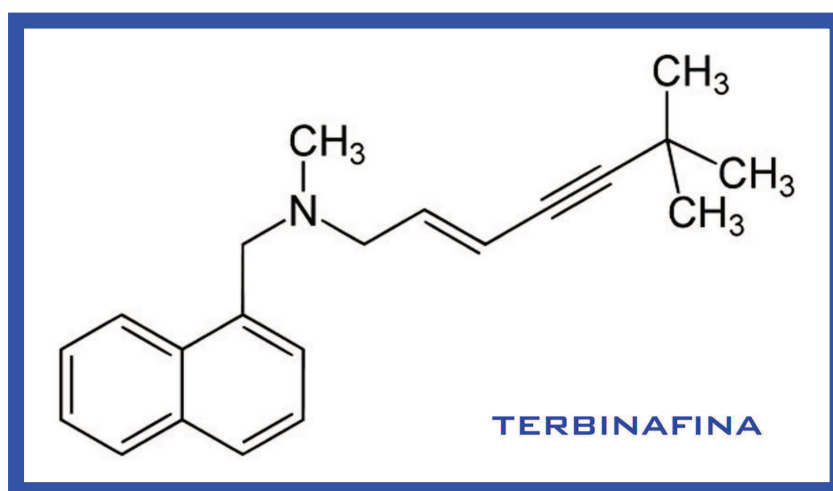


Figura 5. Estructura química de la terbinafina

1.4. Determinació de la sensibilitat als antifúngics

Els mètodes i tècniques d'estudi de la sensibilitat *in vitro* dels fongs als agents antifúngics són similars a les dels antibacterians, i el seu disseny segueix els mateixos patrons (Espinell-Ingroff i Shadomy 1989; Shadomy i Shadomy 1991). La tècnica més utilitzada per a l'estudi de la sensibilitat *in vitro* dels fongs és la dilució en medi líquid (micromètode). Mitjançant aquesta tècnica es pot quantificar l'activitat de l'antifúngic, expressada com la CMI o concentració mínima d'antifúngic capaç d'inhibir el

Introducció

creixement del fong. Així es pot avaluar la sensibilitat *in vitro* d'un fong a un o més antifúngics, relacionar aquests resultats amb l'activitat dels fàrmacs en estudis *in vivo*, i poder-ne fer una estimació del seu potencial terapèutic. És útil també, per fer un seguiment de l'aparició de soques resistents (Espinel-Ingroff, 1994).

El procés necessari per l'estandardització de les proves d'estudi dels antifúngics és molt lent, ja que s'han de tenir en compte gran nombre de variables que poden influir en els resultats, com són: el medi de cultiu, el pH del medi, la densitat de l'inòcul, la temperatura i el temps d'incubació (Doern *et al.*, 1986; Espinel-Ingroff i Shadomy, 1989; McGinnis i Rinaldi, 1991; Pfaller i Rinadi, 1992; Pujol *et al.*, 1997; Rex *et al.*, 1993 ; Shadomy i Shadomy 1991).

Els estudis que han avaluat les correlacions *in vitro* / *in vivo* són molt escassos, tot i això, aquestes proves han jugat un paper important en el desenvolupament dels nous antifúngics, i també en les avaluacions *in vivo* que precedeixen els estudis clínics. El fet que les infeccions fúngiques siguin menys freqüents que les infeccions bacterianes, implica que hi hagi un nombre inferior de dades disponibles per establir possibles correlacions. A l'hora d'establir punts de tall i poder separar les soques sensibles de les resistents és important disposar d'un nombre suficient de dades acumulades.

Els mètodes per determinar la sensibilitat dels fongs *in vitro* no van tenir rellevància fins els anys 70, quan es va iniciar l'ús dels primers azoles. Tenint en compte que el primer antifúngic es va descobrir 30 anys després del primer antibacterià, i que van passar gairebé 20 anys abans de la introducció de la flucitosina i dels primers azoles, les proves de sensibilitat als antifúngics porten uns 50 anys d'endarreriment respecte a les proves de sensibilitat als antibacterians (Revankar i Graybill, 2002).

És per aquest motiu que els mètodes estàndard per avaluar la sensibilitat *in vitro* als diferents antifúngics no van ser aprovats en el cas de llevats fins l'any 1997 (M27-A) i en el cas de fongs filamentosos fins l'any 2002 (M38-A, NCCLS, 2002).

1.4.1. Mètodes *in vitro*

L'any 1982 el NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) actualment CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), va crear un subcomitè per estandarditzar les proves de sensibilitat als antifúngics. El seu objectiu va ser unificar els

critèris metodològics per realitzar aquestes proves, amb la finalitat d'establir les correlacions entre els resultats obtinguts al laboratori i en clínica.

1.4.1.1. Els llevats

La primera iniciativa del subcomité, l'any 1986, va ser realitzar una enquesta amb la finalitat de conèixer l'estat dels estudis de sensibilitat *in vitro* dels antifúngics als Estats Units (Calhoun et al., 1986). Els resultats de les enquestes, enviades a 350 hospitals indicaven que, encara que existia un gran interès per aquestes proves, molt pocs hospitals les duïen a terme, i els hospitals que les utilitzaven només ho feien en el cas dels llevats. La majoria dels hospitals que realitzaven estudis de sensibilitat, utilitzaven el mètode de macrodilució en medi líquid, encara que la metodologia utilitzada era molt diversa.

Els anys 1987, 1988, 1990, i 1993 es varen realitzar quatre estudis de col·laboració entre diversos laboratoris, en els quals es van anar perfilant quines eren les condicions que permetien obtenir uns resultats més uniformes i una major correlació amb els resultats clínics. Els antifúngics assajats van ser l'amfotericina B, la flucitosina i el ketoconazole, que eren els fàrmacs aprovats en aquella època als Estats Units per al tractament sistèmic de les micosis. Es va començar per comparar quatre mètodes de preparació de l'inòcul. El mètode espectrofotomètric va ser el que va mostrar una major uniformitat de resultats dins d'un mateix laboratori, així com entre els diferents laboratoris participants (Pfaller *et al.*, 1990; Espinel-Ingroff i Kerkering, 1991). Aquests resultats foren corroborats després per altres autors (Espinel-Ingroff *et al.*, 1992; Fromtling *et al.* 1993). Posteriorment es varen avaluar quatre medis de cultiu: YNB glucosat (medi amb base de nitrogen per llevats), HR, medi sintètic d'aminoàcids i RPMI-1640, tots ells tamponats amb MOPS (àcid morfolinopropanosulfònic) a pH 7.0, i es compararen dues temperatures d'incubació (30 i 35° C). Finalment es va establir el criteri de lectura de les CMI per cadascun dels antifúngics assajats. Com a resultat de tots aquests estudis realitzats, com ja hem dit, en col·laboració entre diferents laboratoris, l'any 1992 es va redactar una proposta de metodologia estàndard, recollida al document M27-P. Durant els quatre anys següents (1992-1996), es van establir els rangs de referència de les CMI dels antifúngics disponibles per a les dues soques control. A més es van establir les condicions que s'haurien d'utilitzar per al mètode de microdilució i el de macrodilució. Aquesta informació es va incloure en una versió revisada i publicada l'any 1995 (M27-T). En una revisió posterior, el subcomité va centrar la seva atenció en desenvolupar punts de tall significatius per als diferents antifúngics, (Rex *et al.*, 1997) i

Introducció

es van incloure al document M27-A publicat l'any 1997. A partir d'aquell moment, el subcomitè va establir rangs de referència per a les CMI's llegides a 24 i 48 hores per als antifúngics tradicionals així com per alguns dels nous (Barry *et al.*, 2000). Els resultats d'aquest estudi foren inclosos a la següent revisió del document (M27-A2, NCCLS, 2002). Els únics punts de tall establerts en aquest document foren pel fluconazole, l'itraconazole i la flucitosina. Posteriorment es varen proposar punts de tall per la caspofungina i el voriconazole per *Candida* spp. (Stone *et al.*, 2002; Pfaller *et al.*, 2006a). L'actual revisió del document (M27-A3, CLSI, 2008) descriu els punts de tall pel voriconazole i les CMI's indicatives de sensibilitat per equinocandines, tot i que no es disposa de prou dades clíniques per poder establir un criteri indicatiu de resistència per aquest grup d'antifúngics. Tanmateix, aquest document presenta diverses limitacions ja que només inclou *Candida* spp. i *Cryptococcus neoformans*, i encara no es troba completament validat per les formes de llevat dels fongs dimòrfics ni per altres llevats poc habituals. Actualment, tot i que s'estan estudiant, no s'han descrit punts de tall per al posaconazole i el ravuconazole.

1.4.1.2. Els fongs filamentosos

Prenent les condicions bàsiques acordades al document M27-A com a referència, el subcomitè del CLSI va formar un grup per realitzar estudis, recollir dades, i posar a punt la metodologia per poder fer els estudis de sensibilitat amb els fongs filamentosos. Espinel-Ingroff i Kerkerling en un estudi publicat l'any 1991 van avaluar el mètode espectrofotomètric per a la preparació de les suspensions de conidis que constituïen l'inòcul en el cas dels fongs filamentosos (Espinel-Ingroff i Kerkerling, 1991). El medi de cultiu que el subcomitè va avaluar com a medi de referència potencial per fer els estudis de sensibilitat va ser l'RPMI 1640, ja que havia donat bons resultats en els estudis per llevats i també va permetre identificar la possible resistència de soques d'*Aspergillus* a l'itraconazole (Denning *et al.*, 1997).

Posteriorment el subcomitè del CLSI va dissenyar un estudi multicèntric en que varen participar sis laboratoris i es van utilitzar 25 soques de les següents espècies: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Rhizopus arrhizus* (*R. oryzae*), *Pseudallescheria boydii* i *Sporothrix schenckii*. Es va utilitzar el medi RPMI 1640, la temperatura d'incubació va ser de 35° C i la concentració de l'inòcul va ser d'aproximadament 10⁴ unitats formadores de colònies per mil·lilitre (ufc/ml), en lloc del recomanat per llevats que és de 10³ ufc/ml. Els valors de CMI per a l'amfotericina B, el fluconazole, l'itraconazole, el

miconazole i el ketoconazole, van ser determinats a les 24 hores d'incubació en el cas d'*Aspergillus* spp. i *Rhizopus oryzae* i de 72 hores per als altres. La reproductibilitat (± 2 dilucions) dels resultats que es van obtenir tant dins d'un mateix laboratori com entre els laboratoris participants va ser alta per a tots els antifúngics assajats, amb l'excepció de l'itraconazole. En estudis posteriors es va comprovar si amb la utilització d'un inòcul de menor concentració, similar a l'utilitzat a les proves per llevats (10^3 ufc/ml), es podria obtenir una major concordança entre laboratoris.

Com a resultat dels dos estudis realitzats en col·laboració amb diversos laboratoris es va arribar a un acord pel que fa a les condicions de preparació del inòcul, el temps i la temperatura d'incubació, la formulació del medi, i els criteris per a la lectura de la CMI. Un estudi addicional va demostrar un cert grau de correlació entre els resultats de les proves *in vitro* i la resposta als tractaments en estudis amb models animals (Espinell-Ingroff et al., 1997; Odds et al., 1998). Amb aquesta informació es va redactar el document M38-P, una proposta del mètode de referència que, amb lleugeres variacions, va donar lloc al document definitiu M38-A l'any 1998.

Després de dues revisions, el document actual (M38-A2, NCCLS, 2002) inclou un major nombre d'espècies com d'altres zigomicets, diversos fongs filamentosos oportunistes, així com els dermatòfits (*Trichophyton*, *Microsporum* i *Epidermophyton* spp.) (Espinell-Ingroff et al., 2002; Espinell-Ingroff i Pfaller, 2007; Ghannoum et al., 2004).

1.4.1.3. Interaccions entre antifúngics

La combinació d'agents antimicrobians s'utilitza principalment per ampliar empíricament l'espectre d'acció dels tractaments utilitzats en pacients en estat crític, o per microorganismes resistents als tractaments convencionals simples. En el cas dels antifúngics, el recent augment del nombre de fàrmacs disponibles ha suscitat un gran interès per l'exploració de les possibilitats d'aquestes combinacions, per al tractament de les infeccions causades per fongs.

Per tal de classificar les interaccions d'antifúngics s'han utilitzat diferents terminologies, essent la més acceptada actualment la que les agrupa en les següents categories:

Introducció

Sinergisme: Quan l'activitat conjunta dels fàrmacs assajats és superior al que s'esperaria del sumatori de les activitats pròpies de cada fàrmac, diem que es tracta d'una interacció sinèrgica.

Indiferència: Aquest terme descriu un rang d'interaccions molt més difícil de definir, incloent des de l'activitat additiva que s'esperaria d'una combinació de fàrmacs que ja eren actius pel seu compte, fins a aquelles combinacions en que s'addicionen, sense èxit, components que no eren actius pel seu compte a fàrmacs actius, per tal de potenciar-ne l'activitat. En cap cas però, s'inclouen en aquesta categoria combinacions que redueixin l'activitat pròpia de cada fàrmac.

Antagonisme: En aquesta categoria s'inclouen combinacions de fàrmacs, la interacció dels quals es contraproductiva a l'hora d'inhibir el creixement del fong. En aquests casos l'efectivitat de dos fàrmacs actius per separat es pot veure reduïda.

Els assaigs *in vitro* suposen una primera aproximació a l'hora de definir l'activitat conjunta de dos o més antifúngics sobre una espècie o una soca concreta, abans de procedir a les proves en models animals o als assaigs clínics.

1.4.2. Mètodes *in vivo*. Models experimentals en animals

A les primeres fases de desenvolupament d'un antifúngic (fase preclínica), els estudis *in vitro* són útils per determinar la seva capacitat d'inhibició del creixement de microorganismes patògens. Aquests estudis determinaran el potencial valor terapèutic de l'antifúngic. Posteriorment els assaigs en cultius cel·lulars permetran avaluar el seu potencial carcinogènic així com altres efectes tòxics. Abans de dur a terme els estudis clínics és imprescindible realitzar estudis preclínics amb models animals.

Per demostrar l'eficàcia terapèutica de l'antifúngic és necessari desenvolupar prèviament un model animal que imiti el procés de la malaltia infecciosa observada en clínica humana. L'eficàcia de la teràpia es pot avaluar mitjançant la prolongació de la supervivència dels animals infectats i / o la reducció de la càrrega fúngica en els òrgans, així com amb l'estudi histopatològic. Els models animals serveixen també per a l'estudi de les propietats farmacocinètiques del compost, tals com la via d'administració, la distribució als teixits, la seva eliminació i les possibles interaccions amb d'altres fàrmacs, així com per determinar la tolerància i la toxicitat del producte.

Tot i que els models animals no poden simular totes les condicions de les infeccions en humans, presenten certs avantatges respecte els assajos clínics (Stevens, 1996). La dificultat en el tractament inherent a les infeccions fúngiques greus, en combinació amb la relativa baixa freqüència d'aquestes i les condicions crítiques del pacient, alenteixen molt l'obtenció de dades concloents en assajos clínics. La utilització de models animals en canvi, ens permet una obtenció de dades molt més ràpida i en condicions més controlades, ja que permeten eliminar alguns dels factors limitants abans esmentats, així com d'altres factors de variabilitat entre individus.

Les teràpies antifúngiques combinades representen una opció a tenir en compte a l'hora de millorar el tractaments actuals, però han estat relativament poc explorades, sobretot si ho comparem amb els coneixements actuals en el camp dels antibacterians. En aquest cas, els models animals representen una eina molt útil a l'hora de predir la possible eficàcia d'aquestes combinacions (Clemons *et al.*, 2006).

L'animal més utilitzat per assajar nous tractaments antifúngics és el ratolí, per la facilitat que suposa la seva manipulació, adquisició i manteniment, presentant en molts casos, una semblança notable de l'evolució de la infecció amb les observacions realitzades en humans (Graybill, 2000). La rata, el conill o el cobai són els animals d'elecció en les ocasions en què el ratolí no es pot utilitzar per a l'experimentació, donada la farmacocinètica de l'antifúngic, o bé quan és necessari contrastar els resultats amb els obtinguts en altres animals d'experimentació (Serena *et al.*, 2006, Roffey *et al.*, 2003). D'altres models menys habituals també inclouen la utilització de protozous i invertebrats (Mylonakis *et al.*, 2007), que tot i essent menys extrapolables als humans, presenten certs avantatges a l'hora d'identificar nous agents antifúngics (Pukkila-Worley *et al.*, 2009).

Mesurar l'eficàcia *in vivo* és l'objectiu més important, i el primer que cal investigar un cop els antifúngics han superat les proves *in vitro*. La demostració de l'eficàcia depèn molt de les condicions experimentals, i està influenciada per l'absorció, la distribució, i l'eliminació de l'antifúngic, de la concentració i via d'administració de l'inòcul, de l'estat immunològic de l'hoste i de la durada del tractament. Cada model té avantatges i inconvenients depenent de quin sigui el tipus d'infecció produïda en els animals.

Introducció

2. Interès i objectius de l'estudi

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

La incidència d'infeccions fúngiques sistèmiques està augmentant de manera proporcional al nombre cada cop més gran de pacients que sofreixen d'altres malalties de base que els n'alteren la immunitat. Malgrat els avenços en el seu diagnòstic i tractament, la taxa de mortalitat associada és molt elevada per aquest tipus d'infeccions. Tot i les múltiples opcions terapèutiques que existeixen avui en dia, aquestes encara disten força de ser les òptimes. Es fa, per tant, necessària una millora dels tractaments actuals. Algunes espècies del gènere *Candida* són la causa més habitual de micosis invasives en els éssers humans; tot i això d'altres espècies de fongs menys comunes representen un important repte terapèutic que cal afrontar. Per tant, l'objectiu principal d'aquesta tesi és **contribuir a desenvolupar nous tractaments per a les infeccions causades per llevats o intentar millorar alguns dels ja existents**.

Tot i l'aparició dels imidazoles i la flucitosina, durant dècades només s'ha disposat d'una classe d'agents antifúngics, els poliens, que siguin realment efectius per al tractament de la candidiasi disseminada, però que presenten importants problemes de toxicitat. Tanmateix, amb l'arribada d'azoles més actius (els triazoles), formulacions lipídiques d'amfotericina B més segures, i la nova classe d'antifúngics, les equinocandines, els clínics es troben en posició de poder triar entre múltiples agents antifúngics per al tractament de la candidiasi disseminada. Actualment, però, i a causa de la seva recent aparició, encara no es disposa d'un recull de dades experimentals i clíniques suficientment gran sobre aquests nous fàrmacs i la seva aplicació pel tractament d'aquest tipus d'infeccions. Es fa necessari, per tant, obtenir més informació sobre l'efectivitat d'aquests nous tractaments, especialment la seva activitat envers les espècies de *Candida* més habituals, així com el seu potencial per al desenvolupament de teràpies combinades. És per això que en aquesta tesi s'ha avaluat l'activitat tant *in vitro* com *in vivo* de nous antifúngics com el voriconazole, el posaconazole i les equinocandines, així com de l'associació d'aquests amb antifúngics tradicionals.

La capacitat d'establir infeccions disseminades en animals no és igual per a totes les espècies de *Candida*, i és per això que hem desenvolupat un model animal adequat per a cada espècie estudiada.

Interès i objectius de l'estudi

Candida glabrata és una de les espècies de *Candida* més freqüentment aïllades en clínica i la taxa de mortalitat que genera quan produeix infeccions disseminades és molt elevada. El fluconazole i l'amfotericina B són els fàrmacs tradicionalment recomanats per tractar aquest tipus d'infeccions. No obstant això, algunes soques han demostrat posseir una resistència inherent al fluconazole, mentre que l'ús de l'amfotericina B es troba limitat en aquells pacients que es troben en estat crític. A més dels nous fàrmacs, la utilització de teràpies combinades també és una opció interessant per tal de reduir les dosis utilitzades de cada antifúngic, i reduir el risc d'aparició de soques resistents. En aquesta situació, **l'avaluació de l'eficàcia de nous tractaments envers les infeccions disseminades causades per *C. glabrata* en un model experimental** es pot considerar una font d'informació molt valuosa per tal de millorar els tractaments actuals per aquest tipus d'infeccions, essent per tant, un dels objectius d'aquesta tesi.

Els punts concrets d'aquest objectiu són:

- Desenvolupar un model d'infecció disseminada per *C. glabrata* en ratolins, que permeti d'avaluar tant la mortalitat com la càrrega fúngica en òrgans claus com el ronyó i la melsa.
- Avaluar l'eficàcia de compostos que pertanyen a diferents classes d'antifúngics en un model d'infecció disseminada per *C. glabrata*.
- Determinar l'eficàcia de la micafungina en combinació amb l'amfotericina B o el fluconazole en un model d'infecció disseminada per *C. glabrata*.

Tot i que la incidència d'infeccions causades per *C. krusei* és menor que la d'altres espècies de *Candida*, la seva pobra resposta a certs antifúngics i l'elevada taxa de mortalitat, que s'associa a les infeccions disseminades causades per aquesta espècie, en fa necessària l'avaluació de nous fàrmacs per tractar-les. El voriconazole és un antifúngic d'aparició relativament recent, considerat com una de les teràpies recomanades per a infeccions disseminades causades per *C. krusei*, però que encara no compta amb un extens recull d'experiència clínica sobre la seva eficàcia. Per la seva banda el posaconazole, d'aparició més recent, presenta una mancança encara més important de dades clíniques. És per això que un altre objectiu d'aquesta tesi ha estat **l'avaluació de l'eficàcia del voriconazole i el posaconazole en un model**

experimental d'infecció disseminada per *C. krusei*, per tal de comparar l'eficàcia d'aquests nous triazoles entre ells i amb l'amfotericina B, el tractament tradicional encara vigent per aquest tipus d'infeccions.

De manera més concreta:

- Desenvolupar un model d'infecció disseminada per *C. krusei* en ratolins, que permeti d'avaluar tant la mortalitat com la càrrega fúngica en òrgans claus com el ronyó i la melsa.
- Avaluar l'eficàcia del voriconazole, el posaconazole i l'amfotericina B en un model d'infecció disseminada per *C. krusei*.
- Determinar la possible relació de l'activitat *in vitro* dels nous triazoles envers *C. krusei* amb la seva efectivitat *in vivo*.

Les equinocandines, presenten una baixa toxicitat i molt rarament s'han donat casos d'infeccions per *Candida* refractàries al tractament amb aquest grup d'antifúngics de recent aparició. *Candida dubliniensis* no destaca per presentar resistències als antifúngics, llevat d'algunes soques resistents o capaces de desenvolupar resistència a fluconazole. Tanmateix, diversos estudis recents han descrit una sèrie de creixements anòmals (com l'efecte paradoxal) en fer proves *in vitro* de sensibilitat a les equinocandines, en una proporció important de soques de *C. dubliniensis*. Actualment no s'ha establert cap relació entre aquests creixements anòmals *in vitro* i una menor eficàcia dels tractaments amb equinocandines envers *C. dubliniensis*. Essent aquesta espècie una de les poques del gènere *Candida* capaç de produir infeccions letals a ratolins en un estat immunològic normal, vàrem poder desenvolupar un model d'infecció disseminada tant en animals immunocompetents com en immunocompromesos per tal d'avaluar l'activitat d'aquest grup de fàrmacs. Això ens va permetre d'avaluar l'activitat d'aquest grup d'antifúngics envers *C. dubliniensis* en hostes amb diferents estats immunitaris. Per tant, un dels objectius de la tesi ha estat **comprovar l'eficàcia de les equinocandines en dos models experimentals d'infecció disseminada per *C. dubliniensis*** i relacionar-la amb la seva activitat *in vitro*.

Interès i objectius de l'estudi

Concretament:

- Avaluar l'activitat *in vitro* de l'anidulafungina, la caspofungina i la micafungina davant de diverses soques de *C. dubliniensis*.
- Desenvolupar un model d'infecció disseminada per *C. dubliniensis* en ratolins immunocompetents i immunocompromesos, que permeti d'avaluar tant la mortalitat com la càrrega fúngica en òrgans claus com el ronyó i la melsa.
- Avaluar l'eficàcia de les equinocandines en ambdós models d'infecció disseminada per *C. dubliniensis*, per tal de poder observar l'activitat d'aquests fàrmacs en diferents estats immunològics de l'hoste.
- Determinar la possible relació de l'activitat *in vitro* de les equinocandines envers *C. dubliniensis* amb la seva efectivitat *in vivo*.

Candida tropicalis es juntament amb *C. glabrata* una de les espècies aïllades de manera més freqüent en clínica, produint una taxa de mortalitat elevada en pacients immunodeprimits i/o en estat crític. Tot i que *C. tropicalis* no destaca per presentar taxes elevades de resistència al antifúngics, diversos estudis han demostrat que els azoles, incloent els triazoles més recents, presenten una activitat fungicida limitada davant d'aquesta espècie. L'experiència clínica, però, ha demostrat que tant el fluconazole com el voriconazole són efectius pel tractament de les infeccions causades per *C. tropicalis*, i actualment es consideren tractaments d'elecció per aquest tipus d'infeccions. El posaconazole per la seva banda, és l'últim dels triazoles per al que s'ha aprovat el seu ús, però només en el cas de candidiasis orofaríngies. Per tal de definir el paper del posaconazole pel tractament d'altres tipus de candidiasis calen més dades experimentals i clíniques. És per aquests motius que hem considerat interessant incloure com a objectiu de la tesi **la comprovació de l'eficàcia del posaconazole en un model experimental d'infecció disseminada per *C. tropicalis***, per tal d'esbrinar si existeix una relació entre l'activitat fungicida del posaconazole i la seva eficàcia *in vivo* envers aquesta espècie.

Concretament:

- Avaluar l'activitat *in vitro* del posaconazole davant de diverses soques de *C. tropicalis*.

- Desenvolupar un model d'infecció disseminada per *C. tropicalis* en ratolins immunocompromesos, que permeti d'avaluar tant la mortalitat com la càrrega fúngica en òrgans diana com el ronyó i la melsa.
- Avaluar l'eficàcia *in vivo* del posaconazole envers diverses soques de *C. tropicalis* amb diferents patrons de sensibilitat per aquest fàrmac.

Essent un compost que s'administra des de fa gairebé 50 anys, el nombre de casos en que s'ha descrit el desenvolupament de resistències a l'amfotericina B és molt escàs; aquesta singularitat dins dels antimicrobians, ha fet que aquest fàrmac mantingui la seva vigència com a tractament de primera línia per a les infeccions fúngiques fins al dia d'avui. En diversos estudis inclosos en aquesta tesi, l'amfotericina B també ha demostrat en models animals una eficàcia comparable, o fins i tot superior, a la d'antifúngics més moderns.

El principal problema a l'hora d'escollir l'amfotericina B com a teràpia és la seva elevada toxicitat, que en limita molt el seu ús en aquells pacients que es troben en un estat crític. Per tal de pal·liar els efectes tòxics d'aquest fàrmac se n'han desenvolupat diverses formulacions al llarg dels anys. D'aquestes presentacions, les que han tingut una major acceptació han estat les formulacions lipídiques, que actualment es consideren una alternativa més segura a la formulació tradicional, però amb uns costos de producció molt elevats que també en limiten en part el seu ús.

Recentment s'han desenvolupat dues noves formulacions d'amfotericina B que han demostrat, en diversos estudis experimentals, una menor toxicitat que la formulació tradicional, i que poden ser administrades a dosis més elevades de forma segura. Aquestes noves formulacions, que consten d'amfotericina B en forma de poliagregats o inclosa en microesferes d'albúmina, tenen uns costos de producció reduïts i podrien representar en un futur, una possible alternativa a les formulacions actuals. Es per això que hem considerat interessant **avaluar l'eficàcia dels poliagregats i les microesferes d'amfotericina B envers *C. glabrata* o *C. tropicalis***, dues de les espècies *Candida* més freqüents en clínica, en dos models animals d'infecció disseminada.

Interès i objectius de l'estudi

De manera més concreta:

- Avaluar l'eficàcia *in vivo* de les noves formulacions envers diverses soques de *C. glabrata* i *C. tropicalis* utilitzant els models d'infecció desenvolupats prèviament.
- Comparar l'eficàcia de les noves formulacions d'amfotericina B amb la de les formulacions comercials actuals.

L'itraconazole és un dels fàrmacs més antic del grup dels azoles juntament amb el fluconazole, tot i això, el fet d'estar disponible només com a formulació oral ha impedit que se'l considerés com una opció terapèutica de primera línia per al tractament de les candidiasis invasives. Això, no obstant, podria canviar amb la nova formulació per administració intravenosa d'itraconazole que s'ha desenvolupat recentment.

Les condicions crítiques dels pacients amb infeccions per fongs sovint impedeixen l'ús d'altres dosis d'antifúngics i per tant l'administració del tractament adequat. En aquests casos, l'ús de dos fàrmacs amb dianes d'acció diferents podrien permetre tant la reducció de les dosis com del temps de tractament. Actualment es disposa de poca informació sobre les interaccions de l'itraconazole amb d'altres fàrmacs més moderns com són per exemple les equinocandines. És per això que una línia d'investigació que hem considerat interessant ha estat **l'avaluació *in vitro* del possible efecte sinèrgic de la combinació de l'itraconazole i la micafungina envers diverses espècies de *Candida***, constituint un altre objectiu de la tesi.

Cladophialophora bantiana és un fong que causa infeccions greus, principalment en hostes immunocompetents. Tanmateix, fins a un 40% dels casos s'han descrit en pacients amb algun factor predisposant, com ara trasplantament d'òrgans, teràpia amb esteroides o abús de drogues per via intravenosa. Aquesta espècie presenta un marcat neurotropisme, i produeix una taxa de mortalitat molt elevada. Aquestes infeccions no s'acostumen a resoldre només amb tractaments antifúngics i la intervenció quirúrgica dels abscessos cerebrals que produeix esdevé imprescindible. Actualment no hi ha un consens en la teràpia d'elecció. Les escasses dades experimentals existents indiquen que tant la flucitosina com el posaconazole presenten certa activitat envers aquest tipus d'infeccions en models animals, però sense assolir

mai una completa resolució d'aquestes. Per tant, **l'avaluació de l'eficàcia de la combinació d'agents antifúngics pel tractament d'una infecció experimental per *C. bantiana***, ha estat també un dels objectius d'aquesta tesi.

Els punts concrets d'aquest objectiu són:

- Desenvolupar un model d'infecció disseminada per *C. bantiana* en ratolins, que permeti d'avaluar-ne la mortalitat.
- Avaluar l'eficàcia de compostos que pertanyen a diferents classes d'antifúngics sols i en combinació en un model d'infecció disseminada per *C. bantiana*.

Interès i objectius de l'estudi

3. Materials i Mètodes

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

3.1. Estudis *in vitro*

3.1.1. Soques

Per efectuar les proves de sensibilitat *in vitro* als antifúngics, es varen seleccionar un total de 115 soques corresponents a 7 espècies de *Candida* d'interès clínic (Taula 1).

Taula 1. Llistat de soques de <i>Candida</i> spp. utilitzades als diferents estudis <i>in vitro</i> i el seu origen		
Espècie (nº de soques assajades)	Procedència	Nº de soques
<i>Candida albicans</i> (20)	ACIA/UPV	15
	HSJ	5
<i>C. dubliniensis</i> (25)	ACIA/UPV	25
<i>C. glabrata</i> (3)	HSJ	3
<i>C. krusei</i> (21)	HSJ	10
	ACIA/UPV	10
	ATCC	1
<i>C. lusitaniae</i> (10)	ACIA/UPV	10
<i>C. parapsilosis</i> (26)	HSJ	10
	ACIA/UPV	15
	ATCC	1
<i>C. tropicalis</i> (10)	HSJ	10

ACIA, Assessoria científica y d'Investigació aplicada, Dep. de Microbiologia, Barcelona, Catalunya

UPV, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco. Euskadi.

HSJ, Hospital Sant Joan de Reus, Reus, Catalunya

ATCC, American type culture collection, Manassas, EUA

3.1.2. Conservació de les soques

Les diferents soques van ser mantingudes a 4 ° C en tubs d'agar patata i dextrosa inclinat (PDA), i tubs d'agar inclinat recoberts de vaselina, i també van ser liofilitzades. Per a l'obtenció de l'inòcul, les soques es van sembrar en plaques d'agar Sabouraud dextrosa (SDA) i foren incubades a 37 ° C durant 24 hores.

3.1.3. Agents antifúngics

Els antifúngics assajats a les proves *in vitro* foren la micafungina, l'amfotericina B, el fluconazole, l'itraconazole, el voriconazole, el posaconazole, la caspofungina, l'anidulafungina i la flucitosina (Taula 2). Els productes es varen obtenir en forma de pols, d'una puresa d'entre el 80 i el 100%.

Taula 2. Antifúngics assajats *in vitro* als diferents estudis

Antifúngic	Procedència	Puresa	Solvent
Flucitosina	Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA	99% ⁿ	Aigua
Amfotericina B	Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA	80% ⁿ	DMSO
Anidulafungina	Pfizer Inc., New York, EUA	82.4% ^c	DMSO
Caspofungina	Merck & Co., Inc., Rahway, EUA	100% ⁿ	Aigua
Itraconazole	Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bèlgica	100% ^a	DMSO
Fluconazole	Pfizer Inc., Madrid, Espanya	98.5% ^a	Aigua
Micafungina	Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japó	100% ^c	Aigua
Posaconazole	Schering-Plough Res. Inst., Kenilworth, EUA	98% ^a	DMSO
Voriconazole	Pfizer Inc., Madrid, Espanya	100% ^a	DMSO

^a Conservació a temperatura ambient.

ⁿ Conservació a 4° C

^c Conservació a -20° C

3.1.4. Metodologia

Per estudiar la sensibilitat dels llevats a diferents antifúngics, es va seguir el protocol recomanat pel "Clinical Laboratory Standard Intitute" (CLSI), documents M27-A2 / M27-A3.

3.1.4.1. Preparació de les microplaques d'antifúngics

Els antifúngics assajats amb els seus respectius solvents es descriuen en la Taula 2. El procés que es va seguir fou:

Preparació de la solució mare de l'antifúngic

Es va pesar la quantitat suficient de substància en pols per obtenir una concentració 100 vegades superior a la concentració més alta de antifúngic a assajar, i es va dissoldre en dimetilsulfòxid (DMSO) o H₂O destil·lada estèril depenent de la solubilitat de cada producte.

Preparació del gradient de concentracions

Pels antifúngics insolubles en aigua, a partir de la solució mare (1600 µg/ml) es va preparar un banc de dilucions dobles progressives seguint l'esquema de la Figura 6. Posteriorment es va diluir el contingut de cada tub en medi RPMI en una proporció 1:50. Pels antifúngics solubles en aigua, el banc de dilucions es va realitzar directament en medi RPMI.

Seguint un ordre descendent de concentracions corresponents a les columnes de la microplaca, es van dispensar 100 µl de cada dilució a cadascun dels pouets de cada columna. Les dues últimes columnes es van omplir només amb RPMI (o RPMI + 2% de DMSO depenent de cada antifúngic). Aquestes dues columnes s'utilitzen com a control negatiu (control d'esterilitat del medi) i com a control positiu (màxim creixement del fong).

El rang de concentracions d'antifúngic va ser de 16 a 0.03 µg/ml per a tots els assaigs que incloïen un sol fàrmac. Un cop preparades, les microplaques es van segellar per evitar l'evaporació del líquid i es van guardar al congelador a -20° C durant

sis mesos com a màxim. El dia de l'assaig, les microplaques es van descongelar a temperatura ambient i van ser dispensats 100µl de l'inòcul a cada pouet, amb excepció del corresponent al control d'esterilitat del medi. Les microplaques es varen incubar a 35 ° C durant 24-48 hores.

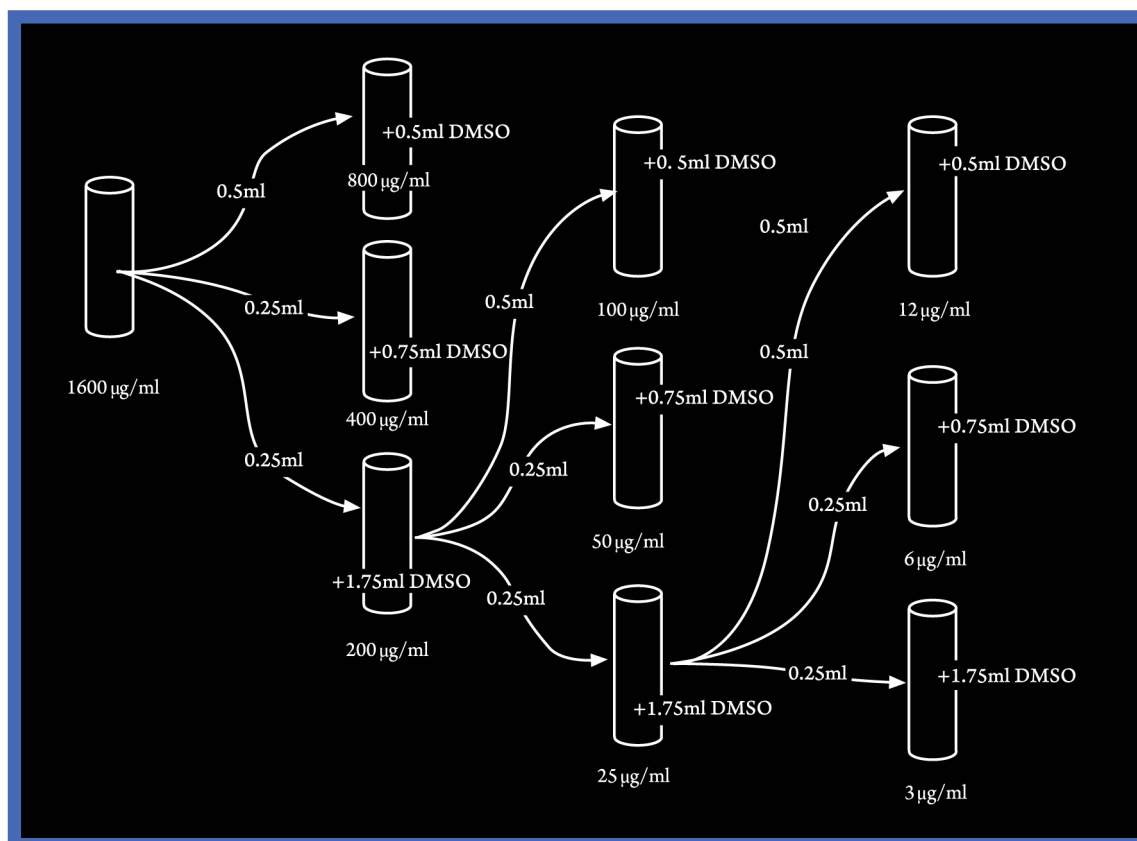


Figura 6. Esquema del banc de dilucions utilitzat per realitzar els assaigs *in vitro*

3.1.4.2. Preparació de les microplaques de combinacions antifúngiques

Es va preparar un gradient de concentracions per a cadascun dels antifúngics utilitzats seguint el mètode descrit pel CLSI. Es van utilitzar microplaques de 96 pouets de fons còncav. El volum final va ser de 100 µl a tots els pouets de les microplaques. Es van estudiar un total de cinc combinacions d'antifúngics, que es van disposar en files o columnes a les microplaques per acabar formant un gradient doble de concentracions en forma de tauler d'escacs (Figura 7).

Micafungina. Es va utilitzar un gradient de concentracions de 32 a 0.06 µg/ml, dispensant 50 µl als pouets de les columnes 2 a la 11.

Itraconazole. Es va utilitzar un gradient de concentracions de 8 a 0.12 µg/ml, dispensant-ne també 50 µl als pouets de les files A a la G.

Posteriorment es van realitzar microplaques amb els gradients de concentracions invertits per als dos antifúngics, per tal d'estudiar un rang de concentracions més gran amb l'itraconazole.

A la columna 1 (files de la A a la G) de cada microplaca, es va dispensar un únic antifúngic (micafungina o itraconazole) per establir la CMI de l'antifúngic sol.

A la fila H (columnes de la 2-11) de cada microplaca, es va dispensar un únic antifúngic (itraconazole o micafungina) per establir la CMI de l'antifúngic sol.

Els pouets de l'última columna (A12-G12) es van destinar al control positiu (creixement del fong en absència d'antifúngics). Els pouets H1 i H12 es van destinar al control negatiu (control d'esterilitat del medi de cultiu).

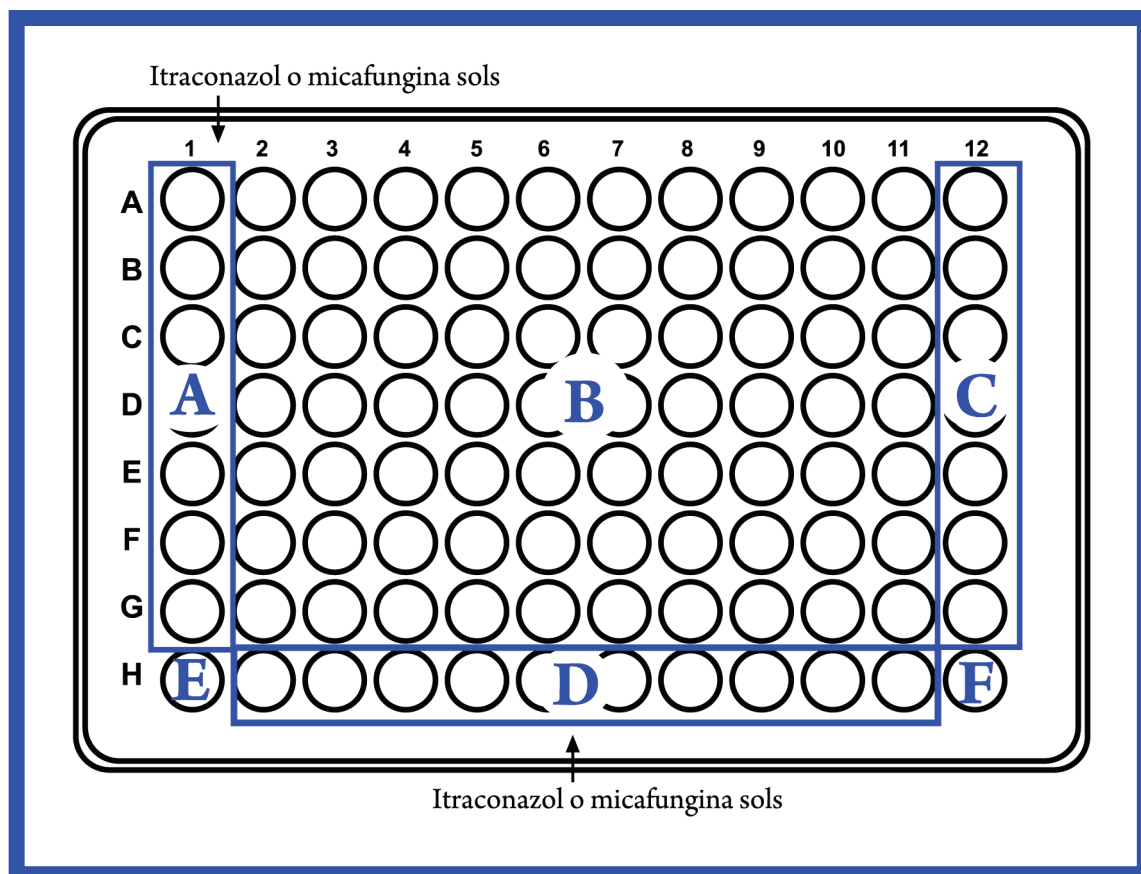


Figura 7. Esquema de la distribució de les diferents concentracions d'antifúngics en una placa de combinacions d'antifúngics. Es defineixen 6 zones: A) zona on es troba l'antifúngic que s'ha dispensat a les files sol, B) zona de combinacions dels dos antifúngics en forma de tauler d'escacs, C) zona amb RPMI sol, utilitzada com a control positiu (control de creixement del fong), D) zona on es troba l'antifúngic que s'ha dispensat a les columnes sol, E i F) control de d'esterilitat del medi

3.1.4.3. Definicions

- **CMI (concentració mínima inhibidora):**

Per a l'amfotericina B, i abans del 2006 per la micafungina, la CMI es va definir com la menor concentració d'antifúngic que provocava un 100% d'inhibició del creixement fúngic després de 24 hores d'incubació.

Per als azoles, la flucitosina i a partir del 2006 també per a les equinocandines, la CMI es va definir com la mínima concentració que provocava un 50% d'inhibició del creixement fúngic, comparat amb el control, després de 24 hores d'incubació.

- **CMF (concentració mínima fungicida):**

Per determinar la CMF es va sembrar en plaques de SDA el contingut dels pouets de les microplaques on s'observava una inhibició del creixement del 100%, i es va definir com la menor concentració capaç de reduir en un 99.9% o més la quantitat d'unitats formadores de colònia per ml.

- **FICI (índex de concentració inhibidora fraccionada):**

Per a l'estudi de les interaccions entre antifúngics es va utilitzar el FICI, que ens permet classificar les interaccions com a sinèrgiques, indiferents o antagonistes.

El FICI correspon a la suma dels FIC de cada antifúngic (a i b). El FIC es defineix com la CMI de cada antifúngic quan actua en combinació dividit per la CMI de l'antifúngic quan actua sol.

$$FICI = FICa + FICb = \frac{CMI \text{ d'a en combinació}}{CMI \text{ d'a sol}} + \frac{CMI \text{ de b en combinació}}{CMI \text{ de b sol}}$$

Es va definir la interacció com a sinèrgica si el FICI era ≤ 0.5 , indiferent si $0.5 < FICI \leq 4$, i antagonista si el FICI era > 4 .

3.1.4.4. Preparació dels inòculs per als estudis *in vitro*

Els inòculs es van preparar dispersant dues o tres colònies dels llevats en 10 ml de solució salina fisiològica estèril, a partir d'un cultiu en placa amb medi SDA a les 24 hores d'incubació. La suspensió fou ajustada amb una cambra de Neubauer fins a una concentració d'entre 1×10^6 - 5×10^6 llevats/ml. La concentració i la viabilitat de l'inòcul

van ser verificades sembrant 100 µl de les dilucions 1:1000 i 1:10000 del mateix en plaques de SDA.

A cada pouet de les plaques prèviament preparades, es dispensaren 100µl d'una dilució 1:1000 de l'inòcul en RPMI, excepte en aquells destinats al control d'esterilitat.

Seguint les recomanacions del CLSI, a cada assaig es van incloure les següents soques control:

- *C. parapsilosis* ATCC 22019
- *C. krusei* ATCC 6258

3.2. Estudis *in vivo*

3.2.1. Soques

Per a les proves d'efectivitat *in vivo* dels antifúngics, es van seleccionar diferents soques corresponents a diferents espècies *Candida*, i una soca de *Cladophialophora bantiana* (Taula 3).

Taula 3. Relació de les soques utilitzades als estudis <i>in vivo</i>		
<i>Candida glabrata</i>		
HSJ 229444	FMR 8489	Clínica. Orina. Reus, Catalunya.
HSJ 189465	FMR 8497	Clínica. Exudat. Reus, Catalunya.
HSJ 325960	FMR 8766	Clínica. Hemocultiu. Reus, Catalunya.
HSJ 302006	FMR 8487	Clínica. Orina. Reus, Catalunya.
<i>Candida krusei</i>		
HSJ 357568	FMR 9728	Clínica. Líquid intraperitoneal. Reus, Catalunya.
UPV 03-271	FMR 9729	Clínica. Hemocultiu. Barakaldo, Euskadi.
<i>Candida dubliniensis</i>		
UPV 96-172	FMR 10032	Clínica. Oral. Dublin, Irlanda.
UPV 95-395	FMR 10034	Clínica. Oral. Bilbao, Euskadi.
<i>Candida tropicalis</i>		
HSJ 423859	FMR 9727	Clínica. Orina. Reus, Catalunya.
<i>Cladophialophora bantiana</i>		
CBS 110009	FMR 8697	Clínica. Abscés cerebral, Estats Units d'Amèrica.

UPV, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco. Euskadi.

HSJ, Hospital Sant Joan de Reus, Reus, Catalunya

FMR, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Catalunya

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda

3.2.2. Animals d'experimentació

Per al desenvolupament dels models experimentals d'infecció disseminada es varen utilitzar ratolins mascles OF-1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona), de 5 setmanes d'edat i d'aproximadament 30 grams de pes. Es varen utilitzar els mateix tipus d'animals tant per a les infeccions per *Candida* spp. com per *Cladophialophora bantiana*.

Tots els estudis realitzats van ser aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat Rovira i Virgili. Els animals es van estabular en condicions estàndard amb accés lliure al menjar i a la beguda.

Seguint el protocol de supervisió de la URV, els animals van ser observats, fixant-nos amb especial interès en els següents aspectes:

- Aspecte de l'animal (pel llis i brillant o piloerecció).
- Postura (normal o encorbat, dormitant).
- Torçament abdominal (típic en ratolins que presenten dolor).
- Secrecions (nasal, diarrea o cromodacriorrea).
- Convulsions.
- Locomoció (moviments sobtats i ràpids que impedeixen les postures habituals, no poden caminar en línia recta, etc...).
- Comportament no provocat (vocalitzacions, auto-mutilacions...).
- Comportament en resposta a estímuls (molt agressiu o comatós).

En el cas d'observar animals en estat comatós, amb incapacitat d'obtenir aigua o menjar o que s'autoinfligeixin greus mutilacions, aquests foren sacrificats per inhalació de CO₂. Tant els animals utilitzats per als estudis de càrrega fúngica com els supervivents al final de l'estudi foren sacrificats per aquest procediment.

3.2.3. Immunosupressió

Es van utilitzar dues pautes diferents d'immunosupressió:

- **Combinació de ciclofosfamida amb 5-fluorouracil.** La ciclofosfamida s'administrava en una dosi única de 200 mg/Kg intraperitonealment i el 5-fluorouracil en una dosi única de 150 mg/Kg per via intravenosa. Ambdós varen ser administrats el mateix dia de la infecció (dia 0).
- **5-fluorouracil (dia 5).** Per als estudis de supervivència realitzats amb *Candida krusei*, els animals van rebre la mateixa pauta d'immunosupressió descrita anteriorment, a més d'una dosi addicional de 5-fluorouracil de 75 mg/Kg, cinc dies després de la infecció.

En el cas dels estudis amb *Candida dubliniensis* i *Cladophialophora bantiana*, la virulència d'aquests fongs va permetre desenvolupar models d'infecció en ratolins immunocompetents.

3.2.4. Infecció

Preparació de l'inòcul

La metodologia per preparar l'inòcul va variar segons el tipus de fong:

- Per *Candida* spp., els inòculs es van preparar dispersant varies colònies dels llevats en 10 ml de solució salina fisiològica estèril, a partir d'un cultiu en placa amb medi SDA a les 24 hores d'incubació.
- En el cas del model d'infecció per *Cladophialophora bantiana*, els inòculs es van preparar rasant, amb l'ajuda d'una nansa, la superfície de la placa que contenia el fong esporulat. La massa extreta que contenia hifes i conidis del fong es transferia a un tub amb 10 ml de solució salina fisiològica estèril i la suspensió es filtrava a través d'una gasa estèril per tal d'eliminar les hifes.

En ambdós casos, la concentració de les suspensions de llevats o conidis es va ajustar mitjançant el recompte amb una cambra de Neubauer, fins assolir l'inòcul desitjat. Per verificar la concentració i la viabilitat dels inòculs es varen realitzar bancs de dilucions seriades dels mateixos, sembrant 100 µl de les dilucions adequades en medi SDA o PDA.

Via d'administració

Per tots els models d'infecció, l'inòcul es va administrar per via intravenosa. Cada animal va rebre 200 µl de l'inòcul, injectats a la vena lateral de la cua.

3.2.5. Antifúngics

Els antifúngics utilitzats com a tractaments als diferents models experimentals s'inclouen a la Taula 4.

Taula 4. Antifúngics assajats <i>in vivo</i> als diferents estudis		
Antifúngics	Procedència	Solvent
Flucitosina	Sigma-Aldrich Corp., Sant Louis, M.O.	Aigua destil·lada estèril
Amfotericina B	Fungizona [®] Squibb Industria farmacèutica, Madrid, Espanya.	Solució glucosada al 5%
Amfotericina B liposòmica	AmBisome [®] Gilead Sciences, Madrid, Espanya.	Solució glucosada al 5%
Amfotericina B poliagregats	Substància pura cedida per Bristol-Myers Squibb, Madrid, Espanya.	Solució glucosada al 5%
Amfotericina B microesferes	Substància pura cedida per Bristol-Myers Squibb, Madrid, Espanya.	Solució glucosada al 5%
Anidulafungina	Pfizer Inc., New York, EUA.	Etanol al 20%
Caspofungina	Cancidas [®] Merck & Co. Ltd., Hertfordshire, Regne Unit.	Solució salina fisiològica
Fluconazole	Pfizer, Madrid, Espanya.	Solució salina fisiològica
Micafungina	Astellas Pharma Inc., Tokio, Japó.	Solució salina fisiològica
Voriconazole	Vfend [®] Pfizer, Ltd., Sandwich, Regne Unit.	Solució salina fisiològica
Posaconazole	Noxafil, Schering-Plough Ltd., Hertfordshire, Regne Unit.	Solució salina fisiològica

3.2.6. Tractaments i vies d'administració

Els tractaments es van iniciar 24 hores després de la infecció (dia 1), i van ser administrats durant 3, 5, 10 o 30 dies depenent de l'estudi realitzat. A la taula 5 s'indiquen les vies d'administració per cadascun dels antifúngics utilitzats.

Taula 5. Relació de las vies d'administració d'antifúngics i volums administrats

Substància activa	Via d'administració	Freqüència d'administració	Volum/dia administrat
Flucitosina	Oral	3 cops al dia	0.3 ml
	Oral	Aigua de beguda	Aprox. 4ml/ratolí
Amfotericina B	Intraperitoneal	1 cop al dia	0.2 ml
Amfotericina B liposòmica	Intravenosa	1 cop al dia	0.1 ml
Amfotericina B poliagregats	Intravenosa	1 cop al dia	0.1 ml
Amfotericina B microesferes	Intravenosa	Variable	0.1 ml
Anidulafungina	Intravenosa	1 cop al dia	0.1 ml
Caspofungina	Intravenosa	1 cop al dia	0.1 ml
Fluconazole	Oral	2 cops al dia	0.2 ml
Micafungina	Subcutània	1 cop al dia	0.1 ml
	Intravenosa	1 cop al dia	0.1 ml
Voriconazole	Oral	1 cop al dia	0.12-0.18 ml
	Intravenosa	1 cop al dia	0.1 ml
Posaconazole	Oral	1 cop al dia	0.1 ml

- **Via intravenosa:** utilitzada per a l'administració del 5-fluorouracil en les pautes d' immunosupressió en el ratolí, per a l'amfotericina B (liposòmica, poliagregats i microesferes), el voriconazole i les equinocandines. Es van utilitzar agulles del calibre 30 G x ½. La injecció es va realitzar a través d'una de les venes laterals de la cua.
- **Via intraperitoneal:** emprada per l'administració de l'amfotericina B i de la ciclofosfamida. Es van utilitzar agulles del calibre 26 G x ½. La punció es va realitzar a la zona inferior i lateral de l'abdomen de l'animal immobilitzat en posició de Trendelenburg.

- **Via subcutània:** usada per a l'administració de la micafungina. Es van utilitzar agulles del calibre 30 G x ½, injectant perpendicularment a través d'un plec de la pell a la zona del clatell.
- **Via oral:** usada per l'administració del fluconazole, el voriconazole, el posaconazole i la flucitosina, mitjançant una cànula esofàgica. En un dels estudis la flucitosina es va afegir a l'aigua de beguda, calculant que cada ratolí beu aproximadament 4 ml d'aigua al dia.

3.2.7. Recuperació fúngica a partir d'òrgans de l'animal infectat

El mètode de sacrifici utilitzat sempre fou l'asfíxia per inhalació de CO₂.

Un cop sacrificats els animals, es van extreure els òrgans diana utilitzant material quirúrgic estèril. Es varen estudiar els ronyons i la melsa. Es varen utilitzar tubs estèrils de 10 ml de capacitat, dispensant 1 ml de solució salina per tub i procedint després al tarat dels mateixos. Després d'introduir l'òrgan corresponent a cada tub, es pesava, i es procedia a homogeneïtzar els òrgans amb varetes de vidre estèrils. De cada homogeneïtzat es van realitzar dilucions seriades 1:10 que es sembraven en plaques de SDA que foren incubades de 37 ° C. Finalment es procedia al recompte d'unitats formadores de colònia (UFC) a les 24-48 hores d'incubació. La càrrega fúngica als òrgans s'expressava en UFC/g segons la fórmula següent:

$$UFC / g = \frac{UFC / ml \times (pes de l'òrgan + 1ml de solució salina) *}{Pes de l'òrgan}$$

* Considerant que 1 g de teixit ocupa un volum d'1 ml.

3.2.8. Anàlisi estadístic

Per a la realització dels diferents estudis estadístics es va utilitzar el paquet de programes estadístics SPSS (versions 11.0 a 15.0.1) y Graph Pad Prism (versió 4.0) per Windows.

Mètode de Kaplan Meier. Aquest mètode permet calcular el Temps Mitjà de Supervivència (TMS) per a un grup de ratolins. Té en compte els animals que queden vius al final de l'estudi així com el dia que han mort els animals durant el període d'observació. Un cop calculats els TMS per a cada grup, s'utilitza el test de log-rank per comparar els TMSs dels diferents grups entre si o respecte al grup control i establir quins grups són estadísticament diferents i quins s'han de considerar iguals.

Anàlisis de la Variança. Aquest és un mètode paramètric d'anàlisi que s'aplica als estudis en què es realitza la quantificació del fong en diversos òrgans. Permet comparar la mitjana de recuperació per cada òrgan entre els diferents grups de l'estudi. Com que és un mètode paramètric, les dades han de seguir una distribució normal, i per això se s'acostuma a treballar amb logaritmes en base 10 dels recomptes de colònies obtinguts. Aquest mètode no és vàlid quan els grups de dades són molt petits, en aquest cas és recomanable utilitzar una altra prova no paramètrica, com és el test U de Mann-Whitney.

Test U de Mann-Whitney. Aquesta prova no paramètrica permet comparar les dades obtingudes als recomptes de colònies per gram d'òrgan. No compara les mitjanes, sinó que ordena les dades dels dos grups que es comparen i en determina uns rangs. En aquest test, per tant no cal que les dades segueixin una distribució normal i podem treballar amb les dades originals o amb els logaritmes ja que ambdós tipus de dades ens proporcionaran els mateixos resultats.

Test t de Student. Aquesta prova avalua si les mitjanes de dos grups són estadísticament diferents entre si, i ha estat utilitzada per detectar diferències en la disminució de la càrrega fúngica en òrgans d'animals infectats amb diferents soques però que hagin rebut el mateix tractament. Aquest anàlisi és adequat quan la grandària de la mostra és massa petita per estar distribuïda de manera normal, i s'utilitza una estimació de la desviació típica en lloc del valor real, cosa que permet utilitzar les dades originals.

4. Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

4.1. Activitat de la 5-fluorocitosina, el fluconazole, l'amfotericina B i la micafungina en un model murí d'infecció disseminada per *Candida glabrata*.

Activities of flucytosine, fluconazole, amphotericin b, and micafungin in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*.

Mariné M, Serena C, Fernández-Torres B, Pastor FJ, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005, 49:4757–4759.

Activities of Flucytosine, Fluconazole, Amphotericin B, and Miconazole in a Murine Model of Disseminated Infection by *Candida glabrata*

Marçal Mariné, Carolina Serena, Belkys Fernández-Torres, F. Javier Pastor, and Josep Guarro*

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

Received 27 July 2005/Returned for modification 22 August 2005/Accepted 24 August 2005

We compared the efficacies of amphotericin B, fluconazole, flucytosine, and miconazole in a systemic murine infection by three isolates of *Candida glabrata*. Amphotericin B showed the best results, although none of the drugs dramatically reduced mortality or tissue burden in liver or spleen.

Candida glabrata is one of the most common *Candida* species other than *C. albicans* (3), and it causes a high mortality rate (12). Fluconazole (FLC) and amphotericin B (AMB) are the drugs recommended for treating *C. glabrata* infections (10). However, some strains have inherent resistance to FLC (2, 10, 11) and because the patients suffering from this infection are usually in a critical condition the use of AMB is limited. In some animal studies, it has been demonstrated that the efficacy of FLC is equivalent to that of AMB (4), but in others AMB was clearly shown to be more efficient than FLC at clearing fungal burden (1, 5). Therefore, we believe that if the in vivo activities of the available drugs are to be understood, numerous strains from different sources and with different in vitro antifungal susceptibilities should be tested. Up to now, only seven strains of *C. glabrata* have been tested with animal models (1, 4, 5), and in only one of these studies could the animals' survival rates be evaluated for only one drug (5). We have compared the efficacies of FLC, AMB, flucytosine (5FC), and

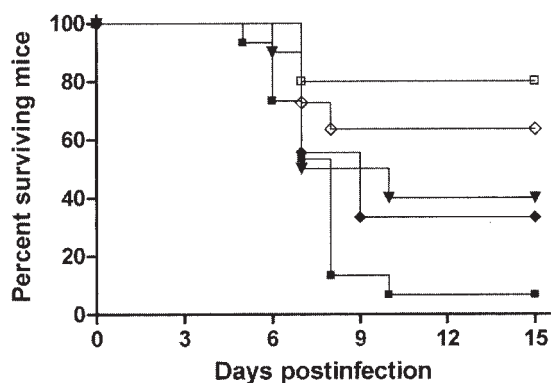


FIG. 1. Survival of mice after inoculation with *C. glabrata*. Mice were inoculated intravenously with either 2×10^7 (FMR 8489, □), 2×10^8 (FMR 8489, ■; FMR 8497, ▼; FMR 8766, ◇), or 6×10^8 (FMR 8766, ◆) CFU/animal.

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Spain. Phone: 34-977-759359. Fax: 34-977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.net.

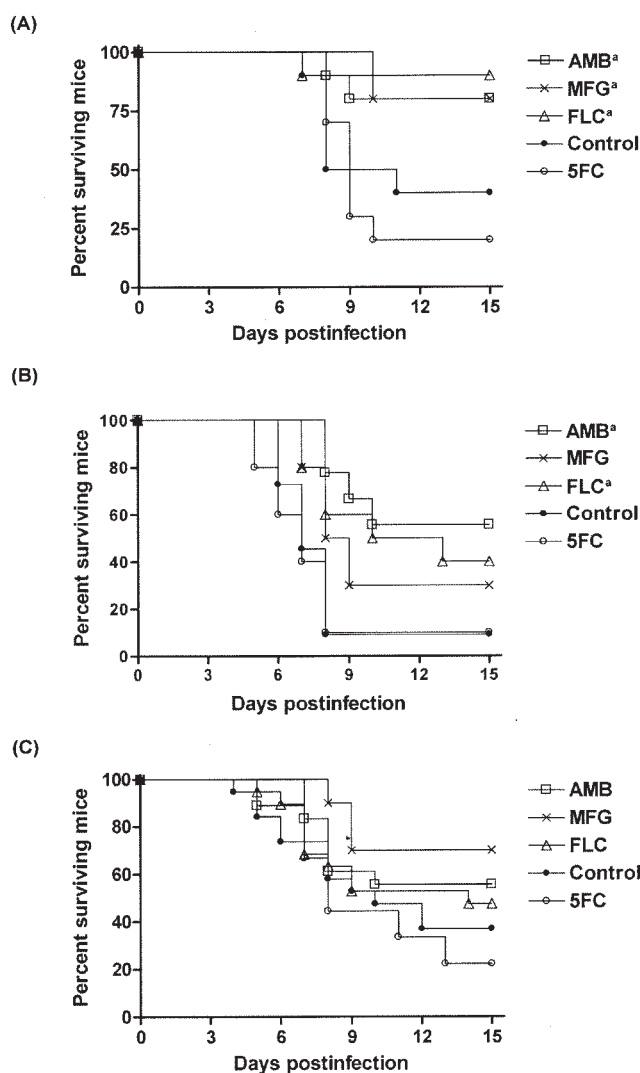


FIG. 2. Cumulative mortality of mice infected with *C. glabrata* FMR 8497 (A), FMR 8489 (B), and FMR 8766 (C). ^a, P value of <0.05 versus control.

TABLE 1. In vitro antifungal activities of AMB, FLC, MFG, and 5FC against three strains of *C. glabrata*

Strain	MIC-0 ^a (μg/ml)		MIC-2 ^a (μg/ml)	
	AMB	MFG	FLC	5FC
FMR 8497	1	0.25	8	<0.06
FMR 8489	1	0.25	8	<0.06
FMR 8766	0.5	0.25	4	0.06

^a MIC-0 corresponds to a 100% inhibition of growth, and MIC-2 corresponds to a 50% inhibition of growth.

micalfungin (MFG) in an immunocompromised murine model of disseminated infection by *C. glabrata*.

Three clinical isolates, FMR 8489, FMR 8497, and FMR 8766, from urine, exudates, and blood, respectively, were used in the study. They were subcultured on Sabouraud dextrose agar plates and incubated at 35°C for 24 h. In vitro susceptibilities of the three strains to AMB, FLC, 5FC, and MFG were tested using a microdilution reference method (7). For 5FC and FLC, the MIC was defined as the lowest drug concentration that reduced control growth by 50%. For AMB and MFG, the MIC endpoint was defined as 100% inhibition.

Male OF1 mice were immunosuppressed by a single intra-

peritoneal injection of 200 mg of cyclophosphamide/kg of body weight, plus a single intravenous injection of 150 mg of 5-fluorouracil/kg on the day of infection (9). The procedure standards approved by the Animal Welfare Committee of the Rovira i Virgili University were used.

For the survival studies, a group of 10 mice was established for each strain and each treatment. Mice were challenged with 2×10^8 CFU in 0.2 ml into the lateral tail vein, except for strain FMR 8766, which required an inoculum of 6×10^8 CFU to attain a lethality similar to that of the other strains. Preliminary experiments testing several strains (Fig. 1) demonstrated that these concentrations of fungal elements were the optimal doses for producing an acute infection, with 60 to 100% of animals dying within 10 days. The different groups were treated as follows: AMB at 1.5 mg/kg of body weight/dose given intraperitoneally daily (8), FLC at 40 mg/kg given orally (5) twice daily, MFG at 5 mg/kg given subcutaneously (6) twice daily, and 5FC at 80 mg/kg orally three times a day (1). All treatments began 24 h after challenge, and the therapy lasted for 5 days. Mice were checked daily for 15 days.

For tissue burden studies, five groups of 10 mice, one for each treatment and one for controls, were established for each of the two strains FMR 8489 and FMR 8497. For all treat-

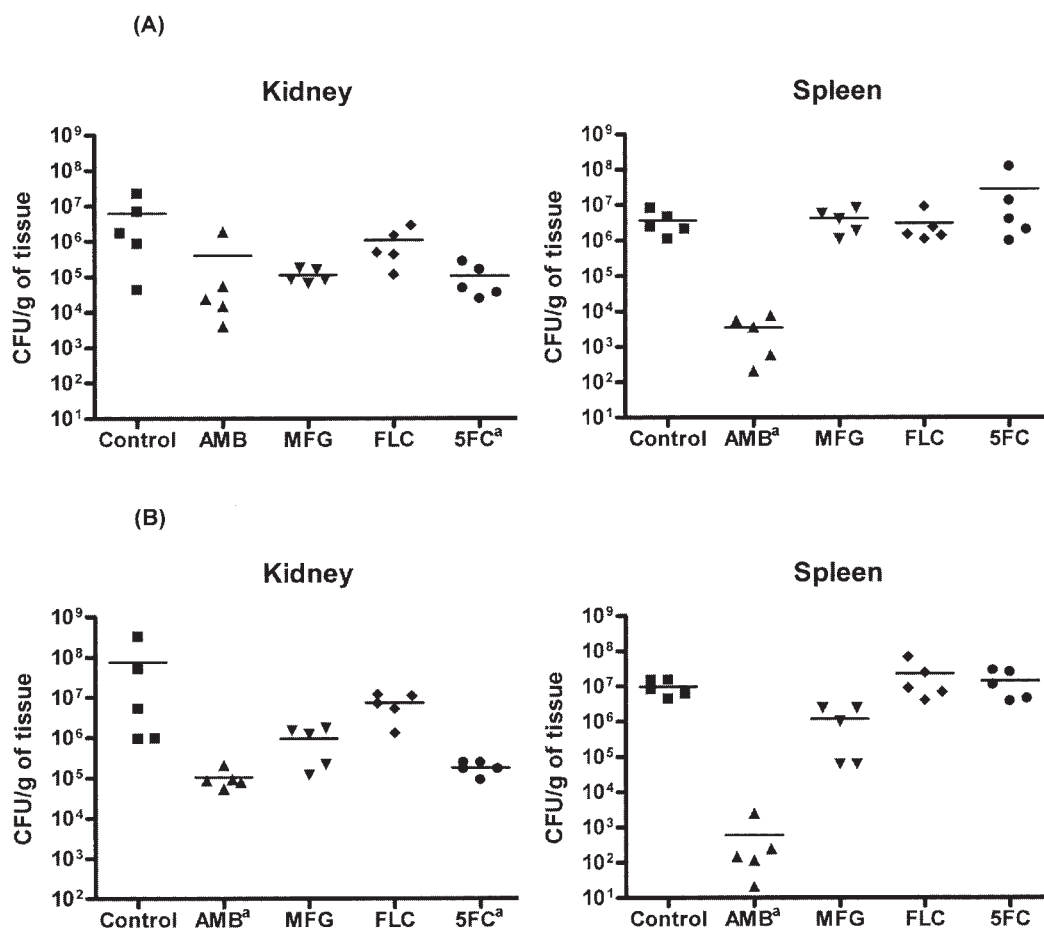


FIG. 3. Effects of the antifungal treatments on colony counts of the *C. glabrata* strains FMR 8497 (A) and FMR 8489 (B) in spleens and kidneys of mice. ^a, *P* value of <0.05 versus control. Horizontal lines indicate mean values.

ments, therapy began 24 h after challenge and lasted 5 days. One day after the treatment finished, five of the surviving mice were sacrificed. Spleens and kidneys were aseptically removed, and the entire organs were homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on Sabouraud dextrose agar, incubated at 35°C, and examined daily for 3 days. The numbers of CFU per gram of tissue were calculated.

Mean survival times were estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. CFU counts were analyzed by the Mann-Whitney U test. SPSS for Windows, version 11.0, was used.

MICs of AMB, FLC, 5FC, and MFG were similar for the three strains, and the differences among them were never higher than 1 dilution (Table 1).

While all treatments, with the exception of 5FC, prolonged survival of mice infected with strain FMR 8497, only AMB and FLC significantly prolonged survival of mice infected with strain FMR 8489. In the case of the FMR 8766 strain, FLC, AMB, and MFG tended to prolong survival but none of them did so significantly (Fig. 2).

AMB reduced the fungal loads in kidneys and spleens for strain 8489 and in kidneys for strain 8497. Tissue burdens were also reduced for both strains by 5FC, but only in kidneys. The MFG and FLC regimens did not significantly reduce the counts for any organ or strain (Fig. 3).

The in vivo responses for all three strains tested were different even though the in vitro susceptibilities were similar for the four drugs. For one strain, practically all of the drugs tested significantly prolonged survival; for another strain, only two of the four drugs tended to prolong survival; and for the third, none of them prolonged it. However, AMB showed some advantages since it prolonged survival for two of three strains tested and was the only drug that was able to reduce fungal load in spleen for the two strains tested. The results, however, were not very impressive.

Our results do not agree with those of Atkinson et al. (1), who suggested that FLC could be useful for treating urinary infections, because FLC was not able to reduce fungal loads in the kidneys of mice infected with any of the two strains.

Although each of the four drugs tested showed some degree of effectiveness at prolonging survival and/or reducing fungal organ counts, none of them was able to sterilize organs or to reduce mortality dramatically. Because *C. glabrata* is a com-

mon cause of adult candidemia and has high mortality rates, finding effective treatments is an urgent need.

This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 020114).

REFERENCES

1. Atkinson, B. A., C. Bouthet, R. Bocanegra, A. Correa, M. F. Luther, and J. R. Graybill. 1995. Comparison of fluconazole, amphotericin B and flucytosine in treatment of a murine model of disseminated infection with *Candida glabrata* in immunocompromised mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:631–640.
2. Cuenca-Estrella, M., D. Rodríguez, B. Almirante, J. Morgan, A. M. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, M. Salvado, D. W. Warnock, A. Pahissa, and J. L. Rodríguez-Tudela on behalf of the Barcelona Candidemia Project Study Group. 2005. In vitro susceptibilities of blood-stream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002–2003. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:194–199.
3. Diekema, D. J., S. A. Messer, A. B. Brueggemann, S. L. Coffman, G. V. Doern, L. A. Herwaldt, and M. A. Pfaller. 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1298–1302.
4. Fisher, M. A., S.-H. Shen, J. Haddad, and W. F. Tarry. 1989. Comparison of in vivo activity of fluconazole with that of amphotericin B against *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1443–1446.
5. Ju, J. Y., C. Polhamus, K. A. Marr, S. M. Holland, and J. E. Bennett. 2002. Efficacies of fluconazole, caspofungin, and amphotericin B in *Candida glabrata*-infected p47^{phox}−/− knockout mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1240–1245.
6. Luque, J. C., K. V. Clemons, and D. A. Stevens. 2003. Efficacy of micafungin alone or in combination against systemic murine aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1452–1455.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
8. Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol, and J. Guarro. 2002. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2273–2275.
9. Ortoneda, M., J. Capilla, I. Pujol, F. J. Pastor, E. Mayayo, J. Fernandez-Ballart, and J. Guarro. 2002. Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:525–529.
10. Pappas, P. G., J. H. Rex., J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, T. J. Walsh, and J. E. Edwards. 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **38**:161–189.
11. Pfaller, M. A., and D. J. Diekema for the International Fungal Surveillance Participant Group. 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of blood-stream isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**(Suppl. 1):11–23.
12. Viscoli, C., C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, V. Krcmery, B. De Pauw, and F. Meunier. 1999. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin. Infect. Dis.* **28**:1071–1079.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

4.2. Teràpia antifúngica combinada en un model murí d'infecció per *Candida glabrata*.

Combined antifungal therapy in a murine infection by *Candida glabrata*.

Mariné M, Serena C, Pastor FJ, and Guarro J.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006, 58:1295–1298.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2006) **58**, 1295–1298
doi:10.1093/jac/dkl395
Advance Access publication 29 September 2006

JAC

Combined antifungal therapy in a murine infection by *Candida glabrata*

Marçal Mariné, Carolina Serena, F. Javier Pastor* and Josep Guarro

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

Received 28 June 2006; returned 12 August 2006; revised 24 August 2006; accepted 9 September 2006

Objectives: To develop proper treatments for patients who do not respond to current antifungal treatments, we tested new combinations of antifungal drugs for treating disseminated infections by *Candida glabrata* in a murine model.

Methods: Mice were rendered neutropenic by intraperitoneal cyclophosphamide and intravenous 5-fluorouracil administration. The animals were infected intravenously with 2×10^8 cfu of *C. glabrata*. The efficacies of micafungin combined with amphotericin B, fluconazole or flucytosine, and of amphotericin B combined with fluconazole were evaluated by survival and tissue burden reduction.

Results and Conclusions: Micafungin plus amphotericin B was the most effective combination at reducing tissue burden. Micafungin at 10 mg/kg combined with amphotericin B at 0.75, 1.5 or 3 mg/kg prolonged survival with respect to the monotherapies, but only the second combination showed a synergistic effect in reducing fungal load in spleen and kidney. Amphotericin B at 1.5 mg/kg combined with micafungin at 5, 10 or 20 mg/kg reduced tissue burden with respect to the monotherapies, but the effects of the three combinations were very similar. These results suggest that amphotericin B in combination with micafungin is promising for the treatment of disseminated *C. glabrata* infections.

Keywords: candidiasis, animal models, micafungin, fluconazole, flucytosine

Introduction

Candida glabrata is an opportunist pathogen that mainly affects severely immunocompromised patients, causing disseminated and frequently fatal infections.¹ Amphotericin B is recommended for the treatment of non-*Candida albicans* systemic infections² but its toxicity limits its use at high doses in patients in a critical condition.³ Many isolates of *C. glabrata* have shown an innate resistance to fluconazole, and treatment often fails.⁴ In a recent study using a murine model of disseminated infection by *C. glabrata* we demonstrated that although amphotericin B showed the best results, few differences exist in the activity of amphotericin B, fluconazole, flucytosine and micafungin and that none of them completely resolved the infection.⁵ Combined therapy could be a therapeutic alternative, but it has been poorly explored. There has been some experience in combining amphotericin B with other drugs that can allow the reduction of the doses of this antifungal and/or shorten the duration of therapy.⁶ In a recent murine study, the combination of this drug with caspofungin showed synergistic *in vivo* activity, although the doses of amphotericin B tested were considerably high.⁷

Here, we have tested combinations of the four drugs mentioned above in a murine model of disseminated infection by *C. glabrata* in order to evaluate whether combined therapy can improve the results obtained with the monotherapies.

Materials and methods

Fungus

C. glabrata strain FMR 8489 was used in the study. The inoculum size was adjusted to the desired concentration by haemocytometer counts, and viability was confirmed by serial plating on Sabouraud dextrose agar.

In vitro susceptibility testing

The *in vitro* antifungal susceptibility of the fungus to the four drugs was tested using a reference microdilution method.⁸

Animals

Male OF1 mice (30 g) were used in accordance with the procedure standards approved by the Animal Welfare Committee of the Rovira i Virgili University.

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

Mariné *et al.*

Drugs

The drugs tested were flucytosine (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA), amphotericin B (Fungizona), fluconazole (Pfizer Inc. Madrid, Spain) and micafungin (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan). Amphotericin B was administered at doses of 0.75, 1.5 or 3 mg/kg of body weight/dose once daily, intraperitoneally; flucytosine was administered at 80 mg/kg three times a day (240 mg/kg/day), orally; fluconazole was administered at 40 mg/kg twice a day (80 mg/kg/day), orally; and micafungin was administered at 2.5, 5 or 10 mg/kg twice a day (5, 10 or 20 mg/kg/day), subcutaneously.

Immunosuppression

Mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal injection of 200 mg/kg of cyclophosphamide plus a single intravenous injection of 150 mg/kg of 5-fluorouracil, on the day of infection.

Infection

Mice were challenged with 2×10^8 cfu in 0.2 mL into the lateral tail vein.⁵

Experimental design

Three sequential experiments were performed. In the first we evaluated the efficacy of micafungin combined with amphotericin B, fluconazole or flucytosine, and amphotericin B combined with fluconazole, in reducing tissue burden in kidney and spleen. Results were compared with those obtained with these drugs administered alone. In the second and third experiments we evaluated the efficacy of micafungin plus amphotericin B, which was the combination that yielded the best results in the first experiment, first varying the doses of amphotericin B and then those of micafungin. Results were compared with those from the monotherapies in prolonging the survival and reducing tissue burden in kidney and spleen.

Experiment 1

Twenty-four hours after challenge, groups of 10 mice were randomly assigned to one of the following treatment groups: micafungin 10 mg/kg/day, amphotericin B 1.5 mg/kg/day, fluconazole 80 mg/kg/day, flucytosine at 240 mg/kg/day, micafungin 10 mg/kg/day plus amphotericin B 1.5 mg/kg/day, micafungin 10 mg/kg/day plus fluconazole 80 mg/kg/day, micafungin 10 mg/kg/day plus flucytosine 240 mg/kg/day and amphotericin B 1.5 mg/kg/day plus fluconazole 80 mg/kg/day. Control animals received no treatment. The therapy lasted for 5 days. Monotherapies were performed not only for comparison with combined treatments, but also to confirm the results of a previous study.⁵ Five of the surviving mice randomly chosen were killed 1 day after the completion of treatment. Spleen and kidneys were aseptically removed, and the entire organs were homogenized in 1 mL of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on Sabouraud dextrose agar, incubated at 35°C and examined daily for 3 days.

Experiment 2

Twenty-four hours after challenge, groups of 20 mice were randomly assigned to one of the following treatment groups: amphotericin B 0.75 and 3 mg/kg/day, and micafungin 10 mg/kg/day plus amphotericin B 0.75, 1.5 or 3 mg/kg/day. Therapy lasted for 5 days. A control group received no treatment. The efficacy of these treatments was evaluated by survival and tissue burden studies and was

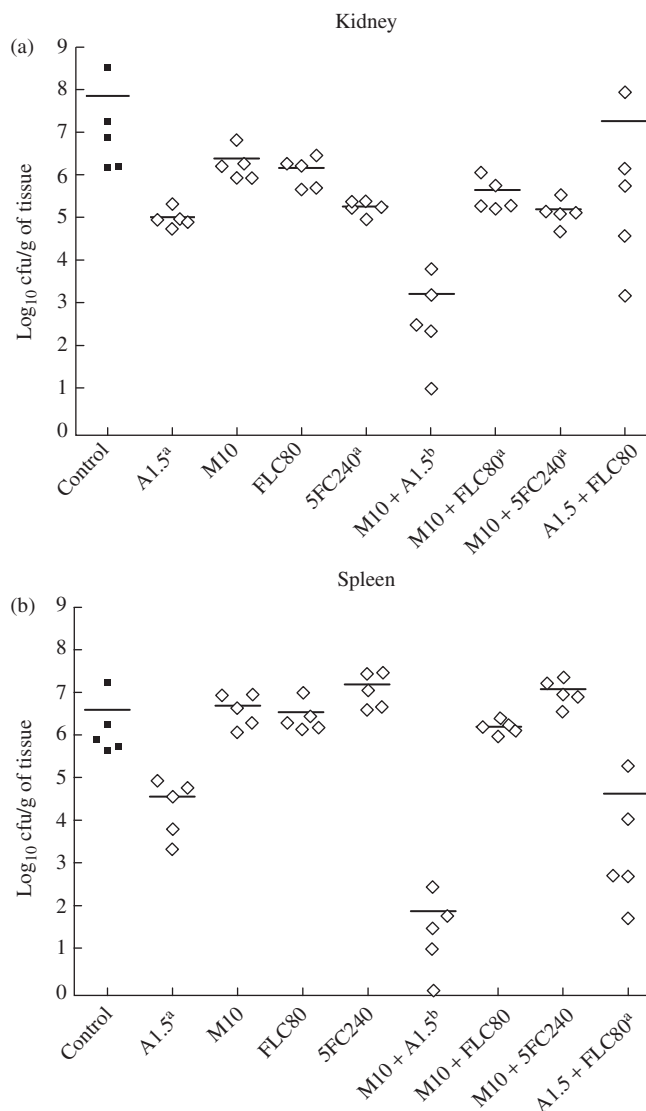


Figure 1. Effects of the antifungal treatments on cfu counts of *C. glabrata* FMR 8489 in kidneys (a) and spleen (b) of mice. A1.5, amphotericin at 1.5 mg/kg/day. M10, micafungin at 10 mg/kg/day. FLC80, fluconazole at 80 mg/kg/day. 5FC240, flucytosine at 240 mg/kg/day. ^aP value of <0.05 versus control. ^bP value of <0.01 versus control and <0.05 versus monotherapies. Horizontal lines indicate mean values.

compared with those obtained in the first experiment. For survival studies, mice were checked daily for 15 days after challenge. Tissue burden was performed as described above.

Experiment 3

Twenty-four hours after challenge, groups of 20 mice were randomly assigned to one of the following treatment groups: micafungin 20 mg/kg/day, and amphotericin B 1.5 mg/kg/day plus micafungin 5 or 20 mg/kg/day. Therapy lasted for 5 days. A control group received no treatment. The efficacy of these treatments was evaluated by survival and tissue burden studies and was compared with those obtained in the first experiment. Survival and tissue burden studies were performed as described above.

Combined therapy for *Candida glabrata*

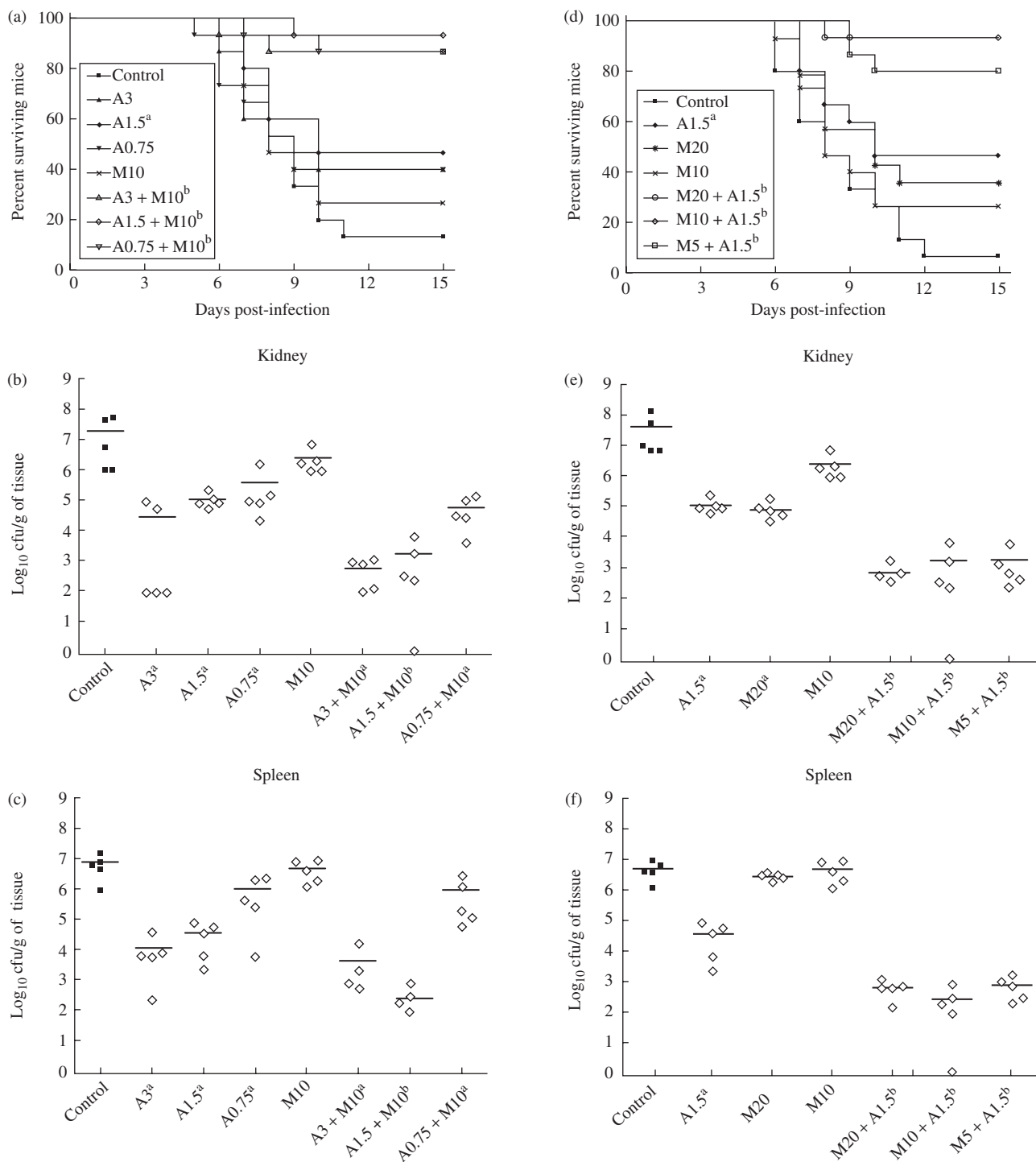


Figure 2. (a–c) Experiment 2. (d–f) Experiment 3. Cumulative mortality of mice infected with *C. glabrata* FMR 8489 (a and d). Effects of the antifungal treatments on colony counts of *C. glabrata* FMR 8489 in kidneys (b and e) and spleen (c and f) of mice. A0.75, A1.5 and A3: amphotericin B at 0.75, 1.5 and 3 mg/kg/day. M5, M10 and M20: micafungin at 5, 10 and 20 mg/kg/day. ^aP value of <0.05 versus control. ^bP value of <0.01 versus control and <0.05 versus monotherapies. Horizontal lines of scatter plots indicate mean values.

Statistics

Mean survival time was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups using the log-rank test. cfu counts were analysed using the Mann–Whitney *U*-test. Graph Pad 4.00 and SPSS 11.5 for Windows were used.

Results

The MICs of the drugs tested were as follows: amphotericin B, 2 mg/L; micafungin, 0.25 mg/L; fluconazole, 8 mg/L; and flucytosine, <0.06 mg/L.

Mariné *et al.*

Experiment 1

Results are shown in Figure 1. Amphotericin B significantly reduced the fungal load in both organs versus the control group, while flucytosine only did so in kidney. Micafungin and fluconazole were ineffective in this model. All the combinations tested were able to reduce the fungal load with respect to the control in at least one organ. The combination of micafungin plus amphotericin B showed the best results and was the only one that showed a synergistic effect, significantly reducing the cfu counts with respect to the monotherapies in both organs.

Experiment 2

Results are shown in Figure 2(a–c). All the combinations of micafungin with amphotericin B significantly prolonged the survival, with a rate over 75% in all the cases. The results of all the combinations were significantly better than those of the corresponding monotherapies ($P < 0.05$), but with no differences among them. Although the two new combinations reduced fungal load with respect to the control in both organs, they did not show a synergistic effect, their results being worse than those obtained with micafungin at 10 mg/kg/day plus amphotericin B at 1.5 mg/kg/day in the first experiment.

Experiment 3

Since the best results of the two previous experiments were those obtained with the combination of micafungin at 10 mg/kg/day plus amphotericin B at 1.5 mg/kg/day, we tested amphotericin B at 1.5 mg/kg/day with micafungin at 5 or 20 mg/kg/day in order to evaluate if varying the doses of the last drug would improve the previous results. Due to the inefficacy of micafungin at 10 mg/kg/day given alone, monotherapy with micafungin at 5 mg/kg/day was not tested. Figure 2(d–f) shows that no differences were found among the combinations assayed, results in all cases being significantly better than those obtained with the monotherapies ($P < 0.05$).

Discussion

Combined therapy in experimental *C. glabrata* infections, especially using the two standard drugs amphotericin B and fluconazole, has already been studied by other authors.⁹ In the present study, this combination was not able to improve the results obtained with amphotericin B alone. By contrast the combination amphotericin B plus micafungin showed excellent results. All the doses tested showed a synergistic effect in prolonging survival versus the monotherapies. Other investigators, using a similar murine model, had previously reported the efficacy of the combinations of amphotericin B with echinocandins, although evaluating only kidney tissue burden.^{7,10} Barchiesi *et al.*⁷ recently reported a dose-dependent effect of amphotericin B when combined with caspofungin, the highest dose of both drugs being 3 mg/kg/day. However, in our case, in the combination amphotericin B plus micafungin, amphotericin B at 1.5 mg/kg worked better than amphotericin B at 3 mg/kg in reducing fungal load in spleen. Our results are similar to those of

Olson *et al.*,¹⁰ who also obtained a significant reduction of tissue burden using a high dose of liposomal amphotericin B combined with micafungin at 2.5 mg/kg/day, although they used a considerably lower fungal inoculum than we did. Lipid formulations of amphotericin B are less toxic than amphotericin B deoxycholate, but its availability is limited due to the cost. We obtained similar results using amphotericin B at small toxic doses. Here, we chose a strain of *C. glabrata* that practically did not respond to micafungin in our previous study⁵ to evaluate the potential efficacy of this drug in combination. The present study confirmed those results.

In conclusion, our data demonstrate a favourable *in vivo* interaction between amphotericin B and echinocandins against *C. glabrata* murine infections confirming the results of other authors.^{7,10} This association constitutes a promising therapeutic approach; but further work is needed to ascertain its clinical relevance.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 2005; **366**: 1013–25.
2. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 244–51.
3. Kleinberg M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27** Suppl 1: 12–6.
4. Fidel PL, Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12**: 80–96.
5. Mariné M, Serena C, Fernández-Torres B *et al.* Activities of flucytosine, fluconazole, amphotericin B, and micafungin in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4757–9.
6. Lewis RE, Kontoyiannis DP. Rationale for combination antifungal therapy. *Pharmacotherapy* 2001; **21**: 149–64S.
7. Barchiesi F, Spreghini E, Fothergill AW *et al.* Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2546–9.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility of Yeasts—Second Edition: Approved Standard M27-A2*. NCCLS: Wayne, PA, USA, 1990.
9. Atkinson BA, Bouthet C, Bocanegra R *et al.* Comparison of fluconazole, amphotericin B and flucytosine in treatment of a murine model of disseminated infection with *Candida glabrata* in immunocompromised mice. *J Antimicrob Chemother* 1995; **35**: 631–40.
10. Olson JA, Adler-Moore JP, Smith PJ *et al.* Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4895–902.

4.3. Eficàcia dels triazoles en una infecció disseminada per *Candida krusei* en ratolins.

Efficacy of triazoles in a murine disseminated infection by *Candida krusei*.

Mariné M, Pastor FJ, Serena C, and Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53: 3585–3588.

Efficacy of Triazoles in a Murine Disseminated Infection by *Candida krusei*⁷

Marçal Mariné, F. Javier Pastor, Carolina Serena, and Josep Guarro*

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

Received 4 March 2009/Returned for modification 15 April 2009/Accepted 14 May 2009

We evaluated the efficacies of posaconazole and voriconazole in comparison with that of amphotericin B in a systemic murine infection by *Candida krusei*. Posaconazole at 50 mg/kg/day and voriconazole at 40 and 60 mg/kg/day prolonged survival and reduced the fungal tissue burden in the kidneys of mice similarly to amphotericin B at 1.5 mg/kg/day and liposomal amphotericin B at 10 mg/kg/day. None of the treatments tested completely resolved the infection.

Candidiasis has become one of the most frequent causes of nosocomial infections. Fluconazole (FLC) is the recommended drug, but several non-*albicans* *Candida* species such as *Candida krusei* have an intrinsic resistance to FLC. This species is the fifth most common *Candida* species to cause candidemia. An ideal therapy does not yet exist for *C. krusei* infections, and a high mortality rate is reported (15). Currently recommended antifungals for the treatment of disseminated *C. krusei* infections are amphotericin B (AMB) and echinocandins, with voriconazole (VRC) being regarded as an alternative (11, 24). Posaconazole (PSC) is a promising drug, though not yet explored enough in vivo, that shows in vitro MICs against *C. krusei* similar to or lower than those of VRC (12). In this study, we have tested the triazoles VRC and PSC, comparing their efficacies with those of two different formulations of AMB, in an immunocompromised murine model of disseminated infection by *C. krusei*.

Two clinical strains of *C. krusei*, FMR 9728 and FMR 9729, were used. The inocula containing $\geq 99\%$ of the viable cells for both the in vitro and in vivo studies were adjusted to the desired concentration by counting them with a hemocytometer. The in vitro susceptibilities of both strains were determined using a reference method (7). The minimal fungicidal concentration (MFC) was defined as a 99.9% or greater reduction in the number of CFU/ml (2) (Table 1).

Male OF1 mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg of cyclophosphamide/kg of body weight, plus a single intravenous (i.v.) injection of 150 mg of 5-fluorouracil/kg on the same day of infection. For the survival studies, the mice received an additional dose of 5-fluorouracil (75 mg/kg) on day 5 after infection, which in previous tests yielded a mortality rate of 100% within 10 days after infection (data not shown). For the survival studies, the mice were challenged with 5×10^7 CFU in 0.2 ml of sterile saline into the lateral tail vein. For the tissue burden studies, the mice were inoculated with 5×10^6 CFU in 0.2 ml of sterile saline, and all the animals survived during the observation period. The procedure stan-

dards were approved by the Animal Welfare Committee of the Rovira i Virgili University.

Groups of 10 mice were randomly established for the survival and tissue burden studies. The different groups were treated once daily as follows: AMB deoxycholate (D-AMB) at 1.5 mg/kg of body weight/dose given i.p. (6); liposomal AMB (L-AMB) at 10 mg/kg given i.v. (9); VRC at 10 or 20 mg/kg i.v. (20) and at 40 or 60 mg/kg given orally (p.o.) (22); and PSC at 50 or 100 mg/kg p.o. (19). From 3 days prior to infection, the mice that received VRC were given diluted (50%) grapefruit juice instead of water. The selected doses of VRC have previously been shown to deliver adequate plasma levels in mice when coadministered with grapefruit juice (5, 18, 25). All treatments began 24 h after challenge, and the therapy lasted for 5 days. For the survival studies, the mice were checked daily for 15 days. For the tissue burden studies, the mice were killed 1 day after the completion of the treatment. The spleens and kidneys were aseptically removed, and the entire organs were homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated and incubated at 35°C for 72 h. The mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups using the log rank test. Colony counts for the tissue burden studies were analyzed using the Mann-Whitney U test. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

For both strains tested, all the treatments significantly prolonged survival relative to the control group ($P < 0.05$) (Fig. 1). No statistically significant differences were observed between the treatments.

For strain 9728, all the drugs except i.v. administered

TABLE 1. In vitro antifungal activity of AMB, VRC, and PSC against the two strains of *C. krusei*^a

Strain	AMB MIC-0 ($\mu\text{g/ml}$)	VRC		PSC	
		MIC-2 ($\mu\text{g/ml}$)	MFC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC-2 ($\mu\text{g/ml}$)	MFC ($\mu\text{g/ml}$)
9728	1	0.125	16	0.125	1
9729	1	0.25	>16	0.25	2

^a MIC-0 corresponds to a 100% inhibition of growth and MIC-2 to a 50% inhibition of growth. MFC corresponds to a 99.9% or greater reduction in the CFU/ml count.

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Phone: 34-977-759359. Fax: 34-977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

⁷ Published ahead of print on 26 May 2009.

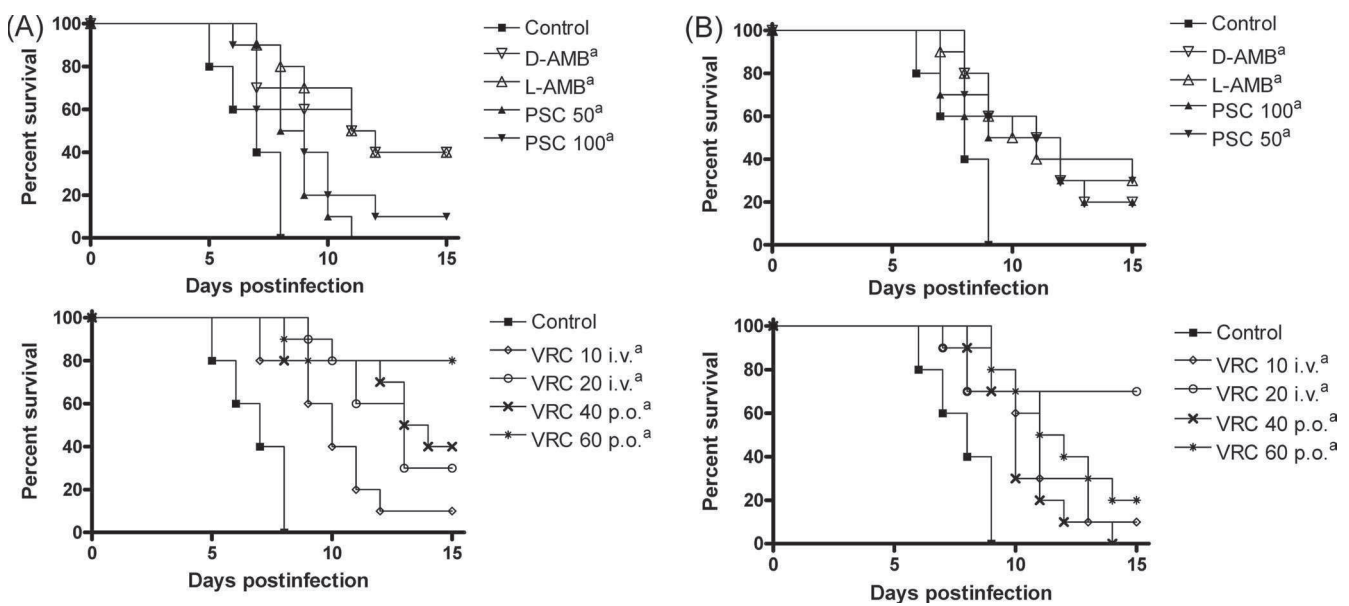


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with *C. krusei* FMR 9728 (A) and FMR 9729 (B). D-AMB, D-AMB at 1.5 mg/kg/day i.p.; L-AMB, L-AMB at 10 mg/kg/day i.v.; VRC 10 i.v. and VRC 20 i.v., VRC at 10 and 20 mg/kg/day i.v., respectively; VRC 40 p.o. and VRC 60 p.o., VRC at 40 and 60 mg/kg/day p.o., respectively. ^a, $P < 0.05$ versus control.

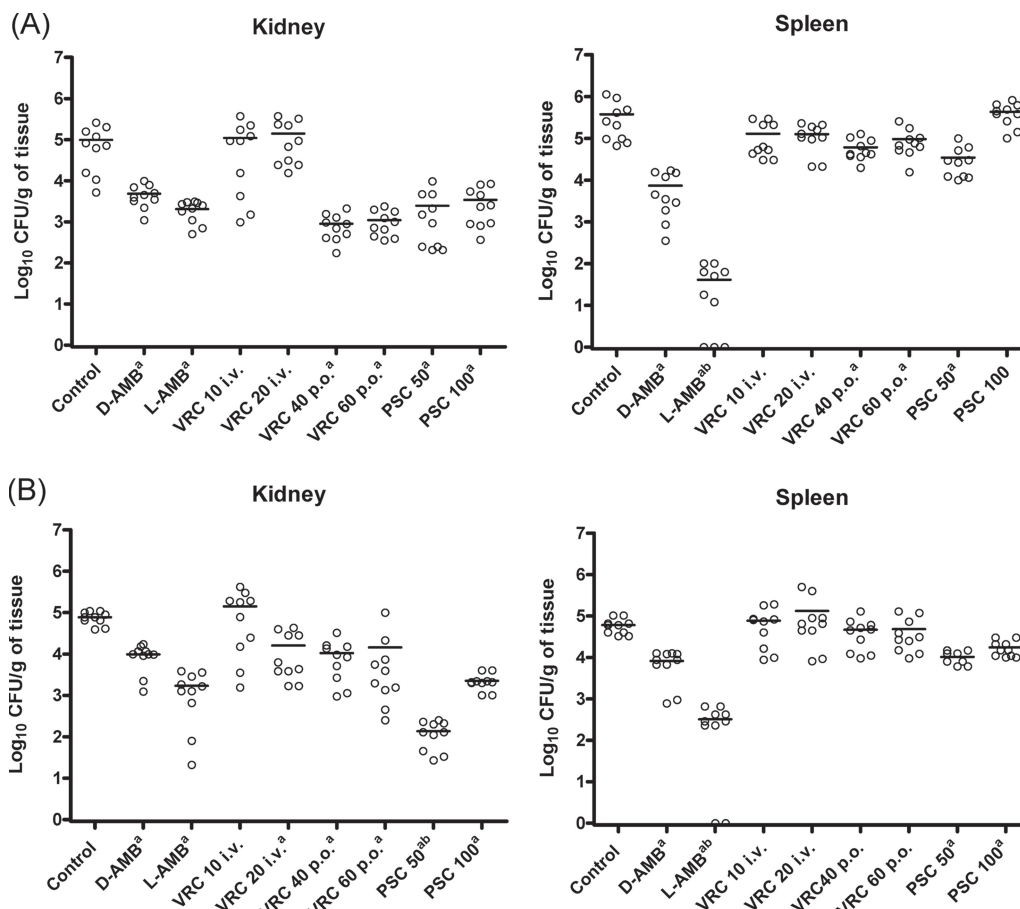


FIG. 2. Effects of the antifungal treatments on the tissue burden of *C. krusei* FMR 9728 (A) and FMR 9729 (B) in the kidneys and spleens of mice. D-AMB, D-AMB at 1.5 mg/kg/day i.p.; L-AMB, L-AMB at 10 mg/kg/day i.v.; VRC 10 i.v. and VRC 20 i.v., VRC at 10 and 20 mg/kg/day i.v., respectively; VRC 40 p.o. and VRC 60 p.o., VRC at 40 and 60 mg/kg/day p.o., respectively; PSC 50 and PSC 100, PSC at 50 and 100 mg/kg/day p.o., respectively. ^a, $P < 0.05$ versus control. ^b, $P < 0.05$ versus the rest of the therapies. Horizontal lines of scatter plots indicate mean values.

VRC were effective in reducing the fungal burden in the kidneys relative to that of the control group (Fig. 2). In the spleens, the two formulations of AMB, the lower dose of PSC, and both of the p.o. administered doses of VRC were able to reduce the CFU counts relative to that of the control group. For strain 9729, D-AMB, L-AMB, and PSC were effective in reducing the fungal burdens in both organs, while VRC even at high doses was only able to reduce the fungal load in the kidneys. In addition, PSC at 50 mg/kg was able to significantly reduce the fungal burden in the kidneys relative to the other therapies. L-AMB was clearly more effective than the other therapies in reducing the tissue burden in the spleens for both strains.

Despite the relatively high MICs that AMB showed against both strains tested, this drug was effective in vivo. Overall, in our murine model, L-AMB performed slightly better than VRC and PSC, while D-AMB did not outperform the azole treatments.

Although *C. krusei* shows an intrinsic resistance to FLC, no cross-resistance to other azoles has been observed (13, 14). VRC remains active against most strains of *C. krusei* (12, 17), its efficacy being demonstrated in vitro and in clinical trials (3, 10). Several authors have reported a fungistatic effect of VRC (16, 26), while others have stated a fungicidal effect of this drug (1, 21) against *Candida*. Despite the high MFCs observed for both strains, in our study, VRC improved the survival of mice for the two strains tested and reduced the tissue burden greatly for strain 9728 and modestly for strain 9729.

In our murine model, PSC has demonstrated efficacy in the treatment of *C. krusei*-disseminated infection with similar or even improvement of the results obtained with currently recommended treatments such as D-AMB, L-AMB, and VRC. Surprisingly, the lower dose of PSC proved to be slightly more effective than 100 mg/kg in tissue burden clearance. A lack of a dose-effect relationship for this drug has been previously reported with different fungi in mice (4, 19). A decrease in the absorption of PSC at doses higher than 50 mg/kg in mice (8) could easily correlate with a lack of effect increase, although a decrease in drug efficacy is puzzling and merits further investigation. The low MFCs observed and the efficacy of PSC in the survival and fungal burden studies agree with the reported fungicidal activity of this compound against *C. krusei* (23). Despite the lower MFCs observed for PSC with respect to those for VRC, no statistical differences were observed in vivo between the two compounds with the exception of tissue burden reduction in the kidneys for strain 9729.

In conclusion, our results suggest that PSC could be a therapeutic alternative to AMB and VRC for the treatment of disseminated infections by *C. krusei*. Further experimental studies are warranted to confirm our results.

This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

REFERENCES

1. Espinel-Ingroff, A., E. Cantón, J. Pemán, and M. Gobernado. 2002. Fungicidal activity of voriconazole against *Candida krusei* by time-kill curves. Proceedings of the 8th Congress of the European Confederation of Medical Mycology, Budapest, Hungary.
2. Isham, N. C., and M. A. Ghannoum. 2007. Voriconazole and caspofungin cidal activity against non-*albicans* *Candida* spp. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **15**:250–253.
3. Kullberg, B. J., J. D. Sobel, M. Ruhnke, P. G. Pappas, C. Viscoli, J. H. Rex, J. D. Cleary, E. Rubinstein, L. W. Church, J. M. Brown, H. T. Schlamm, I. T. Oborska, F. Hilton, and M. R. Hodges. 2005. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* **366**:1435–1442.
4. Lozano-Chiu, M., S. Arikan, V. L. Paetznick, E. J. Anaissie, D. Loebenberg, and J. H. Rex. 1999. Treatment of murine fusariosis with SCH 56592. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:589–591.
5. Majithiya, J., A. Sharp, A. Parmar, D. W. Denning, and P. A. Warn. 2009. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**:161–166.
6. Mariné, M., C. Serena, B. Fernández-Torres, F. J. Pastor, and J. Guarro. 2005. Activities of flucytosine, fluconazole, amphotericin B, and micafungin in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4757–4759.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
8. Nomeir, A. A., P. Kumari, M. J. Hilbert, S. Gupta, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, R. Hare, G. H. Miller, C. C. Lin, and M. N. Cayen. 2000. Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:727–731.
9. Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol, and J. Guarro. 2002. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2273–2275.
10. Ostrosky-Zeichner, L., M. A. Oude Lashof, B. J. Kullberg, and J. H. Rex. 2003. Voriconazole salvage treatment of invasive candidiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:651–655.
11. Pastor, F. J., and J. Guarro. 2007. The role of voriconazole in the treatment of emerging mycoses. *Rev. Iberoam. Micol.* **24**:228–232.
12. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, J. F. Meis, I. M. Gould, W. Fu, A. L. Colombo, E. Rodriguez-Noriega, and the Global Antifungal Surveillance Study. 2007. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1735–1745.
13. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, E. Nagy, S. Dobiasova, M. Rinaldi, R. Barton, A. Veselov, and the Global Antifungal Surveillance Group. 2008. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* **46**:515–521.
14. Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, C. Rice, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema. 2004. Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida* spp. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3137–3141.
15. Pfaller, M. A., P. G. Pappas, and J. R. Wingard. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* **43**:S3–S14.
16. Pfaller, M. A., D. J. Sheehan, and J. H. Rex. 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.
17. Quindós, G., L. O. Sánchez-Vargas, M. Villar-Vidal, E. Eraso, M. Alkorta, and J. L. Hernández-Almaraz. 2008. Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**:266–271.
18. Rodríguez, M. M., E. Calvo, C. Serena, M. Mariné, F. J. Pastor, and J. Guarro. 2009. Effect of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2153–2155.
19. Rodríguez, M. M., F. J. Pastor, C. Serena, and J. Guarro. 2009. Posaconazole efficacy in a murine disseminated infection caused by *Paecilomyces lilacinus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**:361–364.
20. Roffey, S. J., S. Cole, P. Comby, D. Gibson, S. G. Jezequel, A. N. Nedderman, D. A. Smith, D. K. Walker, and N. Wood. 2003. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab. Dispos.* **31**:731–741.
21. Rubio, M. C., I. R. de Ocariz, J. Gil, R. Benito, and A. Rezusta. 2005. Potential fungicidal effect of voriconazole against *Candida* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**:264–267.
22. Serena, C., F. J. Pastor, M. Mariné, M. M. Rodríguez, and J. Guarro. 2007.

- Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:162–165.
23. **Sóczó, G., G. Kardos, P. M. McNicholas, E. Balogh, L. Gergely, I. Varga, B. Kelentey, and L. Majoros.** 2007. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time kill test against nine *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:1004–1009.
 24. **Spellberg, B. J., S. G. Filler, and J. E. Edwards, Jr.** 2006. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **42**:244–251.
 25. **Sugar, A. M., and X. P. Liu.** 2000. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med. Mycol.* **38**:209–212.
 26. **Theuretzbacher, U., F. Ihle, and H. Derendorf.** 2006. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin. Pharmacokinet.* **45**:649–663.

4.4. La presència de creixement paradoxal in vitro, no determina la resposta in vivo de la teràpia amb equinocandines envers *Candida dubliniensis*.

Paradoxical growth of *C. dubliniensis* does not preclude in vivo response to echinocandin therapy.

Mariné M, Pastor FJ, Sahand IH, Pontón J, Quindós G, and Guarro J.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. doi:10.1128/AAC.00980-09

Paradoxical Growth of *Candida dubliniensis* Does Not Preclude In Vivo Response to Echinocandin Therapy[∇]

Marçal Mariné,¹ F. Javier Pastor,¹ Ismail H. Sahand,² José Pontón,²
Guillermo Quindós,² and Josep Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain,¹ and
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología,
Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain²

Received 14 July 2009/Returned for modification 13 August 2009/Accepted 19 September 2009

***Candida dubliniensis* commonly shows paradoxical or trailing growth effects in vitro in the presence of echinocandins. We tested the in vitro activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against clinical isolates of *C. dubliniensis* and evaluated the efficacy of these drugs in two murine models of systemic infection. The three echinocandins were similarly effective in the treatment of experimental disseminated infections with *C. dubliniensis* strains showing or not showing abnormal growth in vitro.**

Fn1 *Candida dubliniensis* is a species closely related to *C. albicans*. It can cause invasive infections in immunocompromised patients (5, 11, 12). Data on the antifungal management of *C. dubliniensis* infections are scarce; however, in vitro fluconazole resistance and one possible case of relapse after caspofungin (CAS) treatment have been reported (14, 15). Several recent studies have reported a high prevalence among the strains of *C. dubliniensis* of abnormal growth in vitro characterized by paradoxical or trailing effects observed in the presence of echinocandins (6, 9). It is unknown if these effects are related to a low efficacy of these drugs in vivo. Here we have tested the activities of anidulafungin (AFG), CAS, and micafungin (MFG) against seven strains of *C. dubliniensis* (Table 1). We have tested these drugs and compared their efficacies between strains that showed or did not show paradoxical growth in vitro in a murine model of infection.

T1 Susceptibility in vitro was determined by using a reference method (4). The minimal fungicidal concentration (MFC) was defined as a 99.9% or greater reduction in the number of CFU/ml (8). A hemocytometer was used to adjust the desired fungal inocula for both in vitro and in vivo studies.

Male OF1 mice were used, and the procedure standards approved by the Animal Welfare Committee of the Universitat Rovira i Virgili were followed. Immunocompetent mice were challenged intravenously (i.v.) with 1.5×10^7 CFU of strain FMR 10032 or FMR 10034, and immunosuppressed mice were challenged with 1.5×10^5 CFU. Immunosuppressed mice received 200 mg/kg of cyclophosphamide intraperitoneally plus 150 mg/kg of 5-fluorouracil i.v. on the day of infection (10). Groups of 10 mice were randomly established for survival and tissue burden studies with both strains. The different groups of immunocompetent mice were treated with AFG, CAS, or MFG at 1 or 10 mg/kg of body weight/dose i.v. once daily. Immunosuppressed mice received AFG, CAS, or MFG at 1

mg/kg of body weight/dose also i.v. once daily. Control animals received no treatment. All treatments began 24 h after challenge. Due to the early deaths occurring in the immunocompetent mouse model of infection, therapies lasted 3 days. The later occurrence of deaths in the immunosuppressed mouse model of infection allowed the administration of therapies for 5 days. For survival studies, mice were checked daily for 15 days. For tissue burden studies, mice were killed 1 day after the completion of treatment. Spleens and kidneys were aseptically removed, and the entire organs were homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on Sabouraud dextrose agar, incubated at 35°C, and examined daily for 3 days. **AQ: A**

Mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. Colony counts in tissue burden studies were analyzed by using the Mann-Whitney U test, and a *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

A paradoxical growth effect was observed in four (57%) *C. dubliniensis* isolates for AFG, six (85%) for CAS, and one for MFG (14%) (Table 1). Based on these results, two strains were selected for in vivo studies: FMR 10032, which showed low MFCs and no abnormal growth with any of the drugs tested, and FMR 10034, which showed high MFCs and paradoxical growth with all of the drugs tested.

Figure 1 and Table 2 show the results of in vivo studies with immunocompetent mice. For strain FMR 10032, all of the treatments significantly prolonged survival, except AFG at 1 mg/kg. For strain FMR 10034, only MFG at 10 mg/kg significantly prolonged survival but no statistically significant differences were observed among the treatments. For both strains, all of the drugs and doses significantly reduced the fungal burdens in both organs, except for MFG and AFG at 1 mg/kg in the kidneys for strain FMR 10034, both also being less effective than the other treatments in these organs. AFG at 10 mg/kg was more effective than the other treatments in reducing the fungal load of strain FMR 10032 in the spleen. **F1, T2**

Figure 1 and Table 2 also show the in vivo results obtained with immunosuppressed mice. For both strains, all of the drugs significantly prolonged survival and were effective in reducing

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Phone: 34-977-759359. Fax: 34-977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

[∇] Published ahead of print on 28 September 2009.

TABLE 1. In vitro antifungal activities of AFG, CAS, and MFG against seven strains of *C. dubliniensis*

Strain	Body site (origin)	AFG			CAS			MFG						
		MIC ₅₀ ^a (µg/ml)		P range ^b (µg/ml)	MFC ^c	MIC ₅₀ (µg/ml)		P range (µg/ml)	MFC	MIC ₅₀ (µg/ml)		P range (µg/ml)	MFC	
		24 h	48 h			24 h	48 h			24 h	48 h			24 h
9453	Blood (Ireland)	<0.03	<0.03	4–16	>16	0.25	0.25	8–16	Trailing ^d	>16	0.125	0.125	>16	
9456	Oral (Spain)	<0.03	<0.03	8–16	>16	0.25	0.25	8–16	2–16	>16	0.06	0.125	>16	
10031	Oral (Spain)	<0.03	<0.03		>16	0.125	0.25	8–16	Trailing ^d	>16	0.125	0.125	>16	
10032	Oral (Ireland)	<0.03	<0.03			0.06	0.06			4	<0.03	0.125	4	
10033	Oral (Spain)	<0.03	0.06	4–16	2	0.25	0.25	8–16	2–16	>16	0.125	0.25	2	
10034	Oral (Spain)	<0.03	<0.03	4–16	>16	0.125	0.25	16	1–16	>16	0.06	0.125 ^c	2–16	>16
10035	Oral (Israel)	<0.03	<0.03			0.125	0.06	0.06	8–16	0.5	0.03	0.03	0.25	

^a MIC₅₀ corresponds to 50% inhibition of growth.

^b P range, range of antifungal concentrations where a paradoxical growth effect was observed.

^c MFC corresponds to ≥99.9% reduction in the CFU/ml count.

^d Fungal growth was observed over the entire range of drug concentrations, and the P range was not determined.

AQ:B the fungal burdens in the spleen and kidneys. CAS was significantly better than the other treatments at reducing the fungal burdens of both strains in both organs.

The low echinocandin MICs observed for all of the strains tested agree with previous in vitro data on activity against *C. dubliniensis* (9, 13). Paradoxical growth has been observed previously, mainly in the presence of CAS and MFG but rarely with AFG (6, 9). By contrast, we observed here a paradoxical growth effect in the presence of AFG and CAS but in only one strain for MFG.

AQ:C In immunocompetent mice, all of the echinocandins were effective in reducing the tissue burdens of both strains and in

improving the survival of animals challenged with strain FMR 10032. Only MFG at 10 mg/kg was able to significantly improve the survival of the animals challenged with strain FMR 10034, although this might be because of the higher virulence of this strain and the short-term treatments used in this model rather than a lower efficacy of the drugs against this strain.

The smaller inoculum and the longer treatment period used in the immunosuppressed mouse model allowed the observation of good responses to all of the drugs tested against both strains.

The low dose of CAS reduced the fungal tissue burden in the kidneys of immunocompetent mice in the same way as the

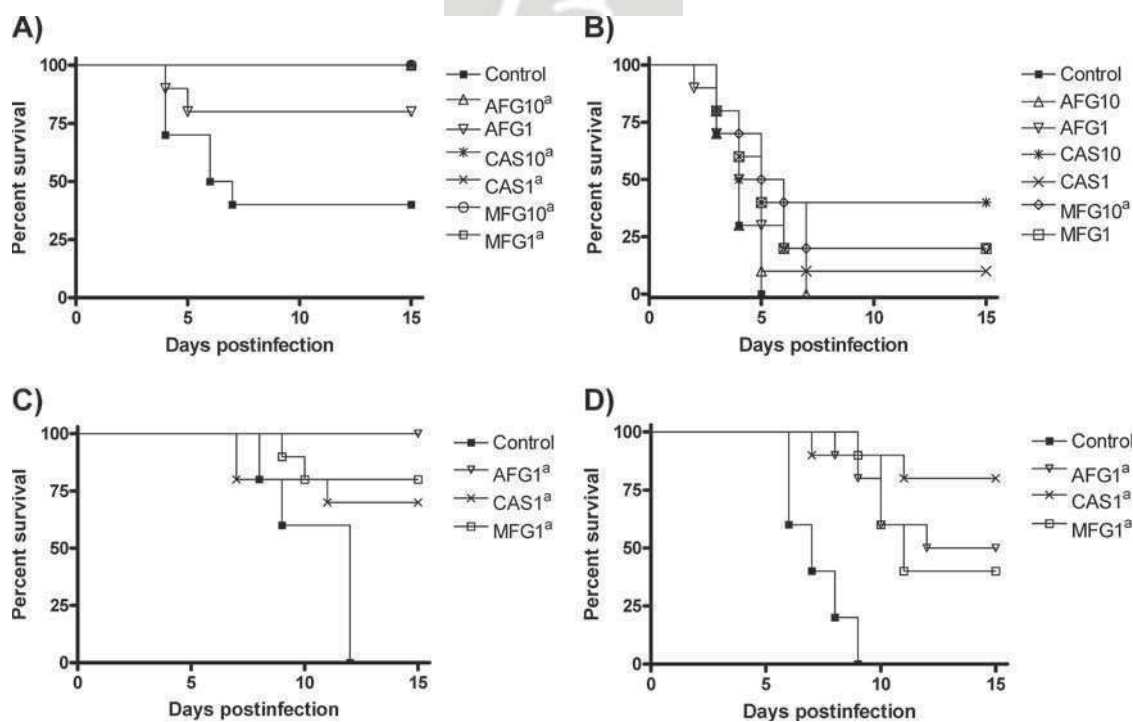


FIG. 1. Cumulative mortality of immunocompetent mice infected with *C. dubliniensis* FMR 10032 (A) and FMR 10034 (B) and immunosuppressed mice infected with *C. dubliniensis* FMR 10032 (C) and FMR 10034 (D). AFG1 and AFG10, AFG at 1 and 10 mg/kg/day. CAS1 and CAS10, CAS at 1 and 10 mg/kg/day. MFG1 and MFG10, MFG at 1 and 10 mg/kg/day. A superscript lowercase letter a indicates a *P* value of <0.05 versus the control.

TABLE 2. Effects of antifungal treatments on the tissue fungal burdens of mice infected with *C. dubliniensis* FMR 10032 and FMR 10034

Isolate (immunosuppression, inoculum [CFU/mouse] and drug [dose [mg/kg/day]])	Log ₁₀ mean CFU count (SEM)	
	Kidney	Spleen
FMR 10032 (none, 1.5 × 10⁷)		
None	8.12 (0.10)	6.18 (0.12)
AFG (10)	2.95 (0.14) ^{a,b}	2.64 (0.16) ^{a,c}
AFG (1)	5.65 (0.17) ^a	4.21 (0.22) ^a
CAS (10)	3.08 (0.10) ^{a,b}	3.38 (0.14) ^a
CAS (1)	3.41 (0.15) ^{a,b}	3.56 (0.10) ^a
MFG (10)	3.23 (0.16) ^{a,b}	3.58 (0.14) ^a
MFG (1)	4.25 (0.18) ^a	3.97 (0.19) ^a
FMR 10034 (none, 1.5 × 10⁷)		
None	6.60 (0.18)	5.60 (0.07)
AFG (10)	4.63 (0.12) ^{a,b}	4.25 (0.09) ^a
AFG (1)	6.33 (0.14)	4.54 (0.14) ^a
CAS (10)	4.09 (0.18) ^{a,b}	3.89 (0.22) ^a
CAS (1)	4.50 (0.15) ^{a,b}	4.21 (0.14) ^a
MFG (10)	4.69 (0.13) ^{a,b}	4.18 (0.17) ^a
MFG (1)	6.33 (0.14)	4.79 (0.15) ^a
FMR 10032 (CPO + 5FU,^d 1.5 × 10⁵)		
None	8.03 (0.08)	6.58 (0.12)
AFG (1)	5.75 (0.28) ^a	2.62 (0.25) ^a
CAS (1)	1.77 (0.15) ^{a,b}	1.26 (0.31) ^{a,b}
MFG (1)	5.47 (0.12) ^a	2.62 (0.21) ^a
FMR 10034 (CPO + 5FU, 1.5 × 10⁵)		
None	7.86 (0.08)	6.31 (0.14)
AFG (1)	5.94 (0.25) ^a	2.96 (0.20) ^a
CAS (1)	3.39 (0.14) ^{a,b}	2.08 (0.12) ^{a,b}
MFG (1)	6.47 (0.08) ^a	3.26 (0.08) ^a

^a P < 0.05 versus the control.

^b P < 0.05 versus AFG at 1 mg/kg and MFG at 1 mg/kg.

^c P < 0.05 versus the other treatments.

^d CPO + 5FU, cyclophosphamide (200 mg/kg) and 5-fluorouracil (150 mg/kg) administered on the day of infection.

three echinocandins did at doses 10 times higher. This agrees with the previously described longer persistence of CAS in the kidneys relative to the other two echinocandins (1, 2, 7).

Clemons et al. (3) reported no correlation between abnormal growth in vitro and reduced efficacy in vivo of the echinocandins against *C. albicans*. Although the data presented here represent only a few strains of *C. dubliniensis*, our data for this species are similar to those of Clemons et al. (3) for *C. albicans*. Overall, echinocandins were effective in the treatment of invasive murine candidiasis caused by *C. dubliniensis*, but fur-

ther investigation is needed to improve therapies for this kind of infection.

We thank Núria Pilas, Catalina Nuñez, and Pilar Hernández for their technical assistance.

This work was partially supported by a grant from the Fondo de Investigaciones sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031) and by a grant from the Departamento de Educación, Universidades e Investigación, from the Gobierno Vasco (project GIC07 123-IT-222-07).

REFERENCES

- Andes, D. R., D. J. Diekema, M. A. Pfaller, K. Marchillo, and J. Bohrmueller. 2008. In vivo pharmacodynamic target investigation for micafungin against *Candida albicans* and *C. glabrata* in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3497–3503.
- Andes, D., D. J. Diekema, M. A. Pfaller, R. A. Prince, K. Marchillo, J. Ashbeck, and J. Hou. 2008. In vivo pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:539–550.
- Clemons, K. V., M. Espiritu, R. Parmar, and D. A. Stevens. 2006. Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1293–1297.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard—third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Fanci, R. 2009. Breakthrough *Candida dubliniensis* fungemia in an acute myeloid leukemia patient during voriconazole therapy successfully treated with caspofungin. *J. Chemother.* **21**:105–107.
- Fleischhacker, M., C. Radecke, B. Schulz, and M. Ruhnke. 2008. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**:127–131.
- Hajdu, R., R. Thompson, J. G. Sundelof, B. A. Pelak, F. A. Bouffard, J. F. Dropinski, and H. Kropp. 1997. Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agent MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2339–2344.
- Isham, N. C., and M. A. Ghannoum. 2007. Voriconazole and caspofungin cidal activity against non-*albicans* *Candida* spp. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **15**:250–253.
- Jacobsen, M. D., J. A. Whyte, and F. C. Odds. 2007. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* respond differently to echinocandin antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1882–1884.
- Mariné, M., C. Serena, B. Fernández-Torres, F. J. Pastor, and J. Guarro. 2005. Activities of flucytosine, fluconazole, amphotericin B, and micafungin in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4757–4759.
- Marriott, D., M. Laxton, and J. Harkness. 2001. *Candida dubliniensis* candidemia in Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:479.
- Mubareka, S., D. C. Vinh, and S. E. Sanche. 2005. *Candida dubliniensis* bloodstream infection: a fatal case in a lung transplant recipient. *Transplant. Infect. Dis.* **7**:146–149.
- Ostrosky-Zeichner, L., J. H. Rex, P. G. Pappas, R. J. Hamill, R. A. Larsen, H. W. Horowitz, W. G. Powderly, N. Hyslop, C. A. Kauffman, J. Cleary, J. E. Mangino, and J. Lee. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3149–3154.
- Pinjon, E., G. P. Moran, D. C. Coleman, and D. J. Sullivan. 2005. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1210–1214.
- van Hal, S. J., D. Stark, J. Harkness, and D. Marriott. 2008. *Candida dubliniensis* meningitis as delayed sequela of treated *C. dubliniensis* fungemia. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:327–329.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

4.5. Eficàcia del posaconazole en una infecció disseminada per *Candida tropicalis* en ratolins.

Efficacy of posaconazole in a murine disseminated infection by *Candida tropicalis*.

Mariné M, Pastor FJ, Guarro J.

En revisió a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Efficacy of posaconazole in a murine disseminated infection by
Candida tropicalis

Running title: Posaconazole against *C. tropicalis*

Marçal Mariné, F. Javier Pastor and Josep Guarro*

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

***Corresponding author. Mailing Address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Spain. Phone: 34-977-759359. Fax: 34-977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat**

ABSTRACT

We evaluated the efficacy of posaconazole against *Candida tropicalis* in a systemic infection model with immunosuppressed mice. Posaconazole at 50 mg/kg/day prolonged the survival of mice and reduced the fungal tissue burden of mice infected with any of the five strains tested with the exception of one strain that had a high MIC against this drug. Our results demonstrate the efficacy of posaconazole in the treatment of invasive murine infection caused by *C. tropicalis*.

Candidiasis has become an important cause of nosocomial bloodstream infections, with associated mortality rates as high as 40% (10,11). *Candida tropicalis* is the third or fourth most commonly isolated species of *Candida* (5,11). Although this species is not considered more virulent than other species, such as *C. albicans* (7), it has been associated with higher mortality rates in cancer patients (15). It is particularly virulent in neutropenic hosts (10), and current therapies need improvement.

Posaconazole (PSC) is active in vitro similarly to itraconazole and voriconazole against most *Candida* species (3) and it is less likely to be involved in drug-drug interactions (9). PSC is approved for the treatment of several filamentous fungi infections and oropharyngeal candidiasis in immunocompromised patients (14). However, there is no adequate clinical data for making an evidence-based recommendation for treatment of candidiasis infections other than oropharyngeal candidiasis (10).

To improve our knowledge of what part this drug plays in the management of *Candida* infections, the present study has tested the efficacy of PSC in an immunocompromised murine model of disseminated infection by *C. tropicalis*.

Seventeen clinical strains of *C. tropicalis* were used in the study (Table 1). Susceptibility was determined using a reference method (2). Minimal fungicidal concentration (MFC) was defined as a 99.9% or greater reduction in the number of CFU/ml (6). A haemocytometer was used to adjust the desired fungal inocula for both in vitro and in vivo studies.

Male OF1 mice were used following the procedure standards approved by the Animal Welfare Committee of the Rovira i Virgili University.

For survival and tissue burden studies, mice received 200 mg/kg of cyclophosphamide intraperitoneally (i.p.) plus 150 mg/kg of 5-fluorouracil intravenously (i.v.) on the same day of infection. PSC was purchased as Noxafil (Schering-Plough Ltd.). Five strains representing different in vitro susceptibility patterns were chosen for the in vivo studies. Mice were challenged with 1×10^5 CFU in 0.2 ml i.v. In previous tests, this inoculum has caused mortality rates of 75-100% within 12 days of infection (data not shown). Groups of 10 mice were randomly established for survival and tissue burden studies for each treatment and strain. The different groups were treated with PSC at 50 mg/kg given orally once daily (q.d.) (12) or 25 mg/kg given twice daily (b.i.d.). Control animals received no treatment. All treatments began 24 h after challenge, and the therapy lasted for 5 days. For survival studies, mice were checked daily for 15 days. For tissue burden studies mice were killed one day after the completion of treatment, spleen and kidneys were aseptically removed and weighed, and the organs were homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on Sabouraud dextrose agar, incubated at 35° C and examined daily for 3 days.

Mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups using the log-rank test. Colony counts in tissue burden studies were analyzed using the Mann-Whitney U test. A *p* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

A minimum inhibitory concentration (MIC) higher than 16 µg/ml was observed only for the strain FMR 8895, while for the other strains PSC showed MICs of ≤ 1 µg/ml (Table 1). Representative strains with low, intermediate and high MICs were chosen for in vivo studies. Trailing growth effects and MFCs higher than

16 µg/ml were observed for all the strains tested, with the exception of strain FMR 10239, which was also chosen for the in vivo studies.

Both PSC regimens significantly prolonged survival (Figure 1) and reduced fungal tissue burden in kidneys and spleen (Figure 2) of mice relative to the control group ($p < 0.05$) for all the strains with the exception of FMR 8895. Fungal tissue burden reduction was greater for strain FMR 10239 than for the other strains for both organs and both PSC regimens tested ($p < 0.05$). No statistical differences were observed in survival or tissue burden between mice treated with PSC at 50 mg/kg q.d. and those treated with PSC at 25 mg/kg b.i.d.

In the present study, we have selected *C. tropicalis* isolates with different susceptibility patterns to PSC in order to compare the efficacy of this drug against them in vivo. The high prevalence of trailing growth effects is well known among the *C. tropicalis* isolates in in vitro tests for the azole drugs (1). The correct reading of the MICs avoids their misclassification into the 'resistant' category, although the fact that many isolates of this species retain the ability to grow, even at high concentrations of the drug, is a matter for concern.

Dividing daily PSC intakes into various dosages has been shown to increase the absorption of this drug in humans (4,8). In this study, however, no statistical differences were observed between single and divided dosage regimens.

PSC has been described as fungistatic against *C. tropicalis* (13), which agrees with the results of this study where a low MFC was observed for only one out of seventeen strains. The higher activity observed in vitro for this strain (FMR 10239) also corresponded to a higher fungal tissue burden reduction in vivo. Despite the high MFCs in this study, PSC showed efficacy in the treatment

of *C. tropicalis* against all the strains tested, with the exception of the strain that showed a high MIC in vitro for this drug (FMR 8895).

Our results suggest that trailing growth effects and high MFCs observed for many strains of *C. tropicalis* are not predictive of reduced efficacy of PSC in vivo against this species, and only a correlation between high MICs and a poor response in vivo was observed for this drug. PSC was effective against most strains of *C. tropicalis* tested and merits further investigation in order to develop future effective treatments for *C. tropicalis* disseminated infections.

REFERENCES

1. **Arthington-Skaggs, B. A., W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, J. P. Frade, M. E. Brandt, R. A. Hajjeh, L. H. Harrison, A. N. Sofair, and D. W. Warnock.** 2002. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2477–2481.

2. **CLSI.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-Third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute.

3. **Espinel-Ingroff, A., F. Barchiesi, M. Cuenca-Estrella, M. A. Pfaller, M. Rinaldi, J. L. Rodriguez-Tudela, and P. E. Verweij.** 2005. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3884–3889.

4. **Ezzet, F., D. Wexler, R. Courtney, G. Krishna, J. Lim, and M. Laughlin.** 2005. Oral bioavailability of posaconazole in fasted healthy subjects: comparison between three regimens and basis for clinical dosage recommendations. *Clin. Pharmacokinet.* **44**:211–220.

5. **Hajjeh, R. A., A. N. Sofair, L. H. Harrison, G. M. Lyon, B. A. Arthington-Skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. T. Sanza, S. Huie, S. F. Yeo, M. E. Brandt, and D. W. Warnock.** 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1519–1527.

6. **Isham, N. C., and M. A. Ghannoum.** 2007. Voriconazole and caspofungin
cidality against non-*albicans* *Candida* spp. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **15**:250-
253.

7. **Kontoyiannis, D. P., I. Vaziri, H. A. Hanna, M. Boktour, J. Thornby, R.
Hachem, G. P. Bodey, and I. I. Raad.** 2001. Risk factors for *Candida*
tropicalis fungemia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1676–1681

8. **Krishna, G., A. Moton, L. Ma, M. M. Medlock, and J. McLeod.** 2009.
Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under
various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents
Chemother.* **53**:958-966.

9. **Morris, M. I.** 2009. Posaconazole: a new oral antifungal agent with an
expanded spectrum of activity. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **66**:225-236.

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

11. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, J. F. Meis, I. M.
Gould, W. Fu, A. L. Colombo, and E. Rodriguez-Noriega; Global**

- Antifungal Surveillance Study.** 2007. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1735-1745.
12. **Rodríguez, M. M., F. J. Pastor, C. Serena, and J. Guarro.** 2009. Posaconazole efficacy in a murine disseminated infection caused by *Paecilomyces lilacinus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**:361-364.
13. **Sóczó, G., G. Kardos, P. M. McNicholas, E. Balogh, L. Gergely, I. Varga, B. Kelentey, and L. Majoros.** 2007. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time kill test against nine *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:1004-1009.
14. **SP Europe.** 2008. Noxafil 40 mg/ml oral suspension. Summary of product characteristics. SP Europe, Brussels, Belgium.
15. **Viscoli C., C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, V. Krcmery, B. de Pauw, F. Meunier, and the Invasive Fungal Infection Group of the EORTC.** 1999. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin. Infect. Dis.* **28**:1071-1079.

Table 1. Antifungal activity of posaconazole *in vitro* against 17 strains of *C. tropicalis*.

Strain	Posaconazole	
	MIC-2 ^a (µg/ml)	MFC ^b (µg/ml)
8895	>16	>16
8896	0.125	>16
8897	0.06	>16
8898	0.125	>16
9726	0.5	>16
9727	<0.03	>16
10231	0.06	>16
10232	0.06	>16
10333	0.06	>16
10234	0.06	>16
10235	0.125	>16
10236	0.06	>16
10237	1	>16
10238	0.06	>16
10239	<0.03	1
10240	<0.03	>16
10241	0.125	>16

^aMIC-2 corresponds to 50% of growth inhibition.

^bMFC corresponds to 99.9% or greater reduction in CFU/ml count.

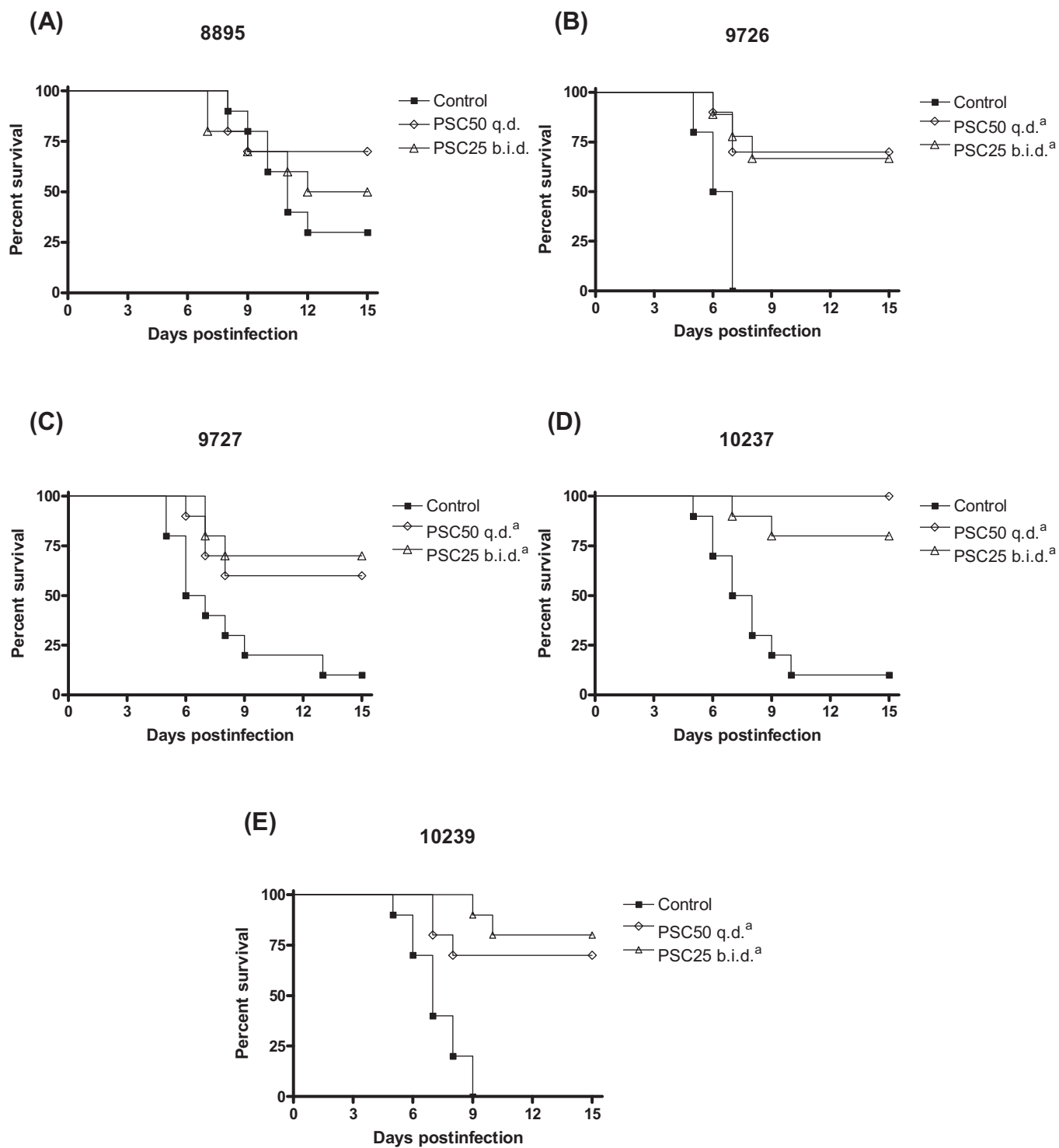


FIG.1. Cumulative mortality of mice infected with *C. tropicalis* FMR 8895 (A), FMR 9726 (B), FMR 9727 (C), FMR 10237 (D) and FMR 10239 (E). PSC50, posaconazole at 50 mg/kg q.d. p.o. PSC25 posaconazole at 25 mg/kg b.i.d. p.o. ^a P <0.05 versus control.

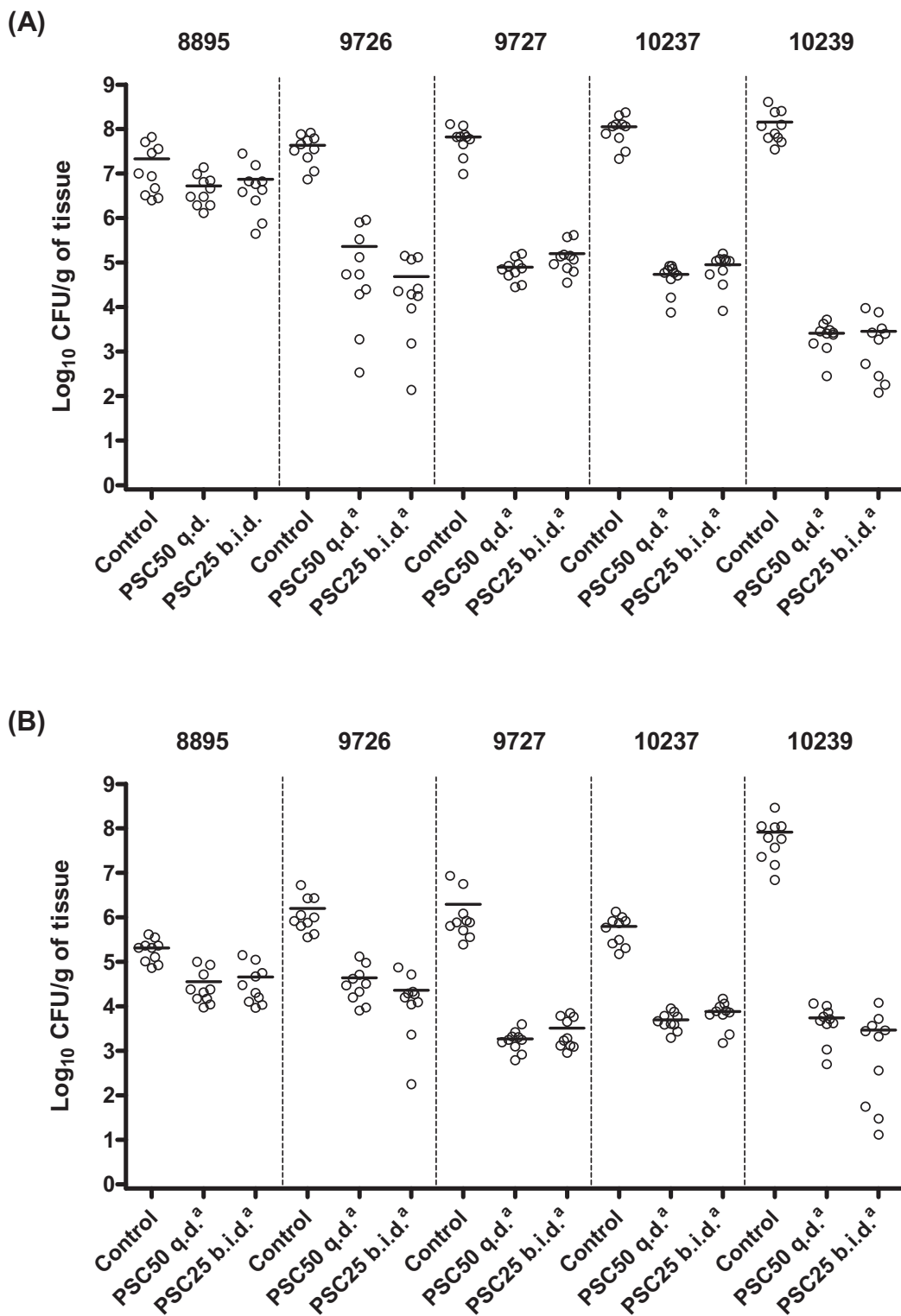


FIG.2. Effects of the antifungal treatments on tissue burden of *C. tropicalis* FMR 8895, FMR 9726, FMR 9727, FMR 10237 and FMR 10239 in kidneys (A) and spleen (B) of mice. PSC50, posaconazole at 50 mg/kg q.d. p.o. PSC25 posaconazole at 25 mg/kg b.i.d. p.o. ^a P <0.05 versus control. Horizontal lines in scatter plots indicate mean values.

4.6. Eficàcia d'una nova formulació d'amfotericina B en un model murí d'infecció disseminada per *Candida glabrata*.

Efficacy of a new formulation of amphotericin B in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*.

Mariné M, Espada R, Torrado J, Pastor FJ, Guarro J.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008, 61:880-883.

Efficacy of a new formulation of amphotericin B in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*

Marçal Mariné¹, Raquel Espada², Juan Torrado², F. Javier Pastor¹ and Josep Guarro^{1*}

¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain;

²Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Received 10 September 2007; returned 9 October 2007; revised 7 December 2007; accepted 8 January 2008

Objectives: Amphotericin B poly-aggregates are a new formulation of amphotericin B, which can be obtained cheaply. In this study, we tested the efficacy of this new formulation for treating a disseminated infection by *Candida glabrata* in a murine model.

Methods: Mice were rendered neutropenic by intraperitoneal cyclophosphamide and intravenous 5-fluorouracil administration and infected intravenously with 2×10^8 cfu of *C. glabrata*. The efficacy of the new formulation of amphotericin B was evaluated by survival and tissue burden studies. The experiments were repeated using three different clinical strains of *C. glabrata*.

Results and conclusions: Amphotericin B poly-aggregates showed an efficacy similar to that of amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B in the treatment of a disseminated murine infection by *C. glabrata*.

Keywords: candidiasis, animal models, poly-aggregates

Introduction

Amphotericin B is a polyene with a broad range of activity, available since the 1950s and still extensively used for treating a wide spectrum of fungal infections. The classical and most frequently used formulation of this drug is amphotericin B deoxycholate. However, its important adverse effects, mainly nephrotoxicity, make it inappropriate in many cases.^{1,2} Recently, newer lipid formulations of amphotericin B with less adverse effects and activities similar to that of amphotericin B deoxycholate have become available, but their high costs limit enormously their clinical use, especially in developing countries.

Due to the low aqueous amphotericin B solubility, amphotericin B molecules are usually in an aggregated disposition. In the conventional deoxycholate preparation (Fungizone), amphotericin B is mainly in a dimer form. Different types of aggregation of dimers or poly-aggregates can be obtained by heating Fungizone³ or depending on certain interactions with excipients.^{4,5} Another way to control the aggregation state of amphotericin B is related to the pH conditions during the formula preparation procedure.⁶ This latest way to obtain amphotericin B in a poly-aggregated state is cheap and this new amphotericin B formulation has previously demonstrated efficacy in the

treatment of experimental leishmaniasis.⁶ Moreover, this new formulation has been proven experimentally to be less toxic than the conventional amphotericin B deoxycholate, which allows its administration at high doses in a way similar to the most expensive lipid formulations.⁶

We have tested the efficacy of this new formulation in a murine model of *Candida glabrata* infection using three different clinical strains, comparing it with the traditional deoxycholate and liposomal formulations.

Materials and methods

Three clinical isolates, FMR 8487, FMR 8489 and FMR 8497, the first two isolated from urine and the third one from an exudate, at our university hospital, were used in the study. Following the CLSI broth microdilution reference method, all three strains showed an identical *in vitro* susceptibility to amphotericin B, i.e. MICs of 1 mg/L. They were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) plates and incubated at 35°C for 24 h.

Male OF1 mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal injection of 200 mg/kg cyclophosphamide plus a single intravenous injection of 150 mg/kg 5-fluorouracil on the day of infection.⁷

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

Mariné et al.

The procedure followed the standards approved by the Animal Welfare Committee of the Rovira i Virgili University.

Amphotericin B was purchased as Fungizone (Squibb Industria Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain). Liposomal amphotericin B as AmBisome and amphotericin B raw material were provided by Gilead Sciences S.A. (Madrid, Spain) and by Bristol-Myers Squibb, respectively. Amphotericin B poly-aggregates were prepared as follows: amphotericin B as raw material (50 mg) was dispersed in 5 mL of a water solution formed by sodium deoxycholate (41 mg), dibasic sodium phosphate (10 mg) and monobasic sodium phosphate (0.9 mg). The resulting homogeneous suspension was also diluted in water to a final volume of 10 mL and the amphotericin B molecular organization was analysed by spectrophotometry showing the same absorption spectra reported previously.⁶

The efficacy of the different drugs was evaluated through prolongation of mice survival and reduction in fungal tissue burden of mice challenged by the three strains of *C. glabrata*. For the survival and tissue burden studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain, one for each treatment and one as control. Mice were challenged with 2×10^8 cfu in 0.2 mL into the lateral tail vein. The different groups were treated as follows: liposomal amphotericin B (10 mg/kg of body weight/day),⁸ free poly-aggregates of amphotericin B (5 or 10 mg/kg/day), both given intravenously, and amphotericin B deoxycholate (1.5 mg/kg/day), given intraperitoneally.⁷ All treatments began 24 h after challenge and the therapy lasted for 5 days.

For survival studies, mice were checked daily for 15 days. For tissue burden studies, 1 day after the treatment finished, five of the surviving mice, randomly chosen, were sacrificed. Spleen and kidneys were aseptically removed, and the entire organs were homogenized in 1 mL of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on SDA, incubated at 35°C and examined daily for 3 days. The numbers of cfu/g of tissue were calculated.

Mean survival time was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups using the log-rank test. Colony counts in tissue burden studies were analysed using the Mann–Whitney *U*-test. Calculations were made using SPSS 13.0 and Graph pad 4.0 for Windows.

Results

Figure 1 shows the results of survival studies obtained with the strains tested. Whereas all treatments prolonged the survival of mice infected with strain FMR 8489, none of them significantly prolonged the survival of mice infected with the strains 8497 and 8487 with the exception of the poly-aggregates at 5 mg/kg for the latter strain.

Tissue burden results are shown in Figure 2. Liposomal amphotericin B and amphotericin B deoxycholate significantly reduced the fungal load in kidneys and spleen for all the strains ($P < 0.05$) with the exception of the latter formulation in spleen for the strain 8487. The high dose of the amphotericin B poly-aggregate formulation significantly reduced the fungal load for all the strains and all the organs ($P < 0.05$) with the exception of spleen for the strain 8487. The low dose of the formulation was clearly less effective than the other formulations and doses at reducing the fungal burden in kidneys.

We observed no statistical differences between the deoxycholate formulation and liposomal amphotericin B in the survival and tissue burden studies. There were significant differences only in the reduction of fungal load between mice treated with

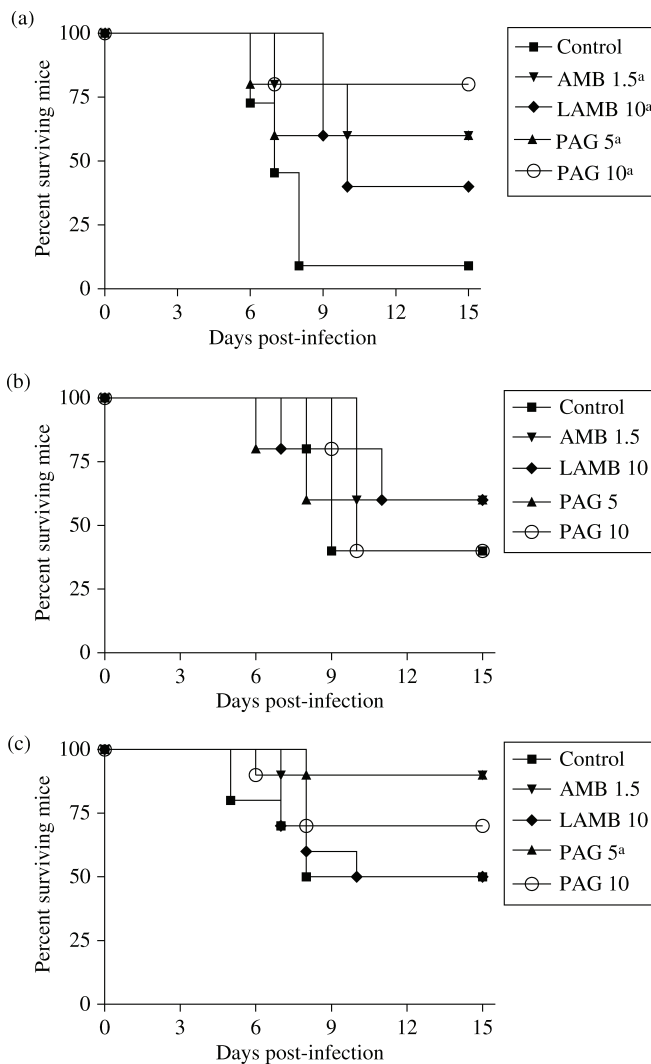


Figure 1. Cumulative mortality of mice infected with *C. glabrata* FMR 8489 (a), FMR 8497 (b) and FMR 8487 (c). AMB 1.5, amphotericin B deoxycholate at 1.5 mg/kg/day; LAMB 10, liposomal amphotericin B at 10 mg/kg/day; PAG 5 and PAG 10, amphotericin B poly-aggregates at 5 and 10 mg/kg/day, respectively. ^a $P < 0.05$ versus control.

the deoxycholate formulation and the amphotericin B poly-aggregated formulation at 10 mg/kg for the strain 8489 in spleen. Liposomal amphotericin B was more effective in reducing the tissue burden with respect to the amphotericin B poly-aggregated formulation for the 8487 and 8497 strains but not for the 8489 strain in kidneys.

Discussion

C. glabrata is one of the most common *Candida non-albicans* species causing severe human infections. Despite the newer alternative drugs, amphotericin B remains as one of the main options for the treatment of such infections.⁹ In a previous study using a murine model of disseminated infection by *C. glabrata*, we demonstrated that amphotericin B showed a higher efficacy than representatives of other antifungal classes such as echinocandins and azoles.⁷

Amphotericin B poly-aggregates against *C. glabrata*

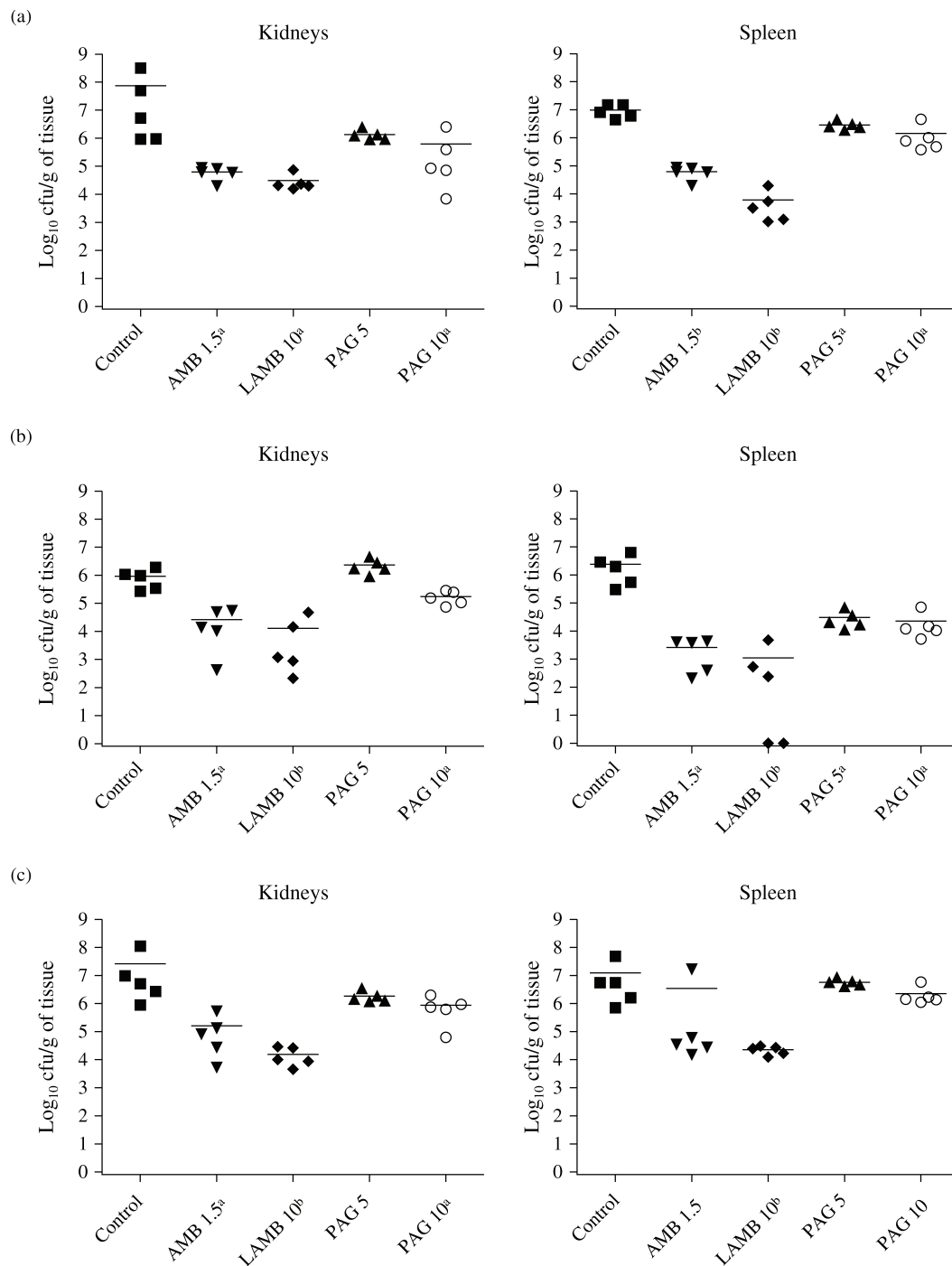


Figure 2. Effects of the antifungal treatments on tissue burden of *C. glabrata* FMR 8489 (a), FMR 8497 (b) and FMR 8487 (c) in kidneys and spleen of mice. AMB 1.5, amphotericin B deoxycholate at 1.5 mg/kg/day; LAMB 10, liposomal amphotericin B at 10 mg/kg/day; PAG 5 and PAG 10, amphotericin B poly-aggregates at 5 and 10 mg/kg/day, respectively. ^a*P* value of <0.05 versus control. ^b*P* value of <0.01 versus control and <0.05 versus the poly-aggregates. Horizontal lines of scatter plots indicate the mean values.

Currently, many formulations of amphotericin are available with noticeable lesser adverse effects, but the use of these new drugs, as stated above, is greatly limited by their high cost.^{10,11} In our study, we observed a similar efficacy between the amphotericin B poly-aggregated formulation and the marketed amphotericin B formulations we tested.

The comparative effectiveness of the different amphotericin B formulations on the market is controversial because of the high degree of heterogeneity inherent in the experimental studies. This high variability, which can be due to the pathogenic agent or to the patient, makes it difficult to demonstrate significant differences in efficacy in clinical practice among the

Mariné *et al.*

different formulations.^{12,13} Both sources of variability can be partially reduced in the animal models. In this work, different results were observed depending on the strain tested. Based on the data of the survival studies, the new formulation is not statistically different from the tested commercially available formulations. Furthermore, it is important to point out that the lower toxicity of the new formulation in relation to the conventional deoxycholate formulation allows the administration of doses of amphotericin B as high as 10 mg/kg.

Based on the tissue burden reduction, for the amphotericin B poly-aggregated formulation, better results were found, in general, in spleen than in the kidneys, since in this organ even the lower dose of such a formulation was able to reduce the fungal load for two of the three strains. This effect may be due to the fact that the disposition of drug molecules as large aggregates could enhance amphotericin B capture by the mononuclear phagocyte system cells located in liver, spleen and bone marrow.¹⁴ The targeting of the new amphotericin B poly-aggregated formulation to these organs may constitute the basis of new applications for this compound. For instance, in the treatment of visceral leishmaniasis, this formulation has proven to be clearly superior to the conventional deoxycholate formulations.⁶

The new amphotericin B poly-aggregated formulation is an interesting alternative to the commercially available amphotericin B formulations we tested and warrants future studies with other fungal species and different infection types.

Acknowledgements

We thank Bristol-Myers Squibb and Gilead for having supplied us with amphotericin B as raw material and AmBisome, respectively.

Funding

This work was partially supported by a grant of the Complutense University and Madrid Community Administration to the research group 910939 and a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; **68**: 151–62.
2. Kleinberg M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27** Suppl 1: 12–6.
3. Gaboriau F, Cheron M, Leroy L *et al.* Physicochemical properties of the heat-induced superaggregates of amphotericin B. *Biophys Chem* 1997; **66**: 1–12.
4. Adams ML, Andres DR, Kwon GS. Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced *in vitro* hemolysis but maintains potent *in vivo* antifungal activity. *Biomacromolecules* 2003; **4**: 750–7.
5. Vakil R, Kwon GS. PEG-phospholipid micelles for the delivery of amphotericin B. *J Control Release* 2005; **101**: 386–8.
6. Sanchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S *et al.* Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Drug Target* 2004; **12**: 453–60.
7. Marine M, Serena C, Fernandez-Torres B *et al.* Activities of flu-cytosine, fluconazole, amphotericin B, and micafungin in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4757–9.
8. Ortoneda M, Capilla J, Pujol I *et al.* Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 525–9.
9. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 244–51.
10. Rex JH, Walsh TJ. Estimating the true cost of amphotericin B. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 1408–10.
11. Wong-Beringer A, Jacobs RA, Guglielmo BJ. Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis* 1998; **27**: 603–18.
12. Barrett JT, Vardulaki KA, Conlon C *et al.* A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin Ther* 2003; **25**: 1295–320.
13. Herbrecht R, Natarajan-Ame S, Nivoix Y *et al.* The lipid formulations of amphotericin B. *Expert Opin Pharmacother* 2003; **4**: 1277–87.
14. Cheron M, Petit C, Bolard J *et al.* Heat-induced reformulation of amphotericin B-deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 904–10.

4.7. Eficàcia d'una nova formulació d'amfotericina B en models murins d'infecció disseminada per *Candida glabrata* o *Candida tropicalis*.

Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*.

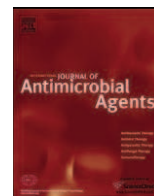
Mariné M, Espada R, Torrado J, Pastor FJ, Guarro J.
International Journal of Antimicrobial Agents. 2009,
doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.07.005



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>



Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*

Marçal Mariné^a, Raquel Espada^b, Juan Torrado^b, F. Javier Pastor^{a,*}, Josep Guarro^a

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

^b Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultat de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2009

Accepted 7 July 2009

Keywords:

Candidiasis
Animal models
Amphotericin B
Microspheres

ABSTRACT

Amphotericin B microspheres (M-AMB) are a new, inexpensive formulation of amphotericin B. In this study, we tested the efficacy of this new formulation for treating murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*. M-AMB showed a similar efficacy to that of amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B in the treatment of both disseminated murine infections. Its low toxicity and inexpensive production costs make this formulation potentially attractive for the treatment of fungal infections.

© 2009 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Amphotericin B has been the drug of choice for the treatment of a wide range of fungal infections for almost 50 years. This drug is active against many fungal species that cause life-threatening infections, and increased resistance rates over time are rarely reported. The major flaw of amphotericin B treatment is its nephrotoxicity, which greatly limits its use. To palliate its adverse effects, various formulations such as emulsions [1], liposomes [2] and nanoparticles [3] have been developed. Currently, lipid formulations are accepted as a less toxic alternative to the traditional colloidal dispersion. However, high production costs of these new formulations limit their use.

A new formulation of amphotericin B has been developed that consists of drug-containing albumin microspheres, elaborated by a spray-drying process [4]. This new formulation has proven to be active against leishmaniasis and to have a lower toxicity profile than amphotericin B deoxycholate in animal models [5,6]. The new microsphere formulation can be produced more cheaply than the lipid amphotericin B formulations already marketed and this may allow wider usage of this drug. Recently, this new microsphere formulation of amphotericin B has shown efficacy against *Candida albicans* in a murine model of candidiasis comparable with that of the deoxycholate formulation [7,8].

Infections caused by *Candida* spp. are some of the most common among the fungal infections, with amphotericin B being a

recommended treatment for systemic infections [9]. Amphotericin B microsphere formulation is an interesting option for improving current therapies against *Candida* infections. In the present study, we tested the efficacy of this new formulation in murine models of *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* infection, comparing it with the traditional deoxycholate and liposomal formulations.

2. Materials and methods

2.1. Fungal strains

Two clinical isolates of *C. glabrata* (FMR 8497 and FMR 8489) and one of *C. tropicalis* (FMR 9727) were used in this study. The isolates were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) (Laboratorios Conda Sa, Madrid, Spain) plates and incubated at 35 °C for 24 h. In vitro susceptibilities of the three strains to amphotericin B were determined using the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution reference method [10]. All three strains showed identical in vitro susceptibility to amphotericin B, i.e. a minimal inhibitory concentration (MIC) of 1 mg/L.

2.2. Animals

Male OF1 mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal injection of 200 mg/kg cyclophosphamide plus a single intravenous injection of 150 mg/kg 5-fluorouracil on the day of infection [11].

* Corresponding author. Tel.: +34 977 759 359; fax: +34 977 759 322.
E-mail address: franciscojavier.pastor@urv.cat (F.J. Pastor).

2.3. Compounds

Amphotericin B deoxycholate (ABD) was purchased as Fungizone™ (Squibb Industria Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain) and liposomal amphotericin B (L-AMB) was provided as AmBisome (Gilead Sciences S.A., Madrid, Spain). Amphotericin B as raw material was provided by Bristol-Myers Squibb (Barcelona, Spain). Amphotericin B microspheres (M-AMB) were prepared as follows: amphotericin B was dispersed in 5 mL of a water solution formed by sodium deoxycholate, dibasic sodium phosphate and monobasic sodium phosphate. The resulting dispersion was stirred moderately to achieve a homogeneous suspension. A 20% serum human albumin (Grifols, Barcelona, Spain) solution (5 mL) was added and the final mixture was spray-dried using a Büchi B-191 spray-dryer (Büchi, Flawil, Switzerland) [5]. Albumin microspheres of $1.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$ with a content of 4.0% (w/w) amphotericin B in the final product were obtained. Before drug injection, M-AMB were manually dispersed in a 5% glucose–water solution. The stability of the new formulation has been described in previous studies [6].

2.4. Experimental design

The efficacy of the different drugs was evaluated by prolongation of survival and by reduction of fungal tissue burden of mice challenged with the abovementioned strains. For the survival and tissue burden studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain, one group for each treatment and another as control. Mice were challenged with 2×10^8 colony-forming units (CFU) of *C. glabrata* or 1×10^5 CFU of *C. tropicalis* in 0.2 mL into the lateral tail vein. The different groups were treated as follows: L-AMB (10 mg/kg body weight/day) given intravenously [12]; ABD (1.5 mg/kg/day) given intraperitoneally [11]; and M-AMB (20 mg/kg) given intravenously [5]. Both commercial formulation treatments began 24 h after challenge and the therapy lasted for 5 days. M-AMB were administered in three different regimens, i.e. either as a single dose on Day 1 post infection, two doses at Days 1 and 3 post infection or three doses at Days 1, 3 and 5 post infection.

For survival studies, mice were checked daily for 15 days. For tissue burden studies, five of the surviving mice were randomly chosen and were sacrificed 1 day after the end of treatment. Spleen and kidneys were aseptically removed and the entire organs were homogenised in 1 mL of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on SDA, incubated at 35 °C and examined daily for 3 days, and the numbers of CFU/g of tissue were calculated.

2.5. Statistical analysis

Mean survival time was estimated by the Kaplan–Meier method and was compared among groups using the log-rank test. Colony counts in tissue burden studies were analysed using the Mann–Whitney *U*-test. Calculations were made using SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) and GraphPad 4.0 for Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

3. Results

Fig. 1 shows the results of survival studies obtained with the three strains tested. In the case of *C. glabrata*, the results were contradictory. Whilst all the treatments prolonged the survival of mice infected with strain FMR 8489, none of them significantly prolonged the survival of mice infected with strain FMR 8497. For the *C. tropicalis* strain (FMR 9727), all the formulations and doses except ABD significantly prolonged the survival of mice with respect to the control group. No statistical differences were observed between the three amphotericin B

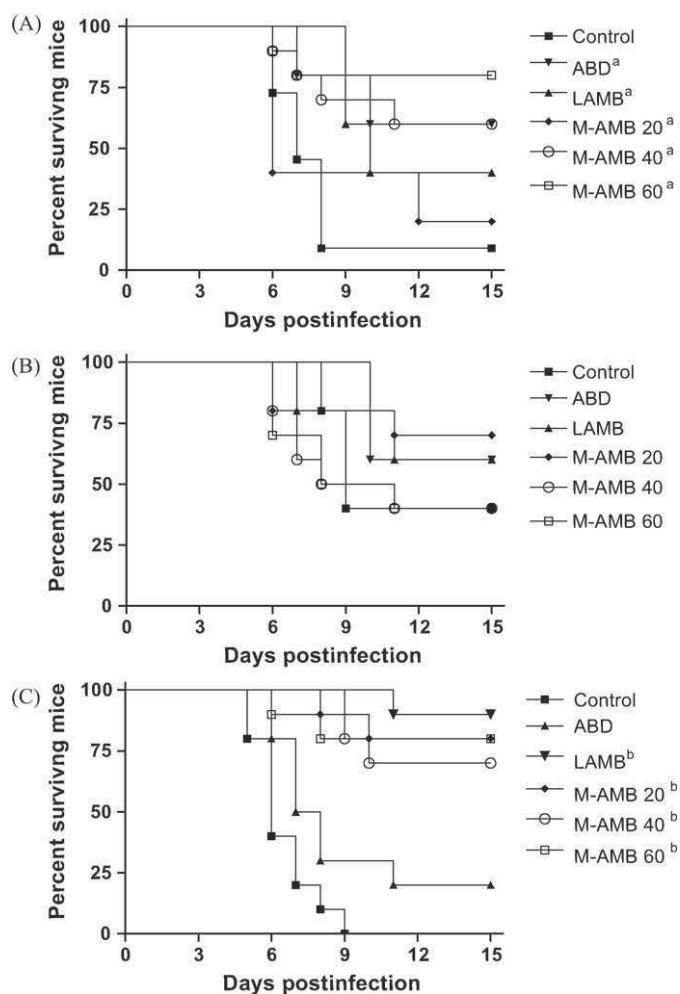


Fig. 1. Cumulative mortality of mice infected with (A) *Candida glabrata* FMR 8489, (B) *C. glabrata* FMR 8497 and (C) *Candida tropicalis* FMR 9727. ABD, amphotericin B deoxycholate 1.5 mg/kg/day \times 5 for a total dose of 7.5 mg/kg; LAMB, liposomal amphotericin B 10 mg/kg/day \times 5 for a total dose of 50 mg/kg; and M-AMB 20, M-AMB 40 and M-AMB 60, amphotericin B microspheres at 20 mg/kg administered once, twice or three times every other day for total doses of 20, 40 or 60 mg/kg. ^a $P < 0.05$ versus control; ^b $P < 0.01$ versus control and $P < 0.05$ versus amphotericin B deoxycholate.

formulations for either *C. glabrata* strain, but microspheres and liposomal formulations both significantly improved the survival with respect to the deoxycholate formulation for the *C. tropicalis* strain.

Tissue burden results are shown in Fig. 2. L-AMB and ABD significantly reduced the fungal load in kidneys and spleen for all the strains ($P < 0.05$). All doses of microspheres reduced the tissue fungal burden for all strains and organs studied, with the exception of the kidney in mice infected with strain FMR 8489 treated with the lowest dose of this formulation as well as the kidney in mice infected with strain FMR 8497 treated with any of the three doses of microspheres. L-AMB and ABD were more effective in reducing the fungal load with respect to the microsphere formulation for all the strains and organs, except for strain FMR 8489 in spleen for the deoxycholate formulation.

No statistical differences were observed between microsphere dosage regimens for the survival or tissue burden studies, except for the *C. tropicalis* strain fungal burden in the spleen where higher doses of M-AMB significantly reduced the CFU counts with respect to the 20 mg/kg dose.

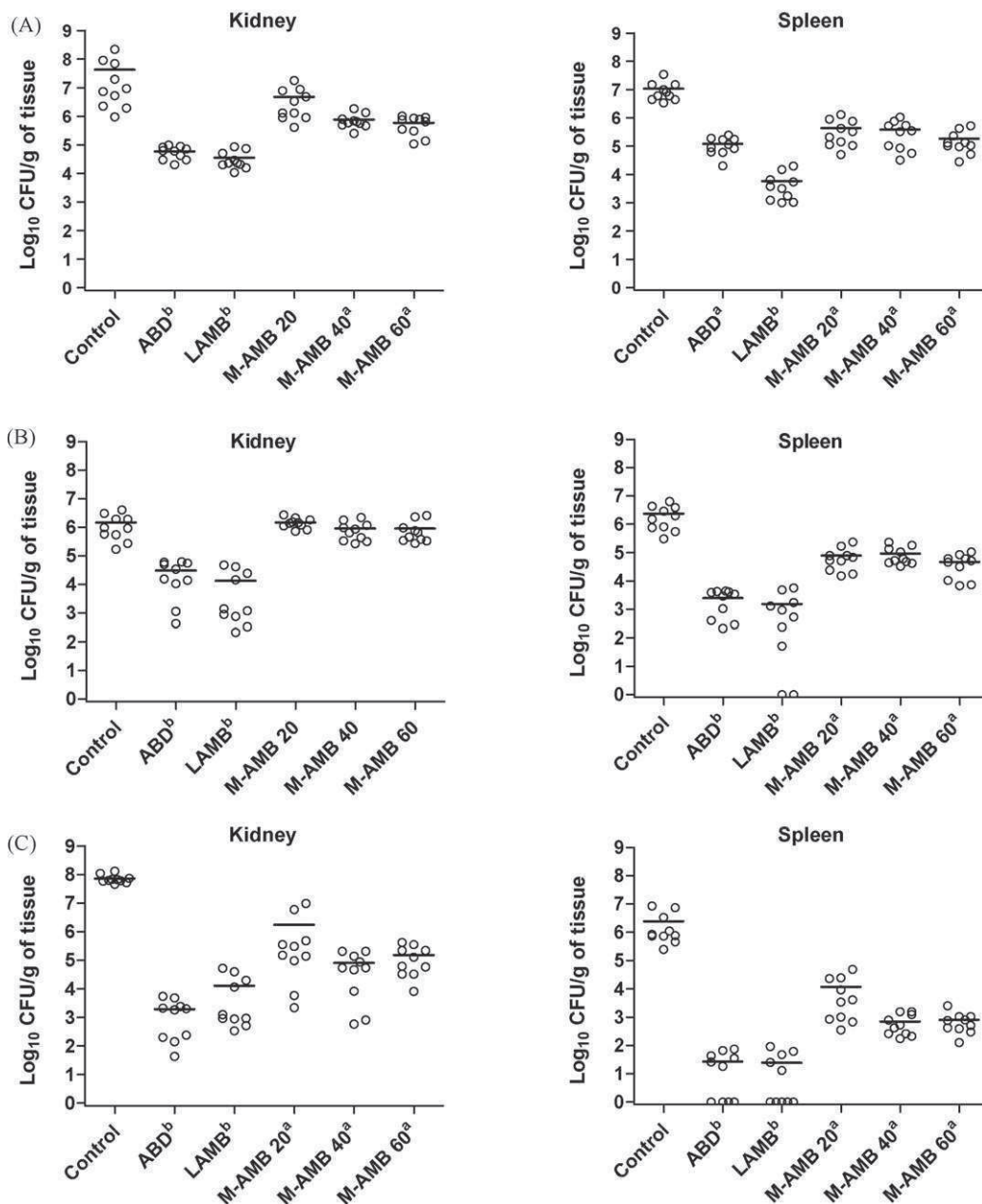


Fig. 2. Effects of antifungal treatments on tissue burden of (A) *Candida glabrata* FMR 8489, (B) *C. glabrata* FMR 8497 and (C) *Candida tropicalis* FMR 9727 in kidneys and spleen of mice. ABD, amphotericin B deoxycholate 1.5 mg/kg/day \times 5 for a total dose of 7.5 mg/kg; LAMB, liposomal amphotericin B 10 mg/kg/day \times 5 for a total dose of 50 mg/kg; and M-AMB 20, M-AMB 40 and M-AMB 60, amphotericin B microspheres at 20 mg/kg administered once, twice or three times every other day for total doses of 20, 40 or 60 mg/kg. ^a $P < 0.05$ versus control; ^b $P < 0.01$ versus control and $P < 0.05$ versus microspheres. Horizontal lines of scatter plots indicate mean values.

4. Discussion

Candida glabrata and *C. tropicalis* are two of the most common *Candida* spp. causing human infections. Poorer outcomes have been reported for patients with fungaemia caused by these two species than patients infected by other *Candida* spp. [13]; however, this has not been widely observed [14]. In terms of drug resistance, higher MICs, delayed killing kinetics or no fungicidal activity have been reported for the commonest non-*albicans* species with the new azoles such as voriconazole and posaconazole [15–17] in addition to the increased resistance rates to fluconazole reported for these species [18]. In contrast to the abovementioned reports on the azole efficacy for *C. glabrata* and *C. tropicalis*, resistance to amphotericin B is rarely reported and amphotericin B remains one of the recommended first-line treatments against both *Candida* spp. [19]. In

addition, we previously demonstrated that amphotericin B showed higher efficacy than representatives of other antifungal classes such as the echinocandins and azoles in a murine model of disseminated infection by *C. glabrata* [11]. The good results obtained by Espada et al. [7,8] with the microsphere formulation against *C. albicans* encouraged us to test such a new formulation against other *Candida* spp.

Acute toxicity of the new M-AMB formulation has been determined in previous studies in hamsters and mice [5,7], where they were reported as being less toxic than the traditional deoxycholate formulation and similar to the liposomal formulation. The dosage of M-AMB is based on the existing data; however, instead of daily administration, subsequent doses of microspheres were delayed to avoid an immune response to the human albumin used to prepare this formulation.

Although in the tissue burden studies microspheres reduced the CFU counts for the *C. tropicalis* strain and one of the *C. glabrata* strains in kidneys, the commercial formulations were more effective in this organ. A lower distribution of microspheres in kidneys, which is associated with the lower toxicity profile of this formulation [7], could explain why the microspheres are less effective than the commercial formulations. In the spleen, where the microsphere formulation distribution is higher than in the kidneys, a significant reduction in CFU counts was observed for all the strains tested, even attaining a fungal burden reduction equal to that obtained with the deoxycholate formulation in one of the *C. glabrata* strains tested.

Despite the modest results observed in reducing tissue burden, similar or even better results were obtained in the survival studies with the new microsphere formulation of amphotericin B with respect to the commercial formulations. Similar results were obtained with the microspheres and the L-AMB formulation; however, two of the microsphere dosage regimens accounted for a lesser total dose compared with the total 50 mg/kg L-AMB administered in the course of the 5-day treatments. In addition, the fact that higher survival rates were attained with the new formulation with respect to the deoxycholate formulation is very encouraging and makes the new formulation worthy of further investigation. This new microsphere formulation that can be administered at escalated or much larger doses than previous formulations with apparently less toxicity [8] appears to have great potential for the treatment of *Candida* infections.

Acknowledgments

The authors thank Bristol-Myers Squibb and Gilead for supplying amphotericin B as raw material and AmBisome, respectively.

Funding: This work was partially supported by a grant from Complutense University and Madrid Community Administration to the research group 910939 (CCG07-UCM/BIO-2824) as well as a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The procedure for the immunosuppression of mice followed the standards approved by the Animal Welfare Committee of the Universitat Rovira i Virgili (Spain).

References

- [1] Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, Perfect JR, Horwith G, Lee L, et al. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis* 1998;26:1383–96.
- [2] Hiemenz JW, Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin Infect Dis* 1996;22(Suppl. 2):S133–44.
- [3] Kayser O, Olbrich C, Yardley V, Kiderlen AF, Croft SL. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int J Pharm* 2003;254:73–5.
- [4] Torrado JJ, Torrado S, Sánchez-Brunete JA, Bolás F, Dea MA, Rama S, et al. 22-12-2005. Microesferas de anfotericina B. Spanish patent ES2212904B2.
- [5] Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Raposo R, et al. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3246–52.
- [6] Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Torrado-Santiago S, et al. Influence of the vehicle on the properties and efficacy of microparticles containing amphotericin B. *J Drug Target* 2005;13:225–33.
- [7] Espada R, Valdespina S, Dea MA, Molero G, Ballesteros MP, Bolás F, et al. In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1125–31.
- [8] Espada R, Valdespina S, Molero G, Dea MA, Ballesteros MP, Torrado JJ. Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:55–61.
- [9] Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin Jr DK, Calandra TF, Edwards Jr JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48:503–35.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3rd ed. Document M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- [11] Marine M, Serena C, Fernandez-Torres B, Pastor FJ, Guarro J. Activities of flucytosine, fluconazole, amphotericin B, and micafungin in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4757–9.
- [12] Ortoneda M, Capilla J, Pujol I, Pastor FJ, Mayayo E, Fernández-Ballart J, et al. Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:525–9.
- [13] Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, et al. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* 1999;28:1071–9.
- [14] Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003;37:634–43.
- [15] Rubio MC, de Ocaíz IR, Gil J, Benito R, Rezusta A. Potential fungicidal effect of voriconazole against *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:264–7.
- [16] Quindós G, Carrillo-Muñoz AJ, Eraso E, Cantón E, Pemán J. In vitro antifungal activity of voriconazole: new data after the first years of clinical experience. *Rev Iberoam Micol* 2007;24:198–208 [in Spanish].
- [17] Sóczó G, Kardos G, McNicholas PM, Balogh E, Gergely L, Varga I, et al. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time kill test against nine *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1004–9.
- [18] Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekeley A, Hockey H, Troke P. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:511–4.
- [19] Spellberg BJ, Filler SG, Edwards Jr JE. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006;42:244–51.

4.8. Activitat in vitro de la micafungina en combinació amb l'itraconazole envers *Candida* spp.

In vitro activity of micafungin combined with itraconazole against *Candida* spp.

Mariné M, Serena C, Pastor J, Quindós G, Carrillo AJ, Guarro J.
International Journal of Antimicrobial Agents. 2007, 30:463-465.



Short communication

In vitro activity of micafungin combined with itraconazole against *Candida* spp.

Marçal Mariné^a, Carolina Serena^a, Javier Pastor^{a,*}, Guillermo Quindós^b,
A. Javier Carrillo^c, Josep Guarro^a

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

^b Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain

^c Departamento de Microbiología, Asesoría Científica y de Investigación Aplicada, Barcelona, Spain

Received 23 February 2007; accepted 26 June 2007

Abstract

The in vitro activity of the combination micafungin + itraconazole was evaluated against 105 strains of six species of *Candida*. The highest percentage of synergy was obtained against *Candida albicans* (50%) and the lowest against *Candida tropicalis* (0%).

© 2007 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

Keywords: Micafungin; Itraconazole; Synergy; MIC; *Candida*

1. Introduction

Disseminated infections caused by *Candida* spp. are an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients [1]. *Candida albicans* is the most common species, but the incidence of non-*albicans* species has increased in recent years [2]. Amphotericin B (AMB) and fluconazole (FLC) are generally successful for the treatment of *Candida* infections. However, resistance to azoles and polyenes is not rare, especially in non-*albicans* species [3,4]. Micafungin (MFG) is a representative of the echinocandins, a new class of antifungal agents that target the fungal cell wall [5] and that are potent against most species of *Candida*, including those strains resistant to AMB and FLC [6,7]. Itraconazole (ITC) is one of the oldest drugs among the triazoles along with FLC, both having similar in vitro activity against *Candida* spp. Although lack of clinical data prevents ITC being considered a first-line agent for the treatment of disseminated candidiasis, the recent new formulations merit

investigation [4]. Patients with fungal infections are often immunocompromised and/or seriously ill and their critical condition prevents the use of high antifungal doses [8]. Two drugs with different targets should have a greater chance of improved efficacy when administered together. If a synergistic interaction between drugs is achieved, combined therapy may allow a reduction of toxic drug doses and shorten the duration of treatment [9,10].

So far, no in vitro study has been performed on the activity of the combination of ITC and MFG against *Candida* spp. In the present study, such a combination was assessed for synergy against clinically relevant *Candida* spp.

2. Materials and methods

2.1. Organisms

A total of 105 clinical isolates of *Candida* spp. was tested, comprising the following species: *Candida parapsilosis* ($n=25$), *C. albicans* ($n=20$), *Candida krusei* ($n=20$),

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

Table 1

Antifungal activity of itraconazole (ITC), micafungin (MFG) and the combination ITC + MFG against clinical isolates of *Candida* spp.

<i>Candida</i> spp. (no. of isolates)		MIC ($\mu\text{g/mL}$)			No. (%) of interactions in FICI category		
		ITC	MFG	ITC + MFG	Synergy	Indifference	Antagonism
<i>C. parapsilosis</i> (25)	GM	0.16	6.42	0.10/0.36*	3 (12)	22 (88)	0 (0)
	Range	0.06–8	0.25–16	0.06–0.25/0.06–8			
<i>C. albicans</i> (20)	GM	0.80	0.31	0.11*/0.1*	10 (50)	10 (50)	0 (0)
	Range	0.03–8	0.06–16	0.06–0.25/0.06–8			
<i>C. krusei</i> (20)	GM	0.41	1.18	0.26/0.47	3 (15)	17 (85)	0 (0)
	Range	0.12–1	0.25–2	0.12–1/0.03–2			
<i>C. dubliniensis</i> (20)	GM	0.11	0.25	0.1/0.05*	3 (15)	17 (85)	0 (0)
	Range	0.03–8	0.03–0.5	0.03–0.12/0.03–0.12			
<i>C. tropicalis</i> (10)	GM	0.36	0.28	0.29/0.16	0 (0)	10 (100)	0 (0)
	Range	0.03–8	0.12–1	0.06–16/0.06–0.5			
<i>C. lusitaniae</i> (10)	GM	0.15	0.94	0.06/0.31	2 (20)	8 (80)	0 (0)
	Range	0.06–0.5	0.5–2	0.03–0.25/0.06–1			
Total (105)	GM	0.23	0.78	0.13/0.20	21 (20)	84 (80)	0 (0)
	Range	0.03–8	0.03–16	0.03–8/0.03/8			

MIC, minimal inhibitory concentration (defined as the lowest drug concentration that produced a 50% inhibition of visible fungal growth after 48 h of incubation); FICI, fractional inhibitory concentration index; GM, geometric mean.

* P -value <0.05 versus ITC or MFG alone.

Candida dubliniensis ($n=20$), *Candida tropicalis* ($n=10$) and *Candida lusitaniae* ($n=10$). *Candida krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as quality control strains. The isolates were stored lyophilised and were subcultured on Sabouraud dextrose agar at 35°C for 24 h before testing.

2.2. Susceptibility testing

Antifungal agents were obtained as pure powders. ITC (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) was diluted in dimethyl sulfoxide. MFG (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) was diluted in sterile distilled water.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of both drugs, determined according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines for yeasts [11], was defined as the lowest drug concentration that produced a 50% inhibition of visible fungal growth after 48 h of incubation. Drug interactions were assessed by the checkerboard microdilution method [12]. Antifungal agents were placed in rows or columns of trays with concentrations ranging from $0.03\ \mu\text{g/mL}$ to $16\ \mu\text{g/mL}$. The fractional inhibitory concentration index (FICI) was used to classify drug interaction as follows: $\text{FICI} \leq 0.5$, synergistic; $0.5 < \text{FICI} \leq 4$, indifferent; and $\text{FICI} > 4$, antagonistic [13].

2.3. Statistical analysis

MICs were compared using the Mann–Whitney U -test. Calculations were made using Graph Pad 4.00 and SPSS 13.0 for Windows.

3. Results

The susceptibility results for the 105 *Candida* spp. isolates tested are shown in Table 1. Overall, ITC MICs ranged from $0.03\ \mu\text{g/mL}$ to $8\ \mu\text{g/mL}$. The MICs at which 50% and 90% of all the isolates tested were inhibited (MIC_{50} and MIC_{90} , respectively) were $0.25\ \mu\text{g/mL}$ and $4\ \mu\text{g/mL}$. Overall MFG MICs ranged from $0.03\ \mu\text{g/mL}$ to $16\ \mu\text{g/mL}$ ($\text{MIC}_{50} = 0.5\ \mu\text{g/mL}$; $\text{MIC}_{90} = 8\ \mu\text{g/mL}$). When ITC was combined with MFG, there was a significant reduction in the MICs of both drugs against *C. albicans* ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively) and in the MIC of MFG for *C. parapsilosis* ($P < 0.0001$) and *C. dubliniensis* ($P < 0.001$). Overall, synergistic interactions were observed for 20% (21/105) of the isolates, whilst the remaining 80% were indifferent (84/105).

The highest number of synergistic interactions was found against *C. albicans* (50%). For *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* and *C. lusitaniae*, the percentages of synergistic interaction were similar, ranging from 12% to 20%. All interactions against *C. tropicalis* were indifferent (Table 1).

4. Discussion

In general, our results agree with the clinical success of MFG alone and combined with azoles for the treatment of candidaemia [14]. ITC is a broad-spectrum antifungal drug, only available in oral formulation until recently when an intravenous formulation was released. Although few data are yet available, the new formulation appears to be promising for the treatment of a wider range of infections, including systemic

candidiasis [4,8]. In addition, its combination with currently recommended drugs for candidiasis treatment such as MFG might be useful in those infections refractory to monotherapies. Since resistance to azoles in *Candida* spp. is increasing [15] and some strains are multiresistant [16], the use of such combinations might also be useful to avoid or reduce the emergence of antifungal resistance [17].

The high number of synergistic interactions between the two drugs tested here against *C. albicans*, with significant reductions in the MICs, is in contrast to the results of other authors who suggested that the activity of MFG combined with azoles was unimpressive, probably due to the high in vitro activity of this echinocandin against most *Candida* spp. [13,18]. Our study also revealed some synergistic interactions of both drugs against *C. parapsilosis*, which usually shows high MFG MICs [19], and against *C. dubliniensis* with a significant reduction in MFG MICs in the combination. In the case of *C. krusei*, despite both drugs showing low MICs, some synergistic interactions could still be observed.

In a recent study by Karlowsky et al. [9], the combination of anidulafungin, another new echinocandin, and ITC showed a low percentage of synergistic interactions against *Candida* spp. but, similar to our results, no antagonistic interactions were observed for *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* or *C. tropicalis*.

The combination of MFG with ITC may have a potential role in the treatment of *Candida* infections. Further studies using this combination on animal models are warranted.

Funding: Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI050031).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003;37:1172–7.
- [2] Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 2006;43(Suppl. 1):S3–14.
- [3] Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3149–54.
- [4] Spellberg BJ, Filler SG, Edwards Jr JE. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006;42:244–51.
- [5] Debono M. The echinocandins: antifungals targeted to the fungal cell wall. *Expert Opin Investig Drugs* 1994;3:821–9.
- [6] Espinel-Ingroff A. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003;20:121–36.
- [7] Messer SA, Diekema DJ, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Pfaller MA. Activities of micafungin against 315 invasive clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2006;44:324–6.
- [8] Pappas PG, Rex JH, Sobel JD. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 2004;38:161–89.
- [9] Karlowsky JA, Hoban DJ, Zhanel GG, Goldstein BP. In vitro interactions of anidulafungin with azole antifungals, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida* species. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:174–7.
- [10] Roling EE, Klepser EM, Wasson A, Lewis RE, Ernst EJ, Pfaller MA. Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* via time–kill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:13–7.
- [11] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2nd ed. Approved standard M27-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
- [12] Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 3rd ed. Baltimore, MD: The Williams & Wilkins Co.; 1991. p. 432–92.
- [13] Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:693–715.
- [14] Ostrosky-Zeichner L, Kontoyiannis D, Raffalli J. International, open-label, noncomparative, clinical trial of micafungin alone and in combination for treatment of newly diagnosed and refractory candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:654–61.
- [15] Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004;42:1519–27.
- [16] White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1704–13.
- [17] Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:501–17.
- [18] Heyn K, Tredup A, Salvenmoser S, Muller FM. Effect of voriconazole combined with micafungin against *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5157–9.
- [19] Chandrasekar PH, Sobel JD. Micafungin: a new echinocandin. *Clin Infect Dis* 2006;42:1171–8.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

4.9. Teràpia antifúngica combinada en un model murí d'infecció disseminada per *Cladophialophora bantiana*.

Combined antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cladophialophora bantiana*.

Mariné M, Pastor FJ, Guarro J.

Medical Mycology. 2009, 47:45-49.

Combined antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cladophialophora bantiana*

MARÇAL MARINÉ, F. JAVIER PASTOR & JOSEP GUARRO

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

We tested ten day courses of amphotericin B (AMB), micafungin (MFG), voriconazole (VRC), flucytosine (5FC) and posaconazole (PSC) alone and in double or triple combinations in the treatment of disseminated infections caused by *Cladophialophora bantiana* in a murine model. Animals were monitored for survival for 40 days. We found that PSC at 100 mg/kg or 5FC at 180 mg/kg prolonged survival over controls. The combinations PSC+MFG and PSC+5FC improved survival compared to MFG and 5FC alone, but were not superior to PSC alone. The triple combination of PSC+MFG+5FC improved the survival with respect to both the control group and the component monotherapies, but all the animals died during the experiment. When treatment with this triple therapy was extended up to 30 days, half of the animals survived for at least 10 months. Combination therapy with the three drugs (PSC, MFG and 5FC) appears to be a promising option for the treatment of *C. bantiana* infections.

Keywords Phaeohyphomycosis, animal models, posaconazole, micafungin, flucytosine

Introduction

Cladophialophora bantiana is a melanized fungus that causes severe infections mainly in immunocompetent hosts [1,2]. However, up to 40% of cases are reported in patients with predisposing factors, such as a solid organ transplant, steroid therapy or intravenous drug abuse [3]. This fungus is the most frequent cause of central nervous system phaeohyphomycosis, causing the formation of cerebral abscesses and having a high mortality rate [2,4]. There is no agreement as to the therapy of choice and no optimal therapy has been clinically determined [2,4]. These infections are rarely resolved by antifungal treatments alone and require surgical removal of the abscesses [4].

Animal studies suggest that amphotericin B (AMB) and fluconazole have poor activity against *C. bantiana* [5] and only flucytosine (5FC), at high doses, showed

some degree of efficacy [6]. Broad spectrum triazoles, such as itraconazole, and especially posaconazole (PSC) have also shown efficacy in a murine model of cerebral infection caused by *C. bantiana* [7].

Considering the poor clinical outcomes obtained with monotherapy and the scarcity of data on combined therapy for the treatment of *C. bantiana* infections [2,4], we tested different antifungal combinations in a murine model of disseminated infection caused by this fungus. We chose representatives of the different classes of antifungal drugs, with different target sites including 5FC, voriconazole (VRC), PSC and micafungin (MFG). MFG has not been previously tested *in vivo* against *C. bantiana*, but showed the best *in vitro* activity among the echinocandins against this fungus [8].

Materials and methods

A clinical isolate of *C. bantiana* from a cerebral abscess, FMR 8697, was used to challenge immunocompetent male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain), which were handled according the standards approved by the Animal Welfare Committee of the Rovira i Virgili University.

Received 30 April 2008; Final revision received 22 August 2008; Accepted 3 October 2008

Correspondence: Josep Guarro, Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Spain. Tel: +34 977 759359; fax: +34 977 759322; E-mail: josep.guarro@urv.cat

The drugs tested were 5FC (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA), AMB (Fungizona, Squibb Industria Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain), PSC (Noxafil, Schering-Plough Ltd., Hertfordshire U.K.), VRC (Vfend i.v., Pfizer Inc., Madrid, Spain) and MFG (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan). Groups of 10 mice were randomly selected for each treatment and to serve as controls. Mice were challenged with 2×10^6 CFU of *C. bantiana* in 0.2 ml into the lateral tail vein. Preliminary experiments with several strains demonstrated that this concentration as the inoculum suspension successfully produced infections with 100% of animals dying within 20 days of the date of inoculation (data not shown). Three days prior to infection and during all the treatment period, the mice that received VRC were given grapefruit juice (Hero, Spain) instead of water to improve drug exposure [9].

Monotherapy study

The efficacy of the different drugs was evaluated in terms of the prolongation of experimental animals' survival. The different groups received the following treatments: AMB deoxycholate at 1.5 mg/kg of body weight/dose given intraperitoneally once a day [10]; MFG at 10 mg/kg given subcutaneously once a day [11]; 5FC at 180 mg/kg/day given dissolved in the sole source of drinking water [12]; and oral administration of VRC at 40 mg/kg once a day [13] and PSC at 100 mg/kg once a day [14]. Control animals received no treatment. Treatments began 24 h after challenge and lasted for 10 days. Mice were checked daily for 40 days.

Double therapy study

To assess the efficacy of drug combinations, different groups of mice received the following combined therapies: VRC+MFG; PSC+MFG; and PSC+5FC. The drug doses for the combined treatments were the same as used in the monotherapy study. Control animals received no treatment. Treatments began 24 h after challenge and lasted for 10 days. Mice were checked daily for 40 days. The efficacy of these treatments was evaluated in terms of the prolongation of survival and compared with those obtained in the first study.

Triple therapy study

The use of combination therapy of three antifungal drugs with different targets was assessed in the following combinations: VRC+MFG+5FC; and PSC+MFG+5FC. Control animals received no treatment. The efficacy of these treatments was evaluated in terms

of the prolongation of survival and compared with those obtained in the previous studies. Treatments began 24 h after challenge and lasted for 10 days. Mice were checked daily for 40 days. The triple combination of PSC+MFG+5FC treated mice were also evaluated for 30 days and then observed for 10 months.

Statistical analysis

Mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups using the log-rank test. Calculations were made using SPSS 15.0 and Graph pad 4.0 for Windows.

Results

Monotherapy study

Survival rates of mice treated with single agents are shown in Fig. 1. 5FC and PSC improved survival of animals compared to the control group ($P < 0.01$). PSC also prolonged the survival of mice compared to the other monotherapies ($P < 0.01$). However, all the animals died during the experimental period and in an attempt to improve the survival rate we looked at the impact of combination therapy on survival.

Double therapy study

In the combination study we used the same drugs as detailed above with the exception of AMB, since it proved to be the least effective of the drugs tested. The combinations of VRC+MFG, PSC+MFG and PSC+5FC, VRC+MFG significantly improved the survival

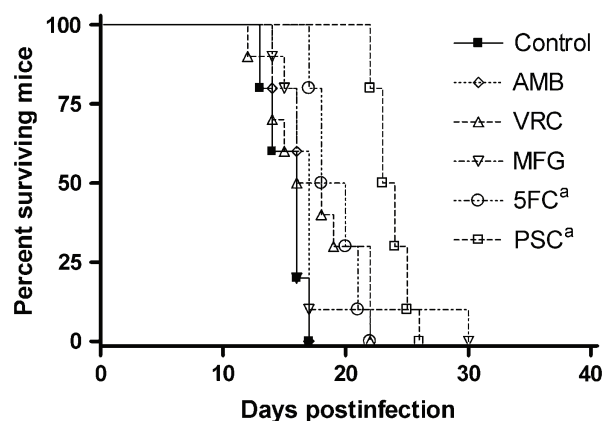


Fig. 1 mortality of mice infected with *Cladophialophora bantiana* FMR 8697. Mice received the following drugs as monotherapies: AMB, amphotericin B deoxycholate; VRC, voriconazole; MFG, micafungin; PSC, posaconazole; 5FC, flucytosine. ^a $P < 0.05$ versus control.

of mice compared to the control group ($P < 0.01$) but not to the monotherapies (Fig. 2). PSC+MFG and PSC+5FC significantly improved survival compared to untreated mice and to either MFG or 5FC alone ($P < 0.01$) but not compared to PSC alone. The efficacy of both combinations was not significantly different ($P > 0.05$). Although the combinations showed significant benefits all animals died during the experiment. To improve the results obtained in the previous studies we tested combinations of three drugs.

Triple therapy study

We tested VRC+MFG+5FC and PSC+MFG+5FC since the three drugs, in each combination, have different cellular targets. The combination VRC+MFG+5FC did not significantly reduce the mortality rate of mice compared to either the double therapies or the monotherapies, whereas the combination PSC+MFG+5FC significantly prolonged the survival of mice compared to the control group ($P < 0.01$) as well as to all the monotherapies ($P < 0.05$) (Fig. 3). However, once again all animals died within the period of observation. In a new study we tried to improve these results by administering the latter combination for 30 days instead the 10-day therapy used in the other studies. This new regimen significantly improved the survival of mice versus the control group and the other the therapies ($P < 0.001$) achieving a 50% survival of the animals for a period of at least 10 months. This study was repeated with similar results being obtained. Fig. 3 shows the combined data of both trials including control groups. Survival of control groups was not statistically different between studies ($P > 0.05$).

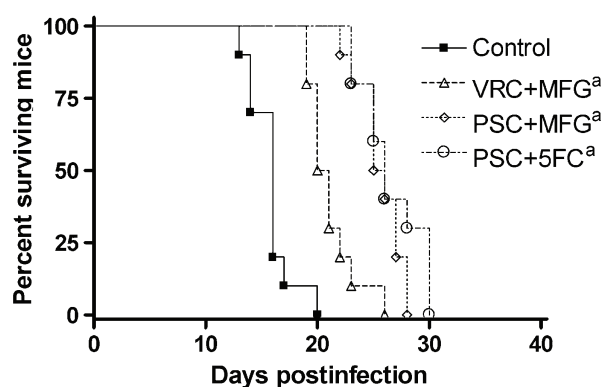


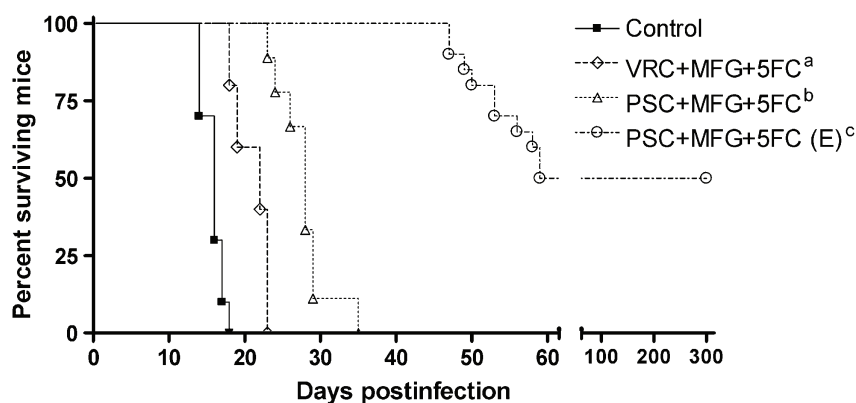
Fig. 2 Cumulative mortality of mice infected with *Cladophialophora bantiana* FMR 8697. Mice received the following drugs as double therapies: VRC+MFG, voriconazole plus micafungin; PSC+MFG, posaconazole plus micafungin; PSC+5FC, posaconazole plus flucytosine. ^a $P < 0.05$ versus control.

Discussion

Although phaeohyphomycosis is a relatively rare fungal infection, its poor response to antifungal drugs makes the improvement of the current therapies an urgent need [4]. In the absence of robust clinical data, animal models can be a predictive source of information on the efficacy of new treatments [15].

Our results agree with those of Block *et al.* [6] and Dixon *et al.* [5] regarding the efficacy of 5FC and the poor activity of AMB in experimental infections due to *C. bantiana*. Although 5FC clears faster in mice, it was administered in our case at doses comparable to those used in clinical settings and did not achieve the survival rates attained in the above cited previous studies, where doses of 400 mg/kg and up to 800 mg/kg of this drug were used. MFG and VRC which had not been previously tested in an experimental model of this infection, performed poorly as monotherapies, but improved the survival of mice when used in combination. The modest results obtained with VRC along with the practical issues of administering 5FC and grapefruit juice discouraged us from testing the combination of VRC+5FC. The lack of improvement obtained with triple therapy in comparison with double combinations including VRC, MFG and 5FC might be attributable to a possible effect of the grapefruit juice on the pharmacokinetics of MFG and/or 5FC. The interactions of grapefruit juice with other drugs that might be administered in combination with VRC in murine models are mostly unknown and merit further investigation. Although no formal studies examining the distribution of PSC in the brain have been performed, experimental data suggest that PSC is able to cross the blood-brain barrier [7,16]. This is of particular interest since the infections caused by *C. bantiana* show marked neurotropism. Furthermore, PSC has been shown to be effective in treating fungal infections of the central nervous system [17]. Our results agree with those obtained by Al-Abdely *et al.* [7], who demonstrated the efficacy of PSC against *C. bantiana*. However, the administration of PSC alone, even at a high dose, did not fully protect the mice as all eventually died from the fungal infection in our murine model. This may be attributable to the fungistatic effect of PSC [7]. Although experimental studies demonstrated only minimal concentrations of MFG in brain [18], data exist that show the activity of this drug when inflammation of brain tissue occurs [19]. The good results obtained by MFG as part of combined therapies against fungi that respond little to echinocandins alone [20], and the good distribution of 5FC in brain tissue

Fig. 3 Cumulative mortality of mice infected with *Cladophialophora bantiana* FMR 8697. Mice received the following drugs as triple therapies: VRC+MFG+5FC, voriconazole plus micafungin plus flucytosine; PSC+MFG+5FC, posaconazole plus micafungin plus flucytosine. (E) The combination of PSC+MFG+5FC was also administered for an extended period of 30 days. ^a $P < 0.05$ versus control. ^b $P < 0.05$ versus control and monotherapies. ^c $P < 0.001$ versus control and the rest of therapies.



[21], makes these two drugs very suitable for combination with PSC against *C. bantiana*.

In our study we observed no deaths or noticeable signs of illness during the administration of the combined therapies that included PSC although mice started to die two weeks after discontinuation of therapy. This problem was partially overcome when the triple therapy with PSC, MFG and 5FC was prolonged up to 30 days, after which all the mice survived longer, and we observed relapse of the infections in only on half of them. It should be noted that *C. bantiana* infections are frequently chronic and consequently require long-term therapy and a prolonged period of observation of animals [7]. Our results suggest that triple therapy is more effective than PSC alone, which does not effectively kill this fungus even after extended treatment.

In conclusion, combined therapies using PSC with MFG and 5FC showed great potential for the development of future effective treatments for *C. bantiana* infections. However, further studies seem necessary to adjust the dosages and treatment durations of the combined therapies in order to improve the results obtained in this study.

Acknowledgements

We thank Dr C. Serena, M. Ruiz and M. Rodríguez for their assistance. This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

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

References

- 1 Dixon DM, Walsh TJ, Merz WG, et al. Infections due to *Xylohypha bantiana* (*Cladospirium trichoides*). *Rev Infect Dis* 1989; **11**: 515–525.
- 2 Kantarcioglu AS, de Hoog GS. Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of cases presented between 1999 and 2004. *Mycoses* 2004; **47**: 4–13.
- 3 Chakrabarti A. Epidemiology of central nervous system mycoses. *Neurol India* 2007; **55**: 191–197.
- 4 Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 206–216.
- 5 Dixon DM, Polak A. *In vitro* and *in vivo* drug studies with three agents of central nervous system phaeohyphomycosis. *Chemotherapy* 1987; **33**: 129–140.
- 6 Block ER, Jennings AE, Bennett JE. Experimental therapy of cladosporiosis and sporotrichosis with 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; **3**: 95–98.
- 7 Al-Abdely HM, Najvar LK, Bocanegra R, et al. Antifungal therapy of experimental cerebral phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1701–1707.
- 8 Espinel-Ingroff A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; **20**: 121–136.
- 9 Sugar AM, Liu XP. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 601–604.
- 10 Ortoneda M, Capilla J, Pujol I, et al. Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 525–529.
- 11 Luque JC, Clemons KV, Stevens DA. Efficacy of micafungin alone or in combination against systemic murine aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1452–1455.
- 12 Graybill JR. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resist Update* 2000; **3**: 364–383.
- 13 Serena C, Pastor FJ, Mariné M, et al. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 162–165.

- 14 Dannaoui E, Meis JF, Loebenberg D, Verweij PE. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3647–3650.
- 15 Clemons KV, Stevens DA. Animal models testing monotherapy versus combination antifungal therapy: lessons learned and future directions. *Curr Opin Infect Dis* 2006; **19**: 360–364.
- 16 Imai JK, Singh G, Clemons KV, *et al.* Efficacy of posaconazole in a murine model of central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4063–4066.
- 17 Pitisuttithum P, Negróni R, Graybill JR, *et al.* Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 745–755.
- 18 Joseph JM, Jain R, Danziger LH. Micafungin: a new echinocandin antifungal. *Pharmacotherapy* 2007; **27**: 53–67.
- 19 Petraitis V, Petraitiene R, Groll AH, *et al.* Comparative antifungal activities and plasma pharmacokinetics of micafungin (FK463) against disseminated candidiasis and invasive pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1857–1869.
- 20 Guembe M, Guinea J, Peláez T, *et al.* Synergistic effect of posaconazole and caspofungin against clinical zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3457–3458.
- 21 Catalán M, Montejo JC. Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Rev Iberoam Micol* 2006; **23**: 39–49.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

5. Discussió

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

5.1. Candida glabrata. Teràpies simples i combinades

Les infeccions disseminades per *C. glabrata* acostumen a donar-se en pacients en estat crític, de manera que el tractament d'elecció, a més de ser efectiu, ha de produir un impacte mínim sobre el pacient. En aquest sentit dos dels antifúngics tradicionals per al tractament de candidiasis invasives manifesten certes mancances: l'amfotericina B presenta una elevada toxicitat i per al fluconazole s'han demostrat certs problemes de resistències en un nombre significatiu de soques de *C. glabrata*.

Com s'ha esmentat anteriorment, la utilització de models animals es molt útil per esbrinar, en unes condicions controlades, la possible eficàcia dels agents antifúngics (Graybill, 2000). Però, malgrat això les dades obtingudes en models experimentals d'infeccions disseminades per *C. glabrata* són escassos, i a causa de la limitada capacitat de *C. glabrata* de produir infeccions letals en animals (Arendrup *et al.*, 2002), en pocs casos s'inclou l'avaluació de la supervivència.

Tot això, afegit a les discrepàncies entre els resultats obtinguts en estudis anteriors, justifica la realització de l'estudi *in vivo* sobre l'eficàcia de diferents antifúngics envers *C. glabrata*, inclòs a la present tesi. Per tal de desenvolupar un model animal amb una mortalitat elevada, i de manera similar als resultats obtinguts per Atkinson *et al.* (1995), al nostre estudi varem haver d'utilitzar inòculs molt elevats, de l'ordre d'almenys 10^9 UFC/ml per a totes les soques utilitzades. En aquest estudi es varen incloure els antifúngics tradicionals com l'amfotericina B, el fluconazole i la flucitosina, per tal de comparar la seva efectivitat amb la micafungina, que com els altres membres del grup de les equinocandines presenta una molt bona activitat envers *Candida* spp. i pocs problemes de toxicitat.

Mitjançant l'assaig de tres soques sensibles *in vitro* a l'amfotericina B, el fluconazole, la micafungina i la flucitosina, varem demostrar que no hi ha diferències importants en l'eficàcia d'aquests quatre antifúngics per al tractament d'una infecció disseminada per *C. glabrata* en ratolins. Malgrat que tots van mostrar cert grau d'eficàcia a l'hora de reduir la càrrega fúngica en òrgans, destacant l'amfotericina B, i, amb excepció de la flucitosina, de millorar la supervivència dels animals, cap dels fàrmacs utilitzats va ser capaç de resoldre completament la infecció. Aquests resultats es van publicar a la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49: 4757-4759.

Discussió

La teràpia combinada podria ser una alternativa terapèutica a l'hora de tractar infeccions disseminades per *Candida*, ja que permetria una reducció de les dosis dels antifúngics utilitzats, així com escurçar la durada dels tractaments, però fins ara aquesta opció ha estat poc explorada (Lewis i Kontoyiannis, 2001).

Les limitacions dels tractaments actuals abans esmentades, fan de la combinació d'antifúngics una aproximació terapèutica molt atractiva per als casos de candidèmia per *C. glabrata*. Per aquest motiu, i un cop vistos els modestos resultats obtinguts amb les monoteràpies, es va considerar interessant l'estudi de teràpies combinades utilitzant el mateix model animal d'infecció disseminada per *C. glabrata*.

Al nostre estudi, la combinació de micafungina o d'amfotericina B amb el fluconazole no van aconseguir millorar els resultats obtinguts amb les seves respectives monoteràpies. La combinació d'amfotericina B i micafungina, però, va aconseguir millorar de manera important la supervivència dels animals, així com reduir la càrrega fúngica de manera significativa respecte als tractaments simples en ambdós òrgans diana. En estudis anteriors al nostre ja s'havia observat l'eficàcia de la combinació d'amfotericina B amb les equinocandines, tant amb la caspofungina (Barchiesi *et al.*, 2005) com amb la caspofungina o la micafungina (Olson *et al.*, 2005) en models animals d'infecció disseminada per *C. glabrata*. A l'estudi d'Olson *et al.*, però, es varen utilitzar altes dosis d'amfotericina B liposòmica, una formulació d'aquest fàrmac que permet administrar-lo a dosis més elevades, però la utilització del qual està en certa manera limitada pels seus elevats costos de producció. Al nostre estudi es varen observar uns resultats similars amb la micafungina combinada amb dosis baixes d'amfotericina B desoxicolat. Aquests resultats impliquen una possible utilització més segura de la formulació tradicional de l'amfotericina B, pel tractament d'infeccions disseminades per *C. glabrata*, en el cas de ser confirmats en posterior estudis clínics. Els resultats d'aquest estudi van ser publicats a la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 58: 1295–1298.

5.2. *Candida krusei*. Voriconazole i posaconazole: comparativa

Els antifúngics recomanats actualment per al tractament de candidiasis invasives per *Candida krusei* inclouen l'amfotericina B, les equinocandines i el voriconazole (Pappas *et al.*, 2009). Tot i les seves similituds amb el voriconazole, el posaconazole no compta amb un recull prou gran de dades *in vivo*, i encara no està recomanat pel

tractament primari d'aquest tipus d'infeccions. Aquest és un fàrmac d'aparició recent, de manera que l'obtenció d'un major nombre de dades relatives a la seva eficàcia experimental i en clínica es fa molt necessària, per tal de definir-ne les seves aplicacions.

En estudis recents s'ha definit l'activitat fungicida del posaconazole sobre *C. krusei* (Sóczó *et al.*, 2007), mentre que pel voriconazole s'han obtingut resultats contradictoris pel que fa a l'activitat fungicida sobre aquesta espècie (Espinel-Ingroff *et al.*, 2002; Pfaller *et al.*, 2004b). Es pot especular que aquesta diferència de comportament *in vitro* podria estar relacionada amb una possible diferència en la seva activitat *in vivo*. A la present tesi s'ha inclòs un estudi comparatiu de l'eficàcia del posaconazole i el voriconazole en un model animal d'infecció disseminada per *C. krusei*.

Com en el cas de *C. glabrata*, *C. krusei* té una capacitat molt limitada de produir infeccions en ratolins, de manera que per poder desenvolupar un model animal d'infecció disseminada, va ser necessària la utilització d'inòculs molt alts i una pauta d'immunosupressió molt severa. Al nostre estudi, tot i que el posaconazole va demostrar una activitat fungicida superior al voriconazole *in vitro*, l'eficàcia d'ambdós azoles va ser similar a l'hora de millorar la supervivència dels animals i reduir la càrrega fúngica als òrgans diana. Aquests resultats han estat publicats a la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53: 3585–3588.

5.3. *Candida dubliniensis*. Equinocandines: *in vitro* i *in vivo*

L'efecte de creixement paradoxal en proves de sensibilitat *in vitro* als antifúngics es defineix com una reducció de l'activitat del fàrmac que s'està provant, quan aquest s'aplica a altes concentracions, per sobre de les CMIs, obtenint una reducció del creixement a concentracions intermèdies i un creixement més important a concentracions més elevades. Una altra alteració en el creixement *in vitro* que s'observa en aquestes proves, conegut per l'anglicisme *trailing effect*, és l'aparició d'un creixement reduït però constant del fong a partir de certa concentració de l'antifúngic que s'està provant, i que no disminueix a mesura que augmenta aquesta concentració. Ambdós efectes han estat descrits en proves de sensibilitat *in vitro*, amb *C. dubliniensis* en presència d'equinocandines per a una proporció elevada de les soques estudiades (Fleischhacker *et al.*, 2008; Jacobsen *et al.*, 2007).

Discussió

L'espècie *C. dubliniensis* es molt semblant a *Candida albicans* i es va descriure fa relativament poc. Actualment, les dades clíniques i experimentals específiques de que es disposa per aquesta espècie són escasses, especialment pel que fa a l'efectivitat d'un grup tan nou d'antifúngics com són les equinocandines. *C. dubliniensis*, en general, no es considera resistent a les equinocandines, i fins avui només s'ha descrit un cas d'una possible recaiguda en una infecció causada per aquesta espècie i tractada amb caspofungina (van Hal *et al.*, 2008). Tot i això, si tenim en compte les dades de que es disposa sobre el seu comportament *in vitro*, sembla necessari obtenir més dades experimentals sobre l'activitat d'aquest grup d'antifúngics sobre *C. dubliniensis*.

En un estudi inclòs també en aquesta tesi, s'ha observat el comportament *in vitro* de diverses soques de *C. dubliniensis* exposades a l'anidulafungina, caspofungina o micafungina i s'ha mirat d'esbrinar si existeix una relació entre la presència de creixements anòmals i una reducció de l'eficàcia *in vivo* d'aquests antifúngics, en un model animal d'infecció disseminada en ratolins. A diferència dels resultats obtinguts en altres estudis on es van observar creixements paradoxals en presència de caspofungina i micafungina per la majoria de soques de *C. dubliniensis* (Jacobsen *et al.*, 2007; Fleischhacker *et al.*, 2008), al nostre estudi aquest efecte es va observar principalment en presència d'anidulafungina i caspofungina i només en una de les soques assajades per la micafungina.

C. dubliniensis, a diferència de *C. krusei* o *C. glabrata*, presenta una major virulència en ratolins, cosa que ens va permetre desenvolupar un model d'infecció disseminada en animals immunocompetents, que es va desenvolupar conjuntament amb un model d'infecció en ratolins immunocompromesos. En general, al nostre estudi, les tres equinocandines van ser efectives a l'hora de reduir la mortalitat dels ratolins i la càrrega fúngica als ronyons i la melsa d'aquests. La caspofungina però, va demostrar ser igual d'efectiva reduint la càrrega fúngica als ronyons a dosis més baixes que les altres dues equinocandines, en el cas del model amb ratolins immunocompetents. Al model amb ratolins immunodeprimits, la caspofungina també va ser més eficaç que la resta, emprant les mateixes dosis per als tres antifúngics. Aquests resultats es poden explicar per les característiques farmacodinàmiques particulars de la caspofungina, que la diferencien de les altres dues equinocandines (Hajdu *et al.*, 1997; Andes *et al.*, 2008a, 2008b).

La presència de creixements paradoxals als assajos *in vitro* no es va poder relacionar amb una menor efectivitat d'aquest grup d'antifúngics a l'hora de millorar la supervivència i reduir la càrrega fúngica dels òrgans diana en ratolins infectats amb *C. dubliniensis*, coincidint amb les CMI's que van ser baixes i similars per totes les soques assajades i per les tres equinocandines. Els resultats d'aquest estudi es recullen en un article que ha estat acceptat per a la seva publicació a la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; doi:10.1128/AAC.00980-09.

5.4. *Candida tropicalis*. Eficàcia del posaconazole

Candida tropicalis és la tercera o quarta espècie de *Candida* més freqüentment aïllada en clínica (Hajjeh *et al.*, 2004, Pfaller *et al.*, 2007a). Aquesta espècie ha demostrat ser especialment virulenta en pacients neutropènics (Pappas *et al.*, 2009), produint una elevada taxa de mortalitat. La virulència de *C. tropicalis* s'ha demostrat també en models animals, essent un dels pocs membres del gènere *Candida* capaç de produir infeccions letals en els ratolins immunocompetents (Arendrup *et al.*, 2002).

Les equinocandines, l'amfotericina B i el fluconazole són els principals tractaments recomanats per a les candidiàsis invasives. Les teràpies empíriques d'elecció acostumen a ser l'amfotericina B i les equinocandines, que presenten pocs problemes de resistències. Un cop fets els tests *in vitro* i si no es detecta resistència al fluconazole, es pot canviar el tractament a aquest fàrmac per tal de reduir els costos o la toxicitat de la teràpia (Spanakis *et al.*, 2006).

Els nous triazoles, el voriconazole i el posaconazole, presenten una millor activitat envers *Candida* i és menys probable que presentin problemes de resistència que el fluconazole. Durant els darrers anys s'ha estat determinant el paper d'aquests dos nous antifúngics per al tractament de la candidiàsi. En el cas del voriconazole, s'ha demostrat en estudis clínics, que és tan eficaç com l'administració seqüencial d'amfotericina B i fluconazole per al tractament d'infeccions causades per les espècies més habituals de *Candida* (Kullberg *et al.*, 2005). Als mateixos assajos clínics, l'eficàcia del voriconazole va ser fins i tot superior en el cas d'infeccions causades per *C. tropicalis* (Kullberg *et al.*, 2005). Les similituds existents amb el voriconazole, fan del posaconazole un candidat obvi per augmentar les opcions terapèutiques per al tractament de les candidiàsis invasives, però encara fan falta més dades experimentals que ho corroborin.

Discussió

Per tal d'esbrinar les possibles aplicacions d'aquest fàrmac per al tractament de les infeccions causades per *Candida*, s'ha realitzat un estudi, inclòs en aquesta tesi, per comprovar l'eficàcia del posaconazole en un model experimental d'infecció disseminada per *C. tropicalis*.

Amb la finalitat d'identificar soques amb diferents patrons de sensibilitat al posaconazole, es varen realitzar assajos *in vitro* amb 17 soques de *C. tropicalis*. Coincidint amb els resultats obtinguts en altres estudis *in vitro* (Espinell-Ingroff *et al.*, 2005), la majoria de soques del nostre estudi varen presentar unes CMI's baixes per al posaconazole, amb un l'única excepció d'una soca amb una CMI superior a 16 µg/ml. També es va poder observar un efecte de *trailing* per a 16 de les 17 soques estudiades, acompanyat per unes CMF's elevades; aquest efecte ja havia estat documentat prèviament per altres azoles com el fluconazole i l'itraconazole (Arthington-Skaggs *et al.*, 2002).

En el nostre model animal, el posaconazole va demostrar ser efectiu en el tractament de la infecció disseminada per *C. tropicalis* per a totes les soques estudiades amb l'excepció de la soca que va mostrar una alta CMI per aquest fàrmac. La manca d'activitat fungicida del posaconazole envers *C. tropicalis* ha estat descrita prèviament (Sóczó *et al.*, 2007), però malgrat les altes CMF's observades per a la majoria de les soques assajades al nostre estudi (>16 µg/ml), el posaconazole, en general, va ser efectiu a l'hora de millorar la supervivència i reduir la càrrega fúngica dels ratolins infectats.

Els nostres resultats indiquen que la manca d'activitat fungicida del posaconazole observada per moltes soques de *C. tropicalis* no és predictiva d'una menor l'eficàcia d'aquest fàrmac *in vivo*, i que només una elevada CMI pot indicar una possible reducció de l'efectivitat del posaconazole envers *C. tropicalis*. Els resultats d'aquest estudi es recullen en un article que ha estat enviat a la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* i es troba en procés de revisió per a la seva publicació.

5.5. Noves formulacions d'amfotericina B

L'amfotericina B ha estat el fàrmac d'elecció per al tractament d'un ampli ventall d'infeccions fúngiques des dels anys 50. Aquest fàrmac té un ampli espectre antifúngic i quasi no ha presentat resistències al llarg del temps. El principal inconvenient de la

utilització de l'amfotericina B és la seva nefrotoxicitat, que limita força les seves aplicacions. Per tal de pal·liar els seus efectes adversos s'han desenvolupat diferents formulacions tals com emulsions lipídiques (Walsh *et al.*, 1998) o inclosa en liposomes (Hiemenz *et al.*, 1996), entre d'altres menys emprades com en forma de nanopartícules (Kayser *et al.*, 2003) o sotmeses a tractaments tèrmics (Kwong *et al.*, 2001). Actualment, les formulacions lipídiques són acceptades com una alternativa menys tòxica a la tradicional solució en desoxicolat. Tanmateix, els elevats costos de producció d'aquestes noves formulacions també en limiten el seu ús.

Durant els últims anys s'han seguit desenvolupat noves formulacions d'amfotericina B menys tòxiques, per exemple canviant-ne el seu estat d'agregació (Sanchez-Brunete *et al.*, 2004b) o incloent-la en microesferes d'albúmina (Torrado *et al.*, 2005). Aquests dos mètodes, a més de mitigar els efectes tòxics de l'amfotericina B, presenten uns costos de producció molt reduïts.

Com ja s'ha esmentat anteriorment *C. glabrata* i *C. tropicalis* són dues de les espècies de *Candida* que causen infeccions en humans de manera més freqüent (Pfaller *et al.*, 2007a), per les quals l'amfotericina B, juntament amb azoles i equinocandines, continua essent un dels tractaments recomanats. Pel que fa a l'eficàcia de l'amfotericina B en comparació amb les altres opcions terapèutiques, diversos estudis *in vitro* han demostrat que una proporció important de soques d'aquestes dues espècies presenten CMI i CMF més altes per als azoles, que la majoria d'espècies del gènere (Rubio *et al.* 2005, Pfaller *et al.* 2007b, Soczó *et al.* 2007). I d'altra banda, pel que fa a les equinocandines, a l'estudi comparatiu sobre l'eficàcia de diferents antifúngics envers *C. glabrata*, inclòs en aquesta tesi, es va observar una eficàcia lleugerament superior de l'amfotericina B respecte a la micafungina.

Tenint en compte aquestes dades, es va considerar interessant avaluar l'eficàcia de les dues noves formulacions d'amfotericina B, poliagregats i microesferes d'albúmina, en models animals d'infecció disseminada per *C. glabrata* i *C. tropicalis*. La formulació dels poliagregats es va assajar envers tres soques de *C. glabrata* i la de les microesferes envers dues soques de *C. glabrata* i una de *C. tropicalis*.

Ambdues formulacions van aconseguir millorar la supervivència dels ratolins infectats de manera similar a dues de les formulacions comercials de l'amfotericina B

Discussió

(desoxicolat i liposòmica). Pel que fa a la reducció de la càrrega fúngica en òrgans, les noves formulacions van demostrar una eficàcia lleugerament inferior a la de les formulacions comercials, per la majoria de soques assajades.

Tot i que els resultats obtinguts no permeten considerar-les més efectives, el fet que les noves formulacions es puguin administrar a dosis similars a l'amfotericina B liposòmica, i fins i tot a dosis més elevades en el cas de les microesferes, sense mostrar problemes de toxicitat (Sánchez-Brunete *et al.*, 2004a) i obtenint un resultat comparable als obtinguts amb les dues formulacions comercials, ens permet considerar els poliagregats i les microesferes d'amfotericina B, dues opcions viables a l'hora de desenvolupar futurs tractaments per les candidiasis disseminades. Els resultats de l'estudi realitzat amb els poliagregats d'amfotericina B van ser publicats a la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61:880-883. Els resultats obtinguts amb la formulació de microesferes d'albúmina han estat recollits en un article que ha estat acceptat per a la seva publicació a la revista *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.07.005.

5.6. Itraconazole i micafungina: interaccions *in vitro* envers *Candida* spp.

Fins ara, l'ús de l'itraconazole no ha tingut un paper important en el tractament de les candidiasis invasives, com tampoc l'han tingut les combinacions d'antifúngics, que no han estat gaire estudiades. L'aparició d'un nou grup d'antifúngics amb poca toxicitat i una diana d'acció completament diferent com són les equinocandines, obre un nou ventall de possibilitats per l'aplicació de teràpies combinades, fins i tot amb fàrmacs més antics com per exemple l'itraconazole. Atès l'increment de soques de *Candida* spp. resistents als azoles que s'ha observat durant els últims anys (Hajjeh *et al.*, 2004), i que algunes d'elles multiresistents (White *et al.*, 2002), l'ús d'aquestes combinacions pot ser útil per evitar o reduir l'aparició de més soques resistents als antifúngics (Ghannoum *et al.*, 1999).

Tenint en compte que no existeixen estudis previs sobre l'activitat de la combinació de la micafungina amb l'itraconazole envers *Candida* spp., es va considerar interessant realitzar un estudi sobre l'activitat d'aquests dos antifúngics en combinació envers 105 soques de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*.

L'elevat nombre d'interaccions sinèrgiques dels dos fàrmacs assajats observades al nostre estudi envers *C. albicans*, contrasta amb els resultats d'altres autors, que indiquen una activitat limitada de la combinació de la micafungina amb els azoles, probablement a causa de la bona activitat *in vitro* d'aquesta equinocandina sola envers la majoria d'espècies de *Candida* (Johnson *et al.*, 2004; Heyn *et al.*, 2005).

El nostre estudi també va revelar algunes interaccions sinèrgiques d'ambdós fàrmacs davant de *C. parapsilosis*, que generalment mostra unes CMI's elevades per micafungina (Chandrasekar *et al.*, 2006), i també envers *C. dubliniensis*, amb una reducció significativa de la CMI de la micafungina en combinació. No es va observar cap interacció antagonista entre la micafungina i l'itraconazole per cap de les soques assajades. Els resultats d'aquest estudi varen ser publicats a la revista International Journal of Antimicrobial Agents 2007; 30:463-465.

5.7. *Cladophialophora bantiana*. Teràpia combinada

Encara que la feohifomicosi és un tipus d'infecció relativament rara, la seva pobra resposta als tractaments antifúngics fa de la millora de les teràpies actuals, una necessitat imperativa (Revankar *et al.*, 2004). Tenint en compte la manca de dades clíniques, també aquí els models animals poden ser una font d'informació predictiva sobre l'eficàcia de nous tractaments (Clemons i Stevens, 2006).

Per determinar l'eficàcia de diversos antifúngics i de les combinacions d'aquests envers *Cladophialophora bantiana*, es varen realitzar estudis, també inclosos a la present tesi, en un model animal d'infecció disseminada causada per aquesta espècie.

Coincidint amb estudis anteriors, els resultats obtinguts amb el nostre model animal van demostrar la poca eficàcia de l'amfotericina B (Dixon *et al.*, 1987) i la modesta activitat de la flucitosina aplicada a altes dosis (Block *et al.*, 1973; Dixon *et al.*, 1987) a l'hora de millorar la supervivència dels ratolins infectats amb *C. bantiana*. Al nostre estudi, tant el voriconazole com la micafungina van ser incapaços d'augmentar significativament la supervivència dels animals. Pel que fa al posaconazole, els nostres resultats coincideixen amb els obtinguts per Al-Abdely *et al.* (2005), que van demostrar l'eficàcia d'aquest antifúngic a l'hora de tractar aquest tipus d'infeccions en un model experimental. Malgrat això l'administració de posaconazole, fins i tot a dosis elevades, no va ser capaç de protegir els ratolins per si sola.

Discussió

Les dades experimentals de que es disposa sobre l'activitat del posaconazole envers les infeccions que afecten el sistema nerviós central, indiquen que és capaç de travessar la barrera hemato-encefàlica (Al-Abdely *et al.*, 2005; Imai *et al.*, 2006), fent d'aquest fàrmac una opció interessant per al tractament d'infeccions causades per *C. bantiana*. A l'hora d'escollir els fàrmacs mes adequats per assajar teràpies combinades amb el posaconazole es varen tenir en compte la flucitosina, per la seva activitat envers aquesta espècie i per la bona distribució al sistema nerviós central que presenta. Tot i la seva escassa eficàcia *in vivo* administrada sola, la micafungina també es va incloure a les teràpies combinades assajades, ja que té certa activitat *in vitro* envers *C. bantiana* (Espinell-Ingroff, 2003) i presenta un mecanisme d'acció, diferent al del posaconazole i la flucitosina, que la converteixen en una bona candidata per a ser administrada en combinació. El voriconazole, per la seves similituds amb el posaconazole, també es va incloure als assajos de teràpies combinades.

L'administració del voriconazole en combinació amb la micafungina o en triple combinació amb aquesta i la flucitosina va augmentar significativament el temps de supervivència dels animals respecte el control, però no en comparació amb les seves respectives monoteràpies.

Al nostre estudi, l'administració de posaconazole en combinació amb la micafungina o la flucitosina va permetre prolongar la supervivència dels animals de manera significativa però no més que el posaconazole sol. La triple combinació d'aquests antifúngics, però, va ser capaç de prolongar la supervivència de manera significativa, fins i tot respecte a les monoteràpies. Tot i això, cap d'aquests tractaments va ser capaç de resoldre la infecció i es va optar per augmentar la durada de la teràpia combinada de posaconazole, micafungina i flucitosina. L'administració d'aquests tres antifúngics de manera conjunta durant 30 dies va permetre reduir a la meitat la mortalitat total dels ratolins. Els resultats d'aquest estudi van ser publicats a la revista *Medical Mycology* 2009; 47:45-49.

6. Conclusions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

6.1. Hem desenvolupat un model d'infecció disseminada per *Candida glabrata* en ratolins immunocompromesos, per tal d'avaluar l'eficàcia de nous tractaments antifúngics.

- Utilitzant aquest model, la micafungina, el fluconazole, l'amfotericina B i la flucitosina han demostrat una eficàcia similar.
- L'administració combinada de micafungina i amfotericina B ha demostrat una gran eficàcia en aquest model experimental i podria constituir una alternativa factible als tractaments actuals per a les infeccions disseminades causades per *C. glabrata*.

6.2. Hem desenvolupat un model d'infecció disseminada per *Candida krusei* en ratolins immunocompromesos, per tal d'avaluar l'eficàcia de nous triazoles, com el voriconazole i el posaconazole.

- En aquest model, tant el voriconazole com el posaconazole han demostrat una eficàcia similar a la de l'amfotericina B.
- L'ús del posaconazole podria esdevenir, en un futur, una teràpia alternativa a les actualment recomanades per al tractament d'infeccions disseminades per *C. krusei*.

6.3. S'ha avaluat l'activitat *in vitro* de l'anidulafungina, la caspofungina i la micafungina, envers *Candida dubliniensis* i s'ha desenvolupat un model d'infecció disseminada per *C. dubliniensis*, tant en ratolins immunocompetents com immunocompromesos, per tal d'avaluar-ne l'eficàcia *in vivo*.

- S'ha observat un creixement paradoxal per la majoria de soques en presència de caspofungina i anidulafungina, però només per una soca en presència de micafungina.
- Les tres equinocandines han demostrat ser efectives reduint la càrrega fúngica als òrgans dels ratolins immunocompetents així com de reduir tant la mortalitat

Conclusions

com la presència de cèl·lules fúngiques als òrgans diana dels ratolins immunocompromesos.

- Les dades obtingudes no permeten relacionar l'aparició d'efectes paradoxals de creixement *in vitro*, amb una reducció de l'efectivitat *in vivo* envers *C. dubliniensis* per les equinocandines.

6.4. Hem avaluat l'activitat *in vitro* i l'eficàcia *in vivo* del posaconazole envers diverses soques de *C. tropicalis*.

- El posaconazole ha estat efectiu a l'hora de millorar la supervivència i reduir la càrrega fúngica en òrgans per la majoria de les soques assajades.
- En un futur, el posaconazole podria constituir una alternativa eficaç als tractaments actuals per a infeccions disseminades per *C. tropicalis*.

6.5. Hem avaluat l'efectivitat *in vivo* de dues noves formulacions d'amfotericina B, envers tres soques de *Candida glabrata* i una de *C. tropicalis*, en un model animal d'infecció disseminada.

- La nova formulació de poliagregats d'amfotericina B ha demostrat una eficàcia similar a la de dues de les formulacions comercials més usades, en un model experimental d'infecció disseminada per *C. glabrata* i constitueix una prometedora opció a tenir en compte a l'hora de desenvolupar nous tractaments per a les candidiasis.
- La nova formulació de microesferes d'amfotericina B ha demostrat una eficàcia similar a la de dues de les formulacions comercials més usades, en dos models experimentals d'infecció disseminada per *C. glabrata* i per *C. tropicalis*.
- Els bons resultats obtinguts i el seu cost de producció reduït, fa d'aquestes noves formulacions un opció mereixedora de nous estudis per tal de determinar el seu paper en el desenvolupament de nous tractaments envers les infeccions causades per *Candida* spp.

6.6. Hem avaluat l'activitat *in vitro* de la micafungina i l'itraconazole, així com la interacció d'ambdós fàrmacs envers sis espècies del gènere *Candida*.

- La combinació de micafungina i itraconazole ha demostrat una bona activitat *in vitro* envers *Candida albicans*, interactuant de manera sinèrgica davant de la meitat de soques assajades d'aquesta espècie.
- No s'ha observat un comportament antagonista de la micafungina i l'itraconazole envers cap de les espècies de *Candida* assajades.

6.7. S'ha desenvolupat un model d'infecció disseminada per *Cladophialophora bantiana* en ratolins immunocompetents, per tal d'avaluar l'eficàcia de nous tractaments antifúngics.

- ➡ De tots el antifúngics que han estat administrats com a monoteràpies, només el posaconazole i la flucitosina han estat capaços de millorar el temps de supervivència dels animals infectats amb *C. bantiana*.
- ➡ La triple combinació de posaconazole, micafungina i flucitosina ha millorat de manera notable el temps de supervivència de dels animals infectats amb *C. bantiana*.
- ➡ La teràpia combinada amb posaconazole, micafungina i flucitosina ha demostrat tenir un gran potencial, per tal de desenvolupar, en un futur, teràpies efectives per al tractament d'infeccions causades per *C. bantiana*.

Conclusions

7. Bibliografia

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL DE NOUS TRACTAMENTS ANTIFÚNGICS PER INFECCIONS CAUSADES PER LLEVATS

Marçal Mariné Mestres

ISBN:978-84-693-4593-1/DL:T.1006-2010

Ajello L, Georg LK, Steigbigel RT, Wang CJK. 1974. A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. *Mycologia* **66**:490-498.

Ajello L, Hay RJ. 1997. Medical Mycology. A: Ajello L, Sussman M, Balows A, Collier L (eds.): Topley & Wilson's Microbiology and Infectious Infections. 9th Edition, Arnold London, vol. 4.

Al-Abdely HM, Najvar LK, Bocanegra R, Graybill JR. 2005. Antifungal therapy of experimental cerebral phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1701-1707.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Kingdom fungi: introduction to fungi and their significance to humans. A: Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (eds.): *Introductory Mycology*. 4th ed. Wiley J and Sons, Inc., New York, 1-25.

Al Mosaid A, Sullivan DJ, Polacheck I, Shaheen FA, Soliman O, Al Hedaithy S, Al Thawad S, Kabadaya M, Coleman DC. 2005. Novel 5-flucytosine-resistant clade of *Candida dubliniensis* from Saudi Arabia and Egypt identified by Cd25 fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4026-4036.

Andes DR, Diekema DJ, Pfaller MA, Marchillo K, Bohrmueller J. 2008a. In vivo pharmacodynamic target investigation for micafungin against *Candida albicans* and *C. glabrata* in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3497-3503.

Andes DR, Diekema DJ, Pfaller MA, Prince RA, Marchillo K, Ashbeck J, Hou J. 2008b. In vivo pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:539-550.

Arendrup M, Horn T, Frimodt-Moller N. 2002. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* **30**:286-291.

Arendrup MC, Denning DW, Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH. 2007. Does one voriconazole breakpoint suit all *Candida* species? *J Clin Microbiol* **45**:2093-2094.

Bibliografia

Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW. 2002. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2477–2481.

Atkinson BA, Bouthet C, Bocanegra R, Correa A, Luther MF, Graybill JR. 1995. Comparison of fluconazole, amphotericin B and flucytosine in treatment of a murine model of disseminated infection with *Candida glabrata* in immunocompromised mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:631-640.

Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Arzeni D, Giannini D, Scalise G. 2005. Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4989-4992.

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

Blackwell M. 2000. Terrestrial Life - Fungal from the Start? *Science* **289**:1884-1885.

Bedini A, Venturelli C, Mussini C, Guaraldi G, Codeluppi M, Borghi V, Rumpianesi F, Barchiesi F, Esposito R. 2006. Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:75-80.

Block ER, Jennings AE, Bennett JE. 1973. Experimental therapy of cladosporiosis and sporotrichosis with 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**:95-98.

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

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The fungi as a major group of organisms. A: The fungi. 2nd ed. Academic Press, London, 1-9.

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

Carrillo-Muñoz AJ, Quindos G, Ruesga M, Alonso R, del Valle O, Hernandez-Molina JM, McNicholas P, Loebenberg D, Santos P. 2005. Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and amphotericin B against yeasts from oropharyngeal candidiasis and other infections. J. Antimicrob. Chemother. **55**:317-319.

Casadevall A, Pirofski L. 2001. Host-pathogen interactions: The attributes of virulence. J. Infect. Dis. **184**:337-344.

Chandrasekar PH, Sobel JD. 2006. Micafungin: a new echinocandin. Clin. Infect. Dis. **42**:1171-1178.

Clancy CJ, Wingard JR, Hong-Nguyen N. 2000. Subcutaneous phaeohyphomycosis in transplant recipients: review of the literature and demonstration of in vitro synergy between antifungal agents. Med. Mycol. **38**:169-175.

Clay K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. Ecology **69**:10-16.

Clemons KV, Stevens DA. 2000. Treatment of orogastrintestinal candidosis in SCID mice with fluconazole alone or in combination with recombinant granulocyte colony-stimulating factor or interferon γ . Med. Mycol. **38**:213-219.

Clemons KV, Stevens DA. 2006. Animal models testing monotherapy versus combination antifungal therapy: lessons learned and future directions. Curr. Opin. Infect. Dis. **19**:360-364.

CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-Third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Bibliografia

Csank C, Haynes K. 2000. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. FEMS Microbiol. Lett. **189**:115-120.

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

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

Dismukes WE, Cloud G, Gallis HA, Kerkering TM, Medoff G, Craven PC, Kaplowitz LG, Fisher JF, Gregg CR, Bowles CA, Shadomy S, Stamm AM, Diasio RB, Kaufman L, Soong SJ, Blackwelder WC, N. A. I. D. M. S. Group. 1987. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. N. Engl. J. Med. **317**:334-341.

Dixon DM, Polak A. 1987. *In vitro* and *in vivo* drug studies with three agents of central nervous system phaeohyphomycosis. Chemotherapy **33**:129-140.

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

Elewski BE. 1998. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. Clin. Microbiol. Rev. **11**:415-429.

Erbagci Z. 2002. Deep dermatophytoses in association with atopy and diabetes mellitus: Majocchi's granuloma trichophyticum or dermatophytic pseudomycetoma? Mycopathologia **154**:163-169.

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. 2003. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev. Iberoam. Micol.* **20**:121-136.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. 2005. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3884-3889.

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

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

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

Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, Villareal K, Pfaller MA, Gerarden T, Rinaldi MG, Fothergill A. 1992. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3138-3145.

Espinel-Ingroff A, Pfaller MA. 2007. Susceptibility test methods: yeast and filamentous fungi. A: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JG, Landry ML, Pfaller MA

Bibliografia

(eds.): Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1972–1986.

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

Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller A, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS, Body BA, Frey C, Hall G, Roberts GD, Nolte FB, Odds FC, Rinaldi MG, Sugar AM, Villareal K. 1993. Multicenter evaluation of a macrobroth antifungal susceptibility test for yeasts. Antimicrob. Agents Chemother. **37**:39-45.

Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin. Microbiol. Rev. **12**:80-96.

Fleischhacker M, Radecke C, Schulz B, Ruhnke M. 2008. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **27**:127–131.

Fung-Tomc JC, Huczko E, Minassian B, Bonner DP. 1998. In vitro activity of a new oral triazole, BMS-207147 (ER-30346). Antimicrob. Agents Chemother. **42**:313-318.

Ghannoum MA, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Rinaldi MG, Lee-Yang W, Warnock DW. 2004. Intra- and interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes. J. Clin. Microbiol. **42**:2977-2979.

Ghannoum MA, Rice LB. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin. Microbiol Rev. **12**:501–517.

Gee SF, Joly S, Soll DR, Meis JF, Verweij PE, Polacheck I, Sullivan DJ, Coleman DC. 2002. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo. J. Clin. Microbiol. **40**:556-574.

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

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.

Gubbins PO, Anaissie EJ. 2003. Antifungal therapy. A: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA.(eds.): *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone, Philadelphia, 171-195.

Hajdu R, Thompson R, Sundelof JG, Pelak BA, Bouffard FA, Dropinski JF, Kropp H. 1997. Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agent MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2339-2344.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1519–1527.

Hazen KC. 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:462-478.

Heyn K, Tredup A, Salvenmoser S, Muller FM. 2005. Effect of voriconazole combined with micafungin against *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:5157–9.

Hiemenz JW, Walsh TJ. 1996. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin. Infect. Dis.* **22**:S133-S144.

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

Bibliografia

Imai JK, Singh G, Clemons KV, Stevens DA. 2004. Efficacy of posaconazole in a murine model of central nervous system aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4063-4066.

Index fungorum. Cabi Bioscience databases. 2009.

<http://www.indexfungorum.org/Index.htm>

Mitchell TG. 2007. *Medical Mycology. A: Brooks GF, Carroll CK, Butel JS, Morse SA (eds.): Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 25th edition, Lange Medical Books/McGraw - Hill, New York.*

Jacobsen MD, Whyte JA, Odds FC. 2007. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* respond differently to echinocandin antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1882-1884.

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

Kantarcioğlu AS, de Hoog GS. 2004. Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of cases presented between 1999 and 2004. *Mycoses* **47**:4-13.

Kayser O, Olbrich C, Yardley V, Kiderlen AF, Croft SL. 2003. Formulation of amphotericin B as nanosuspensions for oral administration. *Int. J. Pharm.* **254**:73-75.

Kerridge D, Vanden-Bossche H. 1990. Drug discovery: a biochemist approach. A: Ryley, J.F. (ed.): *Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases.* Springer Verlag, Berlin-Heildeberg, 31-76.

Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE, Johnson EM, Perry JD, Sullivan DJ, Wilson JA. 2003. Manangement and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *J. Hosp. Infect.* **58**:18-24.

Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP, Raad II. 2001. Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. Clin. Infect. Dis. **33**:1676-1681.

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

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. The fungi A: Kwon-Chung KJ, Bennett JE (eds): Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, 3-34.

Kwon-Chung KJ, Varma A. 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?. Fed. Europ. Microbiol. Soc. **6**:574-587.

Kwong EH, Ramaswamy M, Bauer EA, Hartsel SC, Wasam KM. 2001. Heat treatment of amphotericin B modifies its serum pharmacokinetics, tissue distribution, and renal toxicity following administration of a single intravenous dose to rabbits. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:2060-2063.

Lin MY, Carmeli Y, Zumsteg J, Flores EL, Tolentino J, Sreeramoju P, Weber SG. 2005. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:4555-4560.

Lewis, RE, Kontoyiannis DP. 2001. Rationale for combination antifungal therapy. Pharmacotherapy **21**:149S-164S.

Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J. Clin. Microbiol. **44**:3251-3256.

Marr KA, White TC, van Burik J-AH, Bowden RA. 1997. Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in a patient undergoing marrow transplantation. Clin. Infect. Dis. **25**:908-910.

Bibliografia

Marriot D, Laxton M, Harkness J. 2001. *Candida dubliniensis* candidemia in Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:479.

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

Mayanja-Kizza H, Oishi K, Mitarai S, Yamashita H, Nalongo K, Watanabe K, Izumi T, Ococi-Jungala, Augustine K, Mugerwa R, Nagatake T, Matsumoto K. 1998. Combination therapy with fluconazole and flucytosine for cryptococcal meningitis in Ugandan patients with AIDS. *Clin. Infec. Dis.* **26**:1362-1366.

McGinnis MR, Rinaldi MG. 1991. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. A: Lorian V. (ed.): *Antibiotic in Laboratory Medicine*. 3rd ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 198-257.

Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW, Rodríguez-Tudela JL, Donnelly JP, Verweij PE. 2002a. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:62-68.

Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Verweij PE. 2002b. Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed Standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2876-2885.

Morris-Jones R. 2002. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.* **27**:427-431.

Mousa HA, Al-Bader SM, Asan DA. 1999. Correlation between fungi isolated from burn wounds and burn care units. *Burns* **25**:145-147.

Mueller GM, Schmit JP. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodivers. Conserv.* **16**:1-5.

Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM. 2007. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* **3**:e101

Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M. 2003. In vitro activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: Comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1376-1381.

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

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

Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, Jacobsen MD, Lecomte M, Li SY, Tavanti A, Maiden MC, Gow NA, d'Enfert C. 2007. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **6**:1041–1052.

Odds FC, van Gerven F, Espinel-Ingroff A, Bartlett MS, Ghannoum MA, Lancaster MV, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, and Walsh TJ. 1998. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:282–288.

Olson JA, Adler-Moore JP, Smith PJ, Proffitt RT. 2005. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4895-4902.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. 2009. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America Clinical Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **48**:503–35.

Bibliografia

Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE. 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. Clin. Infect. Dis. **38**:161-189.

Patterson TF. 2005. Advances and challenges in management of invasive mycoses. Lancet **366**:1013-1025.

Pfaller MA, Diekema DJ. 2007a. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin. Microbiol. Rev. **20**:133-163.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, Fu W, Colombo AL, Rodriguez-Noriega E; Global Antifungal Surveillance Study. 2007b. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J. Clin. Microbiol. **45**:1735-1745.

Pfaller, MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, Rinaldi M, Barton R, A. Veselov A; Global Antifungal Surveillance Group. 2008. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. J. Clin. Microbiol. **46**:515-521.

Pfaller MA, Diekema DJ; International Fungal Surveillance Participant Group. 2004a. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. Clin. Microbiol. Infect. **10**:11-23.

Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Alexander BD, Andes D, Brown SD, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Knapp CC, Sheehan DJ, Walsh TJ. 2008. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. J Clin Microbiol. **46**:2620-9.

Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Troke P, Walsh TJ, Warnock DW. 2006a. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested

against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* **44**:819-826.

Pfaller MA, Pappas PG, John RW. 2006b. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends *Clinical Infectious Diseases* **43**:S3–S14.

Pfaller MA, Rinaldi MG. 1992. In vitro testing of susceptibility of fluconazole. A: Powderly WB, Van't Wouk JW (eds.): *The Antifungal Agents*, Vol.1. Marius Press, Lancashire, 10-22.

Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, Fromtling RA, Hall GS, Huges CE, Odds FC, Sugar AM. 1990. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1648-1654.

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

Pinjon E, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. 2005. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1210-1214.

Pirofski L, Casadevall A. 2002. The meaning of microbial exposure, infection, colonisation, and disease in clinical practice. *The lancet* **2**:628-635.

Prenafeta-Boldú FX, Summerbell RC, De Hoog GS. 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:109-130.

Pujol I, Guarro J, Gené J, Sala J. 1997. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:163-167.

Pukkila-Worley R, Holson E, Wagner F, Mylonakis E. 2009. Antifungal drug discovery through the study of invertebrate model hosts. *Curr. Med. Chem.* **16**:1588-1595.

Bibliografia

Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG. 2004. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases. *Clin. Infect. Dis.* **38**:206-216.

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

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

Richardson M, Lass-Flörl C. 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect. Suppl* **4**:5-24.

Richardson MD, Warnock DW. 2003. Fungi as human pathogens. A: Richardson MD, Warnock DW (eds.): *Fungal infection. Diagnosis and management.* 3rd edn. Wiley-Blackwell. Oxford, 4-6.

Rippon JW. 1988. Introduction to medical mycology. A: Rippon JW (ed.): *Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.* 3rd edn. WB Saunders Co., Philadelphia, 1-15.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Serena C, Guarro. 2009. Posaconazole efficacy in a murine disseminated infection caused by *Paecilomyces lilacinus*. *J. Antimicrob Chemother.* **63**:361-364.

Roffey SJ, Cole S, Comby P, Gibson D, Jezequel SG, Nedderman AN, Smith DA, Walker DK, Wood N. 2003. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug. Metab. Dispos.* **31**:731-741.

Rubio MC, de Ocáriz IR, Gil J, Benito R, Rezusta A. 2005. Potential fungicidal effect of voriconazole against *Candida* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**:264-267.

Rubio M, Gil J, Benito R, Ramírez I, Navarro M. 2001. Micosis más frecuentes en nuestro medio. A: Pemán J, Martin E, Rubio MC (eds.): Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Revista iberoamericana de micología, Bilbao, 3-18.

Ruíz-Cendoya M, Mariné M, Rodríguez MM, Guarro J. 2009. Interactions between triazoles and amphotericin B in treatment of disseminated murine infection by *Fusarium oxysporum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1705-1708.

Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Raposo R, Méndez MT, Torrado-Santiago S, Torrado JJ. 2004a. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3246-52.

Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Torrado-Santiago S, Torrado JJ. 2004b. Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Drug. Target.* **12**:453-460.

Sebti A, Kiehn TE, Perlin D, Chaturvedi V, Wong M, Doney A, Park S, Sepkowitz KA. 2001. *Candida dubliniensis* at a cancer center. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1034-1038.

Serena C, Gilgado F, Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. 2006. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive trichosporonosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2240-2243.

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.

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

Shumann GL. 1991. Plant diseases epidemics and their management. A: Shumann GL (ed.): Plant diseases: their biology and social impact. American Phytopathological Society, Sant Paul, 123-148.

Bibliografia

Smith KJ, Neafie RC, Skelton HG, Barrett TL, Graham JH, Lupton GP. 1991. Majocchi's granuloma. *J. Cutan. Pathol.* **18**:28-35.

Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. 2006. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin. Infect. Dis.* **43**:1060-1068.

Spellberg BJ, Scott GF, Edwards JE Jr. 2006. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **42**:244-251.

Sóczó G, Kardos G, McNicholas PM, Balogh E, Gergely L, Varga I, Kelentey B, Majoros L. 2007. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time kill test against nine *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:1004-1009.

Stenderup A, Pederson GT. 1962. Yeasts of human origin. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **54**:462-472.

Stevens DA. 1996. Animal models in the evaluation of antifungal drugs. *J Mycol Med.* **6(Suppl I)**:7-10.

Stone EA, Fung HB, Kirschenbaum HL. 2002. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin. Ther.* **24**:351-377.

Tobón AM, Arango M, Fernández D, Restrepo A. 2003. Mucormycosis (zigomycosis) in heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1488-1491.

Torrado JJ, Torrado S, Sánchez-Brunete JA, Bolás F, Dea MA, Rama S, Alunda JM. 22-12-2005. Microesferas de anfotericina B. Spanish patent ES2212904B2.

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

Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. 2006. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**:359-366.

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R, the ECMM workinon candidemia. 2004. Epidemiology of candidemia in Europe: results of 28-month european confederation of medical mycology (ECMM). Hospital-based surveillance study. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **23**:317-322.

van Hal SJ, Stark D, Harkness J, Marriott D. 2008. *Candida dubliniensis* meningitis as delayed sequela of treated *C. dubliniensis* fungemia. Emerg. Infect. Dis. **14**:327-329.

Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, Perfect JR, Horwith G, Lee L, Silber JL, DiNubile MJ, Reboli A, Bow E, Lister J, Anaissie EJ. 1998. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. Clin. Infect. Dis.**26**:1383–1396.

White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:1704–1713.

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