



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

**FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES**

**ACTIVIDAD *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NUEVOS
ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS
OPORTUNISTAS**

Carolina Serena Perelló

Tesis doctoral

2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

Informe del director de la tesi doctoral
 (art 11.3 del real decret 56/2005 de Postgrau)

DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL	
Títol de la tesi doctoral ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS	
Doctorand/a CAROLINA SERENA PERELLÓ	
Director(s)/es JOSEP GUARRO ARTIGAS FRANCISCO JAVIER PASTOR MOLAS	Tutor/a (si s'escau)
Programa de doctorat NUTRICIÓ I METABOLSIME	
Departament CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES	Grup de recerca MICOLOGIA

INFORME DEL DIRECTOR DE TESI		
El(s) (co)directors sotasignats emeten el següent informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit		
	SI	NO
La tesi consisteix en un treball original de recerca	X	
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	X	
Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	X	
La metodologia està descrita	X	
Hi consta el procediment	X	
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	X	
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	X	
La bibliografia està ben reflectida	X	
D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques:		
<p>Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Capilla J, Nolard N, Guarro J. 2004. In vitro antifungal susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> 48: 2724-2726.</p> <p>Serena C, Pastor FJ, Gilgado F, Mayayo E, Guarro J. 2005. Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> 49: 497-502.</p> <p>Serena C, Mariné M, Pastor J, Nolard N, Guarro J. 2005. In vitro interaction of micafungin with conventional and new antifungal drugs against clinical isolates of <i>Trichosporon</i>, <i>Sporobolomyces</i> and <i>Rhodotorula</i>. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> 55: 1020-1023.</p> <p>Serena C, Fernández-Torres B, Pastor FJ, Trilles L, Lazera Mdos S, Nolard N, Guarro J. 2005. In vitro interaction of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of <i>Cryptococcus</i>. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> 49: 2994-2996.</p> <p>Serena C, Gilgado F, Mariné M, Pastor J, Guarro J. 2006. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive trichosporonosis. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> 50: 4757-4759.</p> <p>Serena C, Mariné M, Marimon R, Pastor FJ, Guarro J. 2007. Effect of antifungal treatment in a murine model of blastoschizomycosis. <i>International Journal of Antimicrobial Agents</i> 29: 79-83.</p> <p>Serena C, Rodriguez MM, Mariné M, Pastor FJ, and Guarro J. Combined therapies in a murine model of blastoschizomycosis. Aceptado por la revista <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>. 2007</p>		

Serena C, Pastor FJ, Mariné M, Rodríguez MM, and Guarro J. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. Aceptado por la revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007

Serena C, Mariné M, Pastor FJ, Quindós G, Carillo AJ, and Guarro J. In vitro interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of *Candida* spp. Enviado a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007.

Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi:

.....

I en conclusió, s'emet l'informe favorable per tal que es pugui portar a terme tràmit de lectura i posterior defensa pública.

Tarragona o Reus o Vilaseca, 24 d'abril de 2007

Josep Guarro Artigas
Director de la tesi

F. Javier Pastor Molas
Codirector (si s'escau)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

A Félix

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

AGRADECIMIENTOS

Este apartado está dedicado a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización de este trabajo. Con ellas he compartido muchas experiencias a lo largo de este tiempo. A todos ellos, muchísimas gracias.

Al Prof. Josep Guarro, por dejarme aprender un poco de su gran conocimiento sobre micología, lo que ha significado mucho para mí. Por dirigirme esta tesis y por haber sido tan exigente y constante con mi trabajo, sin ti, esta tesis no habría sido posible. Muchísimas gracias.

Al Dr. Francesc Xavier Pastor, por sus valiosísimos consejos en la dirección de esta tesis, por aclararme las numerosas dudas que sobre la microbiología clínica han ido surgiendo a lo largo de esta investigación y por ser siempre tan cercano a todos los becarios. Muchísimas gracias.

A los doctores Montserrat Ortoneda y Javier Capilla, por ayudarme en mis inicios del doctorado y ser tan buenas personas, nunca lo olvidaré.

A los doctores Josepa Gené, Maria José Figueras, Josep Cano, Alberto Stchigel, Emili Mayayo e Isabel Pujol, por haberme ayudado cuando lo he necesitado durante estos años. Muchísimas gracias.

A ti Félix, por ayudarme tanto, por creer en mi, por venir conmigo a trabajar los fines de semana, por resolverme muchas dudas. Gracias cariño. Eres lo mejor de mi vida.

A mis antiguos compañeros y amigos que no olvido, Lara, Gisela, Belkys, Nuria Argany, Antonio y Dania. Con ellos he compartido muchos buenos momentos.

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos de trabajo, en especial a Rita y a Mónica, por haber compartido conmigo estos años de doctorado y por su valiosísima amistad, a Marçal por ser tan auténtico como es, a Mar, por ser una gran amiga y una gran compañera de trabajo; a Carolina, Clara, Fredi, Mery, Mabel, Luis, Kendra, Cori, Hugo, Anabel, Cati, Núria Pilas, Carme, y Josepa por los buenos momentos que hemos compartido.

A todos los investigadores que han visitado nuestro laboratorio: sus estancias enriquecen nuestro trabajo.

I en especial als meus pares i a l'Aina que m'han ajudat, aconsellat i recolzat en tot moment, moltes gràcies a tots tres!

1. Introducción

1.1 Generalidades	1
1.2 Enfermedades causadas por hongos. Micosis	3
1.3 Las levaduras como agentes causales de micosis sistémicas	8
1.3.1 Levaduras de la división Basidiomycota.....	8
1.3.1.1 <i>Cryptococcus</i> spp.	9
1.3.1.2 <i>Trichosporon</i> spp.	10
1.3.1.3 <i>Rhodotorula</i> spp.	11
1.3.1.4 <i>Sporobolomyces</i> spp.	12
1.3.2 Levaduras de la división Ascomycota	12
1.3.2.1 <i>Candida</i> spp.	12
1.3.2.2 <i>Blastoschizomyces capitatus</i>	14
1.4 Antifúngicos	14
1.4.1 Polienos	15
1.4.2 Azoles	16
1.4.2.1 Fluconazol	17
1.4.2.2 Itraconazol	17
1.4.2.3 Voriconazol	17
1.4.2.4 Posaconazol	18
1.4.2.5 Ravuconazol	18
1.4.2.6 Albaconazol	18
1.4.3 Análogos de precursores de ácidos nucleicos	19
1.4.3.1 5-fluorocitosina	19
1.4.4. Equinocandinas	20
1.4.4.1 Caspofungina	21
1.4.4.2 Micafungina	21
1.4.4.3 Anidulafungin	21
1.4.5 Alilaminas	22
1.4.5.1 Terbinafina	22

1.5 Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos	22
1.5.1 Métodos <i>in vitro</i>	24
1.5.1.1 Las levaduras	24
1.5.1.2 Los hongos filamentosos	25
1.5.2 Métodos <i>in vivo</i> . Modelos experimentales	27
2. Interés y objetivos del estudio	29
3. Materiales y Métodos	35
3.1 Estudios <i>in vitro</i>	37
3.1.1 Cepas	37
3.1.2 Conservación de las cepas	38
3.1.3 Agentes antifúngicos	38
3.1.4 Metodología	40
3.1.4.1 Preparación de microplacas	40
3.1.4.2 Preparación de microplacas de combinaciones antifúngicas	41
3.1.4.3 Definiciones	43
3.1.4.4 Preparación de los inóculos para los estudios <i>in vitro</i>	44
3.2 Estudios <i>in vivo</i>	45
3.2.1 Cepas	45
3.2.2 Animales de experimentación	45
3.2.3 Inmunosupresión	46
3.2.4 Infección	46
3.2.5 Antifúngicos	47
3.2.6 Tratamientos y vías de administración	48
3.2.7 Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado	49
3.2.8 Análisis estadístico	50
3.2.9 Histopatología	51

4. Resultados	53
4.1 In vitro antifungal susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts.	55
Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Capilla J, Nolard N, and Guarro J. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 2004, 48:2724-2726.	
4.2 Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis.	61
Serena C, Pastor FJ, Gilgado F, Mayayo E, and Guarro J. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 2005, 49:497-502.	
4.3 In vitro interaction of micafungin with conventional and new antifungals against clinical isolates of <i>Trichosporon</i>, <i>Sporobolomyces</i> and <i>Rhodotorula</i>.	69
Serena C, Marine M, Pastor FJ, Nolard N, and Guarro J. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> . 2005. 55:1020-1023.	
4.4 In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of <i>Cryptococcus</i>.	75
Serena C, Fernandez B, Pastor FJ, Nolard N, and Guarro J. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 2005, 49:2994-2996.	
4.5 Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive trichosporonosis.	81
Serena C, Gilgado F, Marine M, Pastor FJ, and Guarro J. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 2006, 50:2240-2243.	
4.6 Effect of antifungal treatment in a murine model of blastoschizomycosis.	87
Serena C, Marine M, Marimon R, Pastor FJ, and Guarro J. <i>International Journal of Antimicrobial Agents</i> . 2007. 29:79-83.	
4.7 Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection.	95
Serena C, Pastor FJ, Marine M, Rodríguez MM, and Guarro J. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> . 2007. Doi:10.1093/jac/dkm123 .	
4.8 Combined therapies in a murine model of blastoschizomycosis.	101
Serena C, Rodríguez MM, Marine M, Pastor FJ, and Guarro J. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 2007, Proofs.	
4.9 In vitro interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of <i>Candida</i> spp.	107
Serena C, Marine M, Pastor FJ, Quindós G, Carillo AJ, and Guarro J. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 2007, Enviado.	
5. Discusión	119
6. Conclusiones	131
7. Bibliografía	137

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

1. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

1. Introducción

1.1. Generalidades

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos, que se nutren mediante la absorción de nutrientes solubles simples gracias a la secreción de varios enzimas, que degradan el medio externo hasta convertirlo en sustancias asimilables que son acumuladas en forma de glucógeno. En cuanto a su estructura, los hongos poseen una pared celular constituida por quitina y glucanos como principales componentes. Existen evidencias fósiles de la presencia de hongos hace más de 400 millones de años (Alexopoulos *et al.*, 1996). El hongo terrestre más antiguo del que se tiene conocimiento, y del cual se pueden observar hifas, esporas multiseptadas y al parecer hasta fiálides, se encontró en Suecia, situándose su aparición en el período Siluriano de la Era Paleozoica (Sherwood-Pike y Gray, 1985).

En la actualidad se conocen miles de especies que se desarrollan en sustratos como la madera, el suelo, la materia orgánica en descomposición, o en seres vivos como animales y plantas. Los hongos forman parte de los procesos de biodegradación de restos de animales y vegetales en componentes químicos básicos y tienen un papel clave en el ciclo del carbono y de diferentes minerales. Los hongos que descomponen organismos muertos que contienen celulosa o almidón se denominan **saprobios**. Los que forman asociaciones simbióticas con las plantas, obteniendo un beneficio mutuo se denominan **mutualistas**, un ejemplo de los cuales son los hongos que viven asociados a las raíces de plantas formando micorrizas (Clay, 1988). Otros hongos producen infecciones en plantas y animales, incluyendo al hombre, y se consideran **parásitos**. Los hongos producen muchas enfermedades distintas en plantas, provocando en ocasiones pérdidas económicas muy importantes. Estos hongos patógenos para las plantas causan graves enfermedades en semillas, vástagos y plantas maduras, dando lugar a un menor crecimiento y reproducción de las plantas (Shumann, 1991). También los hongos provocan enfermedades en los seres humanos y otros animales. De las 10.000 especies de hongos que hay descritas actualmente, menos de 200 se asocian a enfermedades humanas (Richardson y Warnock, 1997), y aún son menos las especies capaces de causar infecciones graves en individuos inmunocompetentes. Por otra parte, diferentes especies de hongos tienen una gran importancia industrial ya que producen sustancias con propiedades antibacterianas

(cefalosporinas, penicilina, etc.) y antifúngicas (griseofulvina y caspofungina), vitaminas, y también enzimas que tienen múltiples aplicaciones en procesos químicos y en la producción de alimentos (pan, queso, vino, cerveza, ...) (Carlile *et al.*, 2001).

Los hongos se clasifican en base a su morfología en levaduras, hongos filamentosos, y hongos dimórficos. Las **levaduras** son hongos unicelulares que se reproducen generalmente por gemación, aunque algunos lo hacen por fisión binaria. Las características morfológicas de las levaduras se establecen por la presencia o no de cápsula, el tamaño y la forma de las células, el mecanismo de formación de la célula hija, la capacidad de formar pseudohifas o hifas verdaderas, y la capacidad de formar el teleomorfo (estadio en el cual el hongo se reproduce de forma sexual, también denominado forma perfecta). Las características fisiológicas son también importantes para su identificación. Este grupo de hongos comprende a géneros como *Candida*, *Saccharomyces* o *Cryptococcus*, incluyendo representantes patógenos primarios y patógenos oportunistas (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) así como otros de gran importancia en la industria alimentaria (*Saccharomyces cerevisiae*).

También existen muchos hongos que pertenecen al grupo de los **hongos filamentosos**. Estos se caracterizan por tener una estructura pluricelular formada por una red de hifas ramificadas con crecimiento apical (micelio). Crecen con esta estructura filamentosa independientemente de las condiciones externas, que en lo único que pueden influenciar es en la velocidad de crecimiento y en la mayor o menor formación de estructuras reproductoras, así como en la formación o no del teleomorfo. Los diferentes géneros y especies de hongos filamentosos, en su fase asexual, se diferencian principalmente por la conidiogénesis, y por las características morfológicas observadas en los conidios y en las células conidiógenas, datos que son los que nos permiten su clasificación (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los **hongos dimórficos** expresan fenotípicamente dos morfologías distintas en función de las características del medio (temperatura, concentración de CO₂, pH) en que se desarrollan. Son hongos filamentosos cuando crecen en cultivos *in vitro* a 25°C y levaduras cuando se encuentran infectando un organismo (Rippon, 1988). Los principales representantes con importancia médica de este grupo son: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* y *Sporothrix schenckii*.

1.2. Enfermedades causadas por hongos. Micosis

El establecimiento de una micosis implica la capacidad del microorganismo de crecer en las condiciones de pH, temperatura y potencial redox presentes en los tejidos del huésped, siendo dichas condiciones generalmente poco favorables para el crecimiento y desarrollo de los hongos. Los agentes infectantes deben poseer, por lo tanto, ciertas características que les permitan sobrevivir en tal ambiente así como mecanismos para evadir las defensas del huésped (Casadevall y Pirofski, 2001; Clemons y Stevens, 2000). La mayoría de hongos poseen escaso poder patógeno, sin embargo algunas especies han logrado adaptarse a las condiciones desfavorables impuestas por el huésped y desarrollarse en sus tejidos. De todas formas la virulencia de un microorganismo depende tanto de las características del microorganismo como de factores propios del huésped (Pirofski y Casadevall, 2002), por lo que el establecimiento de una enfermedad infecciosa depende del estrecho equilibrio entre el huésped y el microorganismo. Los mecanismos de infección incluyen el contacto cutáneo, la inhalación de esporas y el paso a través de soluciones de continuidad de la piel o las mucosas.

Los hongos pueden originar procesos infecciosos muy variados que pueden ser clasificados de acuerdo con las áreas de afectación en:

Micosis superficiales

Son aquellas adquiridas por contacto y que afectan a la capa externa del estrato córneo de la piel y a la cutícula del pelo. Este tipo de micosis afecta tejidos inertes por lo que no tiene lugar una respuesta inmunitaria detectable en el huésped. Entre los agentes etiológicos causantes de este tipo de infecciones cabe destacar *Malassezia* spp. (levadura causante de la pitiriasis versicolor), *Hortaea werneckii* (causante de la tiña negra), *Trichosporon* spp y *Piedraia hortae* (causantes de la piedra blanca y negra, respectivamente). *Trichophyton mentagrophytes*, *Acremonium* spp., *Scopulariopsis* spp., y *Fusarium* spp. pueden producir onicomycosis (Torres-Rodríguez y López-Jodra, 2000). El diagnóstico de las infecciones superficiales es relativamente sencillo y la terapia específica suele proporcionar buena respuesta clínica.

Micosis cutáneas

Son aquellas adquiridas por contacto y difieren de las micosis superficiales en que pueden afectar a capas más profundas de la piel provocando la respuesta inmunitaria del huésped. Los hongos dermatofitos son los principales causantes de este tipo de infecciones cutáneas siendo *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum* los géneros más frecuentemente implicados (de Hoog *et al.*, 2000). La etiología de las infecciones cutáneas no se encuentra limitada a este grupo de hongos ya que algunos hongos no dermatofitos pueden también estar implicados en dichas infecciones. Así por ejemplo *Candida* spp. pueden originar candidiasis mucocutánea, *Scopulariopsis brevicaulis* puede ser causa de onicomycosis y *Nattrassia mangiferae* de hiperqueratosis en manos y pies. Las micosis cutáneas pueden evolucionar hacia la producción de lesiones subcutáneas (Erbagci, 2002; Smith *et al.*, 1991).

Micosis subcutáneas

La infección se produce frecuentemente por inoculación traumática. Los agentes causales de este tipo de micosis pertenecen a un grupo heterogéneo de microorganismos de escasa capacidad patógena, aislados frecuentemente del suelo o a partir de materia orgánica en descomposición. Afectan a las capas profundas de la dermis y tejido celular subcutáneo pudiéndose extender a músculo y hueso. Según el microorganismo causante podemos distinguir varios tipos de micosis subcutáneas, entre las que podemos destacar:

- **Eumicetoma.** Se trata de lesiones granulomatosas supurativas en cuyo exudado suelen estar presentes microcolonias en forma de granos. Podemos diferenciar eumicetomas de “grano claro”, causados principalmente por *Acremonium* spp., *Neotestudina rossatii* y *Pseudallescheria boydii*, y eumicetomas de “grano oscuro” cuyos agentes etiológicos son principalmente *Exophiala* spp. (de Hoog *et al.*, 2000; Padhye *et al.*, 1984), *Madurella* spp (McGinnis, 1996), *Leptosphaeria* spp., *Sporothrix schenckii* (Pelzer *et al.*, 2000), *Curvularia* sp. (Subramanyam *et al.*, 1993) y *Scytalidium* spp. (Dhindsa *et al.*, 1998).

- **Esporotricosis.** Causada por *Sporothrix schenckii*, es una enfermedad infecciosa de distribución mundial. El mecanismo de adquisición es básicamente la inoculación traumática y la enfermedad cursa con formación de úlceras purulentas con márgenes enrojecidos, siendo frecuente la afectación de los ganglios linfáticos regionales ocasionando esporotricosis linfocutánea (Lyon *et al.*, 2003). Así mismo puede producirse la afectación osteoarticular y visceral tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos (Morris-Jones, 2002).
- **Lobomicosis.** El agente etiológico es *Lacazia loboi*, un hongo que hasta la fecha no se ha podido aislar en cultivo (Belone *et al.*, 2002; de Hoog *et al.*, 2000). La enfermedad se caracteriza por la formación de nódulos y placas cutáneas de apariencia queloidea en las extremidades, nalgas y lóbulos de la orejas (Fuchs *et al.*, 1990). La mayoría de casos se han producido en el Sur y Centro de América.
- **Rinosporidiosis.** Causada por *Rhinosporidium seeberi*, es una infección primaria de la mucosa nasal caracterizada por la formación de granulomas inflamatorios que pueden llegar a convertirse en pólipos (de Hoog *et al.*, 2000; Van Der Coer *et al.*, 1992).
- **Rinitis zigomicótica.** Comúnmente producida por *Rhizopus* spp. afecta a mucosa nasal. Debido al rápido crecimiento del hongo, la infección puede invadir los vasos sanguíneos y llegar a afectar al SNC originando infartos cerebrales y meningitis (Chayakulkeeree *et al.*, 2006).
- **Cromoblastomicosis.** Dicha infección se caracteriza por la presencia de lesiones ulceradas no exudativas, poco extensas y de localización preferentemente en extremidades. Pueden diseminarse por vía linfática. Los agentes responsables típicos de la cromoblastomicosis son: *Cladophialophora carrioni*, *Fonsecaea* spp. (de Hoog *et al.*, 2000), *Phialophora verrucosa* (Sharma *et al.*, 2002) o *Exophiala dermatitidis* (Clancy *et al.*, 2000)

Micosis sistémicas

En las micosis sistémicas se produce la afectación de dos o más órganos no adyacentes, o de un órgano y sangre (Rubio *et al.*, 2001). Si bien pueden producirse en huéspedes inmunocompetentes, en cuyo caso suelen ser los hongos dimórficos los agentes causales, son mucho más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos, siendo en este caso ocasionadas por hongos oportunistas que usualmente no causan infección en el huésped sano.

Los hongos dimórficos se desarrollan como saprótrofos en el suelo, donde presentan una fase de crecimiento filamentosos con producción de conidios. Tras la penetración de estos conidios en los tejidos animales se producen importantes cambios en la morfología, metabolismo, pared celular y sistema enzimático del microorganismo que facilitan su diseminación. A pesar de su capacidad invasora el pronóstico es variable, siendo especialmente grave en el caso de pacientes inmunocomprometidos. Por su elevada incidencia y gravedad destacan *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Coccidioides immitis*. Todos ellos se hallan limitados geográficamente a regiones áridas de América.

Reciben el nombre de hongos oportunistas un grupo heterogéneo de hongos saprótrofos del suelo, que presentan una distribución geográfica amplia y que tradicionalmente han sido considerados como no patógenos. Sin embargo, pueden causar micosis sistémicas en determinadas circunstancias generalmente relacionadas con alteraciones inmunitarias del huésped. Suelen afectar a pacientes con alteraciones en la respuesta inmunitaria inespecífica, como la neutropenia, o a aquellos en los que la afectación inmunitaria incluye también la respuesta adaptativa, como es el caso de individuos sometidos a tratamientos sistémicos con corticoides o radioterapia y/o quimioterapia antineoplásica (Spellberg y Edwards, 2001). El incremento de la incidencia de las infecciones oportunistas ha evolucionado paralelamente con el desarrollo de tratamientos antineoplásicos y con los avances en la cirugía de trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea que, aunque permiten prolongar la vida de pacientes con enfermedades malignas, provocan un estado de inmunodepresión severa que predispone al establecimiento de este tipo de infecciones. La aparición del SIDA a finales de la década de los 70 como enfermedad inmunosupresiva, ha contribuido también en gran parte a incrementar el desarrollo de infecciones oportunistas, entre las cuales las micosis ocupan un importante lugar. Si

bien las infecciones oportunistas fueron consideradas antaño como afectaciones exóticas o raras, debido a su baja incidencia, a partir de las últimas décadas del siglo XX, se ha producido un aumento paralelo al aumento de pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo no puede excluirse la posibilidad, aunque rara, de la infección por hongos oportunistas en individuos inmunocompetentes (Greig *et al.*, 2001; Karim *et al.*, 1997), especialmente en aquellos portadores de catéteres intravasculares, prótesis, sometidos a terapias antimicrobianas continuadas, o que sufren traumatismos accidentales o quirúrgicos (Cimerman *et al.*, 1999; Lavy *et al.*, 2001; Mousa *et al.*, 1999).

Los factores que favorecen la adquisición de infecciones oportunistas, son numerosos y variados. Los más comunes son:

- Alteraciones de las barreras naturales:
 - Antibioterapia múltiple o prolongada
 - Implantación de catéteres intravasculares durante periodos prolongados de tiempo
 - Quemaduras, úlceras o traumatismos

- Alteraciones cuantitativas y/o funcionales del sistema inmunitario:
 - Radioterapia
 - Quimioterapia
 - Aplasia medular
 - Enfermedad granulomatosa crónica
 - Diabetes
 - SIDA
 - Leucemias
 - Uso de agentes inmunosupresores en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, así como en trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea.

1.3. Las levaduras como agentes causales de micosis sistémicas

Los hongos se clasifican en cuatro divisiones: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Taylor, 2004). Las levaduras se encuentran dentro de dos divisiones: Ascomycota y Basidiomycota.

Tal y como se ha citado anteriormente, a partir de la segunda mitad del siglo XX, y especialmente en los últimos 20 años, se ha observado un importante aumento de la incidencia de los procesos infecciosos producidos por hongos en patología humana (Enoch *et al.*, 2006). Además de los hongos oportunistas “clásicos” tales como *Candida* spp. y *Aspergillus* spp., en la actualidad nuevas especies han pasado a formar parte de la etiología de las micosis invasivas y diseminadas.

Dentro de estos hongos oportunistas emergentes se hallan levaduras, hasta ahora consideradas prácticamente como no patógenas, que actualmente se consideran agentes causales de distintos procesos infecciosos relacionados en muchas ocasiones con el uso de catéteres vasculares, y con el personal sanitario, que actúa de portador. Entre las levaduras oportunistas las de mayor relevancia clínica por su elevada incidencia, mortalidad y, en algunos casos, por la dificultad de establecer un tratamiento efectivo, son probablemente, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Blastoschizomyces capitatus*, *Rhodotorula* spp. y *Sporobolomyces salmonicolor*.

1.3.1. Levaduras de la división Basidiomycota

Las levaduras pertenecientes a los basidiomicetos son anamorfos (estado asexual), cuya característica principal es la formación de basidios. Los basidios pueden desarrollar hifas o células levaduriformes y dar lugar a basidiosporas. Cuando todas estas estructuras no están presentes, las levaduras de la división Basidiomycota son morfológicamente indistinguibles de las de la división Ascomycota. Es por ello que la reacción de la ureasa y otras pruebas fisiológicas son de gran valor para diferenciar entre las dos divisiones de levaduras. También la microscopía electrónica de transmisión puede diferenciarlas ya que las levaduras pertenecientes a los basidiomicetos presentan una pared interna laminar, mientras que las pertenecientes a los ascomicetos la presentan uniforme.

Algunas de estas levaduras, como *Cryptococcus neoformans* y *Malassezia* spp., son patógenos humanos bien conocidos. Sin embargo, muchas otras especies pertenecientes a este grupo pueden causar también infecciones en humanos, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Entre estas, *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Rhodotorula glutinis*, y más comúnmente *Trichosporon asahii* han sido descritas como causantes de micosis humanas severas (Anatoliotaki *et al.*, 2003; de Hoog *et al.*, 2000; Groll y Walsh, 2001; Jonhson *et al.*, 1998; Plazas *et al.*, 1994; Wolf *et al.*, 2001).

1.3.1.1. *Cryptococcus* spp.

La criptococosis es una micosis sistémica que afecta principalmente a pulmones y sistema nervioso central, y con menor frecuencia a la piel, tejido óseo y próstata. Es una enfermedad de distribución universal que adquirió un protagonismo especial con la aparición del SIDA y con el auge de los trasplantes de médula ósea y de órganos sólidos, siendo por ello considerada como una micosis oportunista (de Hoog *et al.*, 2000; Groll y Walsh, 2001; Mitchell y Perfect, 1995).

Aún cuando han sido descritas 19 especies del género *Cryptococcus* (Rippon, 1988), solamente cuatro de ellas han sido reconocidas como causantes de infecciones humanas. En la actualidad, las especies consideradas como causales de la criptococosis son *C. neoformans* (serotipos A y D) y *C. gattii* (serotipos B y C) (Kwong-Chung y Varma, 2006). Aunque las especies más frecuentemente asociadas a patología humana son *C. neoformans* y *C. gattii*, otras dos especies, *C. albidus* y *C. laurentii*, han sido identificadas como causantes de infecciones (Johnson *et al.*, 1998; Kordossis *et al.*, 1998).

C. neoformans causa infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en pacientes con SIDA y en receptores de trasplantes de médula ósea y de órganos sólidos (Mitchell y Perfect, 1995). Se aísla primariamente de las heces de las palomas y del suelo, considerándose como mecanismo de infección la inhalación de aerosoles por vía aérea. A pesar de la ubicuidad del hongo y del mecanismo de transmisión, la incidencia de la enfermedad es baja. Aún siendo considerado como patógeno oportunista, puede afectar hasta un 21% de individuos inmunocompetentes (Pappas *et al.*, 2001). En pacientes inmunocompetentes *C. neoformans* puede dar lugar a colonización pulmonar o a la producción de nódulos pulmonares solitarios o

múltiples, o a infiltrados lobares, siendo los cuadros de mayor gravedad en infectados por el VIH. Este hongo tiene un especial tropismo por el sistema nervioso central, al cual accede por vía hemática, dando lugar a la producción de una meningitis crónica. Durante mucho tiempo se ha utilizado la clasificación serológica de *C. neoformans*, basada en los antígenos capsulares, en 5 serotipos: los serotipos A, B, C, D y AD. *C. neoformans* var. *neoformans* incluía los serotipos A, D y AD, y *C. neoformans* var. *gattii* los serotipos B y C. En la actualidad, el estudio genético ha permitido la reclasificación del género, incluyendo los serotipos A, D, y AD en la especie *C. neoformans*, y los serotipos B y C en una nueva especie, *C. gattii* (Kwon-Chung y Varma, 2006).

C. gattii afecta predominantemente a pacientes inmunocompetentes, pudiendo provocar nódulos pulmonares o lesiones localizadas en el sistema nervioso central (Chen *et al.*, 2000; Rozenbaum y Goncalves, 1994; Speed y Dunt, 1995). La incidencia de meningitis producidas por esta especie en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en infectados por el VIH, ha aumentado en los últimos años (Peachey *et al.*, 1998; Sorell, 2001; Speed y Dunt, 1995). Los principales hábitats de esta especie son la madera, las hojas y la corteza del árbol *Eucalyptus camaldulensis*. Al contrario de *C. neoformans* que es de distribución mundial y afecta principalmente en pacientes inmunocomprometidos, *C. gattii* está restringido geográficamente a regiones tropicales y subtropicales y afecta principalmente a pacientes inmunocompetentes.

C. laurentii y *C. albidus* afectan predominantemente a pacientes inmunocomprometidos siendo causa en ellos de fungemia, lesiones pulmonares, y meningitis (Averbuch *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Khawchroenporn *et al.*, 2006; Kordossis *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Manfredi *et al.*, 2006; Narayan *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2005; Speed *et al.*, 1995; Vlchkova-Lashkoska *et al.*, 2004).

1.3.1.2. *Trichosporon* spp.

El género *Trichosporon* [Behrend, 1890] es un género clínicamente importante, agente causal de la piedra blanca en pacientes inmunocompetentes y de infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos.

Las infecciones diseminadas producidas por las especies de *Trichosporon* constituyen una de las micosis emergentes en pacientes neutropénicos. Hasta hace poco la mayoría de los aislamientos clínicos de *Trichosporon* eran identificados como *T.beigelii* o *T. cutaneum*. En 1992, Gueho y colaboradores (1992) propusieron una importante revisión taxonómica del género *Trichosporon* en base a caracteres morfológicos, fisiológicos y moleculares. Posteriormente, Sugita y colegas [1994] elevaron el número de especies propuestas a 17. De las 17 especies, 6 están implicadas en varias infecciones humanas, siendo *T. asahii* y *T. mucooides* agentes causales de infecciones diseminadas, y *T. asteroides*, *T. ovooides* y *T. cutaneum* responsables de la piedra blanca y otras infecciones superficiales. La sexta especie, *T. inkin*, ha sido considerada como causante de infecciones superficiales y diseminadas.

El nombre de *T. beigelii*, ampliamente utilizado previamente en la literatura médica, ha sido recientemente descartado porque no existe un cultivo adecuado de la cepa tipo de este hongo ni tampoco una descripción científica. Se cree que la mayoría de casos de tricosporonosis atribuidos previamente a *T. beigelii* y *T. cutaneum* fueron probablemente causados por *T. asahii*, el cual es actualmente considerado un importante patógeno oportunista emergente.

Las especies de *Trichosporon* se caracterizan por la producción de hifas verdaderas y pseudohifas, arthroconidios y blastoconidios. El estudio histológico de los tejidos infectados muestra frecuentemente formas de levadura e hifas de mayor longitud que las observadas en las infecciones por *Candida* spp. El género *Trichosporon* es con frecuencia confundido morfológicamente con el género *Candida* lo cual puede conducir al fracaso terapéutico dada la distinta sensibilidad a los antifúngicos expresada por los dos géneros.

1.3.1.3. *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula es una levadura encontrada en el aire, en el suelo, en agua dulce y salada, y en productos lácteos. Algunas especies de *Rhodotorula* pueden colonizar las plantas, los seres humanos, y otros mamíferos.

Dentro del género *Rhodotorula* se incluyen 8 especies, de las cuales *R. mucilaginosa*, *R. minuta* y *R. glutinis* están relacionadas con la producción de patología humana (Alliot *et al.*, 2000; Anatoliotaki *et al.*, 2003; Groll y Walsh, 2001;

Huttova *et al.*, 1998; Petrocheilou-Paschou *et al.*, 2001; Pinna *et al.*, 2001). Las manifestaciones clínicas incluyen fungemia, dacriocistitis, peritonitis, meningitis y ventriculitis asociadas a la presencia de catéteres intravasculares y/o infección por el VIH.

1.3.1.4. *Sporobolomyces salmonicolor*

Sporobolomyces es una levadura aislada comúnmente de fuentes ambientales tales como el aire, hojas de árboles y cáscaras de naranja.

El género *Sporobolomyces*, cuyo teleomorfo está incluido en el género *Sporidiobolus*, incluye alrededor de 20 especies, de las cuales la más comúnmente aislada en clínica es *Sporobolomyces salmonicolor*. *S. salmonicolor* ha sido descrito como agente causal de linfadenitis (Morris *et al.*, 1991; Plazas *et al.*, 1994), dermatitis (Bergman y Kauffman, 1984), infección cerebral (Misra y Randhawa, 1976), y fungemia (Rantala *et al.*, 1995) en enfermos de SIDA.

1.3.2. Levaduras de la división Ascomycota

1.3.2.1. *Candida* spp.

Las especies del género *Candida* constituyen actualmente una de las principales causas de micosis diseminada (Bedini *et al.*, 2006; Tortorano *et al.*, 2006).

El género de *Candida* incluye un gran número de especies, siendo *C. albicans* la responsable de más de la mitad de los casos de candidiasis diseminada en pacientes inmunodeprimidos, con la excepción de aquellos que sufren enfermedades hematológicas en los que las especies de *Candida* no *albicans* son aisladas con mayor frecuencia (Tortorano *et al.*, 2004).

C. glabrata es un patógeno oportunista que afecta a pacientes inmunocomprometidos, causando infecciones diseminadas de elevada mortalidad (Tortorano *et al.*, 2006). Con cierta frecuencia, los aislamientos de *C. glabrata* presentan resistencia intrínseca al fluconazol, siendo motivo de fracaso terapéutico con el mismo (Bedini *et al.*, 2006).

C. parapsilosis es uno de los agentes etiológicos más comunes de candidemia neonatal en las unidades de cuidados intensivos (Tortorano *et al.*, 2006) y su incidencia está típicamente relacionada con el uso de catéteres y la administración de nutrición parenteral (Bedini *et al.*, 2006). Los aislamientos de *C. parapsilosis* son frecuentemente sensibles a los azoles (Bedini *et al.*, 2006).

Las infecciones diseminadas producidas por *C. tropicalis*, al igual que las producidas por *C. glabrata*, están asociadas a elevados porcentajes de mortalidad (Bedini *et al.*, 2006, Tortorano *et al.*, 2004). Se consideran factores de riesgo para estas micosis las hemopatías malignas como la leucemia, la neutropenia prolongada, y la estancia prolongada en cuidados intensivos (Kontoyiannis *et al.*, 2001).

C. krusei produce infecciones diseminadas en pacientes con enfermedades hematológicas, pero menos frecuentemente que *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Tortorano *et al.*, 2004). Es una especie de importancia clínica por su resistencia intrínseca al fluconazol, y su reducida sensibilidad a la mayoría de antifúngicos (Bedini *et al.*, 2006; Patterson, 2005).

C. lusitanae produce infecciones diseminadas también en pacientes con hemopatías malignas con menor incidencia que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* (Hazen, 1995). Las cepas de *C. lusitanae* son sensibles a los azoles, sin embargo presentan una resistencia intrínseca a la anfotericina B (Bedini *et al.*, 2006).

C. dubliniensis es una especie descrita en 1995 que comparte muchas características fenotípicas con *C. albicans*. La infección producida por *C. dubliniensis* se asocia sobre todo a la colonización y a la infección oral en individuos infectados por el VIH. Aunque *C. dubliniensis* es frecuentemente aislada en la cavidad oral, también ha sido aislada en heces, esputo, orina, y sangre (Al Mosaid *et al.*, 2005; Gee *et al.*, 2002; Marriot *et al.*, 2001). No obstante, la incidencia de *C. dubliniensis* en infecciones sistémicas es baja, no superando el 2% de casos de candidemia en el Reino Unido (Kibbler *et al.*, 2003) y en Estados Unidos (Sebti *et al.*, 2001), lo que contrasta con el 65% de candidemias causadas por *C. albicans*. Los aislamientos de *C. dubliniensis* son generalmente sensibles a los antifúngicos azoles de uso general; sin embargo, la resistencia a los mismos ha sido descrita ya en cepas de origen clínico *in vitro* (Pinjon *et al.*, 2005).

1.3.2.2. *Blastoschizomyces capitatus*

El género *Blastoschizomyces* incluye una sola especie, *Blastoschizomyces capitatus*, inicialmente clasificada dentro de la división Basidiomycota como *Trichosporon capitatum* [Diddens et Lodder 1942]. Su teleomorfo, *Dipodascus capitatus* produce ascosporas consolidando su clasificación en la clase Ascomycetes. Antes de su transferencia al nuevo género *Blastoschizomyces*, fue incluido en el género *Geotrichum*. Sin embargo, la producción de aneloconidios así como de artroconidios condujo a la aceptación general de su clasificación en un nuevo género, *Blastoschizomyces* [Salkin, 1985].

B. capitatus ha sido descrito como agente causal de diversas infecciones oportunistas (infecciones sistémicas o localizadas en pulmón, hígado, riñón, encefalitis o meningitis) en pacientes inmunocomprometidos, especialmente los afectados de leucemia o tratados con terapias inmunosupresoras. La tasa de mortalidad es aproximadamente del 50% (Girmenia *et al.*, 2005), elevándose por encima del 90% en pacientes con neutropenia profunda (Bouza y Muñoz, 2004).

1.4. Antifúngicos

El término antibiótico antifúngico o antimicótico incluye aquellas sustancias que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo o alterando su viabilidad y produciendo las mínimas alteraciones posibles en las células del huésped (Kerridge y Vanden-Bossche, 1990). La similitud de los blancos de acción de algunos antifúngicos con estructuras o rutas metabólicas de las células humanas determina el escaso número de estos fármacos en comparación con los antibióticos antibacterianos existentes, así como la mayor posibilidad de aparición de efectos secundarios y/o tóxicos (Graybill *et al.*, 2003; Revankar y Graybill, 2003).

Los antifúngicos se clasifican basándose en su estructura química, su origen (natural o de síntesis química), su espectro (amplio o restringido), y su mecanismo de acción (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999).

La membrana celular de los hongos está situada en la parte interna de la pared y tiene una estructura parecida a la membrana de las células animales, de la que se diferencia por la presencia del ergosterol en lugar del colesterol.

El tratamiento de las micosis ha sufrido una evolución, que va desde el uso de los antifúngicos considerados de “primera generación”, derivados de productos o de la actividad metabólica de determinados microorganismos, hasta los de “segunda generación”, en los que predomina la obtención por síntesis química. Las primeras sustancias utilizadas con actividad antifúngica fueron metales pesados como el yoduro potásico, metaloides, derivados del azufre y las sulfonamidas, y posteriormente se introdujeron los primeros antibióticos antifúngicos: griseofulvina, nistatina, anfotericina B y 5-fluorocitosina. Los antifúngicos azólicos fueron desarrollados en la década de 1960 y no se emplearon en la práctica clínica hasta 1969, a pesar de que la primera molécula de este tipo, el benzimidazol, fue descrita en 1944. Los primeros representantes del grupo fueron el clotrimazol, el miconazol y el econazol, a los que siguieron otros como el ketoconazol, el fluconazol y el itraconazol. Posteriormente han aparecido el voriconazol, el posaconazol, el albaconazol y el ravuconazol. Los representantes de las alilaminas son la terbinafina y la naftifina. La naftifina se introdujo en la práctica clínica en 1985 y la terbinafina en 1991. Por último, también encontramos las equinocandinas donde sus representantes más importantes son la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina.

1.4.1. Polienos

Los polienos son sustancias antibióticas sintetizadas por actinomicetos del género *Streptomyces*, y fueron los primeros antifúngicos que se desarrollaron. Se conocen más de 100 compuestos distintos, de los cuales el más importante es la **anfotericina B** (Figura 1). La anfotericina B se obtuvo a partir de *Streptomyces nodosus* y fue comercializada para su uso clínico en el año 1958. A pesar de ser el compuesto de referencia para el tratamiento de las micosis sistémicas, su nefrotoxicidad limita su dosificación y administración (Hsieh *et al.*, 1998). La actividad antifúngica de los polienos se basa en la capacidad para unirse al ergosterol, que es el lípido principal que forma la membrana de los hongos, provocando la formación de pequeños canales que permiten la salida de pequeñas moléculas del interior de la célula fúngica y la entrada de otras sustancias. Su acción requiere solo algunos minutos para alterar el equilibrio osmótico de la célula fúngica y provocarle la muerte. En la actualidad, y aunque la formulación tradicional sigue siendo la más utilizada, se utilizan otras formulaciones que permiten

administrar dosis más elevadas de anfotericina B y presentan menos problemas de toxicidad. Estas nuevas formulaciones son la anfotericina B liposómica, el complejo lipídico de la anfotericina B y la anfotericina B en dispersión coloidal.

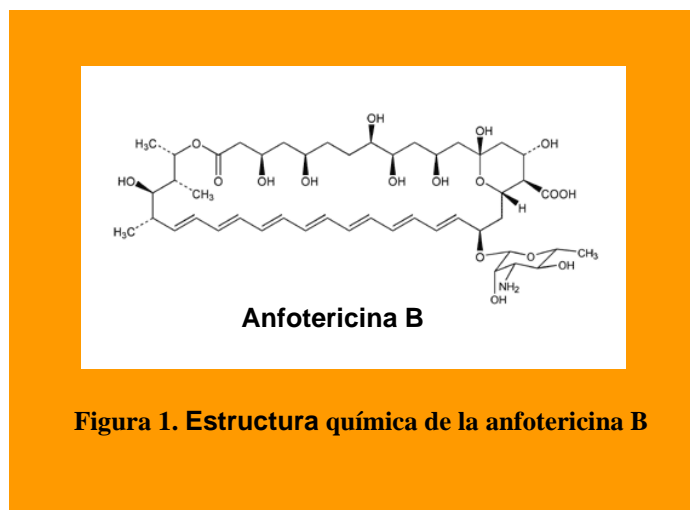


Figura 1. Estructura química de la anfotericina B

1.4.2. Azoles

Los azoles constituyen una de las familias de antifúngicos más numerosa. Su estructura química se basa en anillos heteropentacíclicos con dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno unidos por átomos de hidrógeno a otros anillos aromáticos (Figura 2). En la actualidad el uso de los imidazoles se limita al tratamiento de las micosis superficiales, siendo los más utilizados el ketoconazol, el clotrimazol, el miconazol y el sertaconazol. Los triazoles son moléculas con un amplio espectro de acción, siendo de menor toxicidad y más estables metabólicamente que los imidazoles. Están indicadas en el tratamiento de las micosis tanto superficiales como sistémicas. Los representantes principales de este grupo son el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol, el ravuconazol, el posaconazol y el albaconazol.

Los azoles son antifúngicos que actúan inhibiendo la actividad del citocromo P450 del hongo, también denominado lanosterol 14-alfa-desmetilasa o CYP51. Este enzima cataliza la eliminación del grupo 14-metileno (C-32) de lanosterol. Este sistema enzimático está presente en un gran número de tipos de seres vivos y su función es la síntesis de ergosterol (hongos) o colesterol (mamíferos). Los azoles se unen al grupo heme del citocromo y bloquean la desmetilación de lanosterol a ergosterol, compuesto

esencial de la membrana celular de los hongos que regula su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las enzimas unidas a ella. Además en las levaduras el ergosterol es el mayor componente de las vesículas que participan en las reacciones de fosforilación oxidativa necesarias para la producción de energía. Por lo tanto el ergosterol es un componente esencial para la viabilidad de las levaduras. Como consecuencia de la inhibición de ésta síntesis se altera la membrana del hongo y se acumulan algunos compuestos no desmetilados, que inhiben el crecimiento de los hongos.

1.4.2.1. Fluconazol

Se une a la lanosterol desmetilasa, un enzima del citocromo P450 que actúa en un paso inicial de la síntesis de ergosterol. El fluconazol es soluble en agua y presenta pocos problemas de toxicidad, pudiéndose administrar por vía intravenosa o oral. Su espectro de acción incluye a las levaduras de los géneros de *Candida* y *Cryptococcus* y a hongos dimórficos (Goa y Barradell, 1995).

1.4.2.2. Itraconazol

Es un antifúngico altamente lipofílico con un amplio espectro de acción. Está indicado en las distintas formas de dermatomicosis y candidiasis, destacando su efectividad sobre *Aspergillus* spp. y hongos dimórficos. Se administra en cápsulas, solución oral e intravenosa.

1.4.2.3. Voriconazol

Es un triazol de amplio espectro que ha dado muy buenos resultados en tratamientos clínicos. Esta indicado principalmente en el tratamiento de infecciones sistémicas por *Aspergillus* spp., *Scedosporium apiospermum*, *Fusarium* spp. y *Candida* spp.

1.4.2.4 Posaconazol

Este nuevo triazol tiene un espectro de actividad muy amplio e incluye levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*, mostrando una buena actividad frente a cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2005). Es activo frente a

hongos dimórficos y otros hongos filamentosos como *Aspergillus spp* (Imai *et al.*, 2004; Meletiadis *et al.*, 2002b) y hongos zigomicetos (Tobon *et al.*, 2003). Es poco activo frente al *Fusarium* y *S. apiospermum* (Meletiadis *et al.*, 2002a). Este antifúngico se encuentra disponible como formulación oral, hallándose actualmente en desarrollo la formulación intravenosa.

1.4.2.5. Ravuconazol

Estructuralmente muy similar al fluconazol, el ravuconazol es un nuevo triazol de uso oral. Actualmente se halla en ensayos clínicos en fase II.

Su eficacia *in vitro* es superior a la del fluconazol y a la del itraconazol, siendo activo sobre *C. krusei*, *C. glabrata*, cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol, *C. neoformans*, *A. fumigatus*, dermatofitos y hongos dematiáceos. Sin embargo, su actividad sobre *Sporothrix schenckii*, *Scedosporium spp* y *Fusarium spp* es limitada.

1.4.2.6. Albaconazol

Se trata del último triazol de amplio espectro que se encuentra actualmente en desarrollo preclínico, habiendo demostrado una buena actividad *in vitro* e *in vivo* sobre *C. krusei*, *C. glabrata*, *Aspergillus spp.*, hongos dermatofitos y *S. apiospermum*. Además, posee una actividad *in vitro* sobre *S. prolificans* superior a la de cualquier otro azol (Capilla *et al.*, 2001) y una buena eficacia en la infección experimental *in vivo* provocada por este hongo (Capilla *et al.*, 2003).

Actualmente, se encuentran en desarrollo ensayos clínicos con albaconazol en solución oral para el tratamiento de candidiasis vulvovaginal y de micosis sistémicas. Por otra parte, se está investigando una formulación parenteral.

En los estudios realizados hasta la fecha, el albaconazol ha demostrado una buena biodisponibilidad y tolerancia.

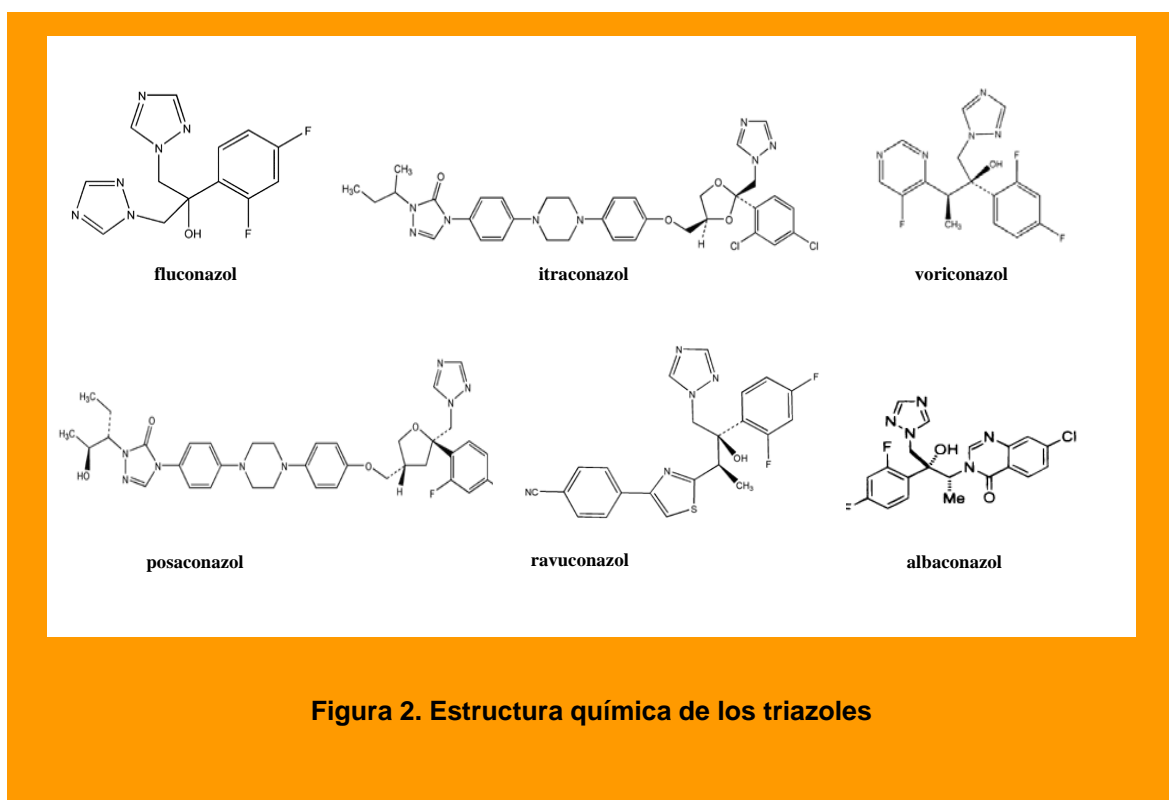


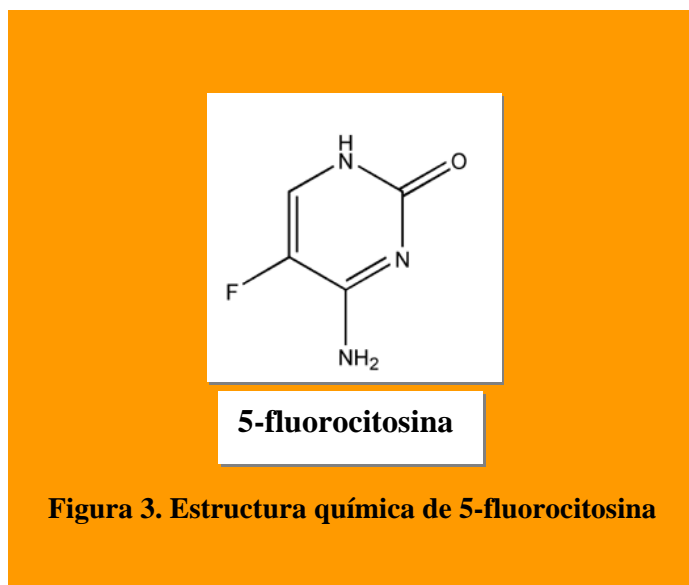
Figura 2. Estructura química de los triazoles

1.4.3. Análogos de precursores de ácidos nucleicos

Son sustancias de estructura similar a la citosina o al 5-fluorouracilo. El compuesto más representativo de este reducido grupo de antifúngicos es la 5-fluorocitosina.

1.4.3.1. 5-fluorocitosina

Este compuesto es una pirimidina fluorada (Figura 3). La penetración de este fármaco en la célula fúngica se realiza a través de una permeasa y una vez en el citoplasma es alterada enzimáticamente dando como resultado ácido 5-fluorouridílico que se incorpora al RNA interrumpiendo así la síntesis proteica. La 5-fluorocitosina puede también ser convertida en 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, un inhibidor de la síntesis de DNA y de la división nuclear. A pesar de haber demostrado eficacia contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y hongos dematiaceos causantes de cromblastomicosis (Mauceri *et al.*, 1974), su uso se encuentra limitado a la administración en combinación con anfotericina B o itraconazol en la meningitis por *Cryptococcus* (Dismukes *et al.*, 1987; Mayanja-Kizza *et al.*, 1998).



1.4.4. Equinocandinas

Las equinocandinas son polipeptidos cíclicos que bloquean la síntesis de glucano, que es el polímero que constituye el principal componente de la pared fúngica manteniendo la morfología de la célula y protegiéndola de los cambios osmóticos ambientales (Figura 4). El mecanismo de acción de las equinocandinas es la inhibición del enzima (1,3)- β -D-glucan sintasa, que es el encargado de formar los polímeros de glucano de la pared fúngica. Este enzima no se encuentra en las células animales y por este motivo constituye una buena diana.

1.4.4.1. Caspofungina

La caspofungina se encuentra comercializada para uso hospitalario y está indicada para el tratamiento de candidiasis invasoras e infecciones causadas por *Aspergillus*.

1.4.4.2. Micafungina

De uso aprobado en EEUU y Japón, las indicaciones de esta equinocandina son el tratamiento de las candidiasis esofágica y la profilaxis de las infecciones fúngicas

causadas por *Candida* spp. en pacientes con transplante de médula ósea. Presenta un espectro de acción muy similar al de la caspofungina.

1.4.4.3. Anidulafungina

En febrero del 2006, la FDA autorizó el uso de la anidulafungina en los Estados Unidos de América para el tratamiento de candidiasis esofageal y candidiasis invasivas.

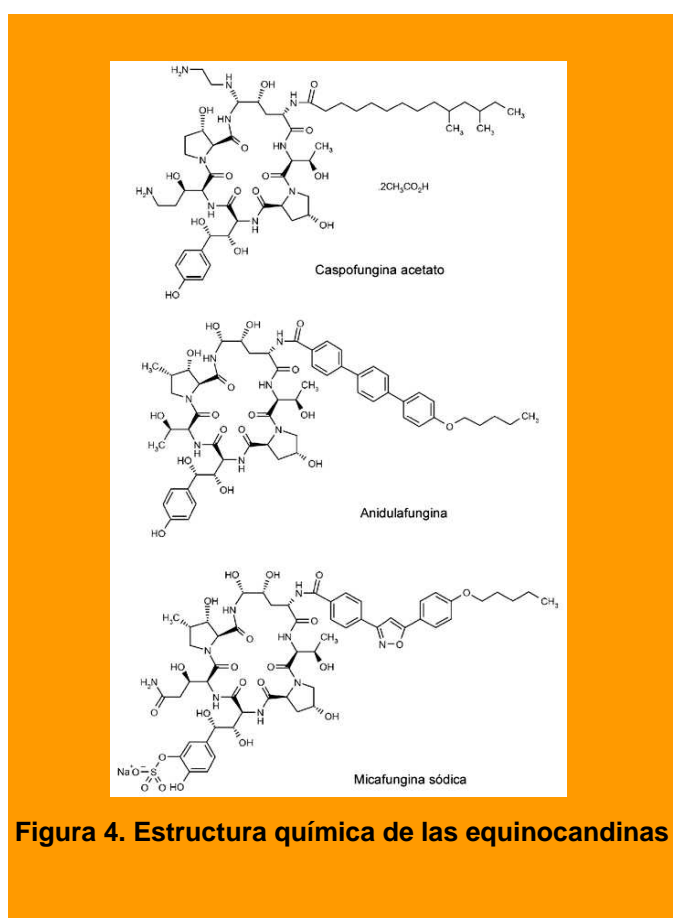


Figura 4. Estructura química de las equinocandinas

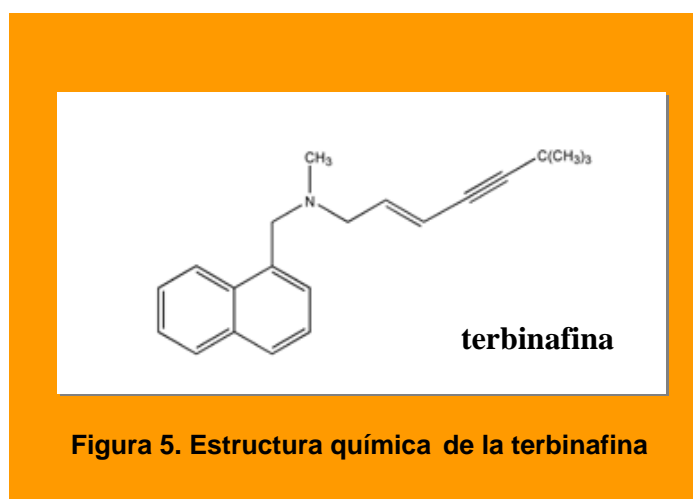
1.4.5. Alilaminas

La acción antifúngica de estas sustancias se debe al bloqueo de la ruta biosintética del ergosterol por inhibición de la escualeno epoxidasa, un enzima no dependiente del

citocromo P-450. Su efecto fungicida es debido en parte a la reducción del contenido del ergosterol de la membrana celular y a la acumulación de escualeno en el espacio plasmático. El representante más importante de esta familia es la terbinafina (Figura 5).

1.4.5.1. Terbinafina

Debido a su naturaleza altamente lipofílica, se distribuye principalmente en tejidos tales como la piel, uñas y tejido adiposo (Elewski, 1998) con lo cual su uso terapéutico se dirige principalmente al tratamiento de las dermatomicosis.



1.5. Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos

Los métodos y técnicas de estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos a los agentes antifúngicos son similares a las de los antibacterianos, y su diseño sigue las mismas directrices (Espinel-Ingroff y Shadomy 1989; Shadomy y Shadomy 1991). La técnica más utilizada para el estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos es la dilución en medio líquido (micrométodo). Mediante esta técnica se puede cuantificar la actividad del antifúngico, expresada como la CMI o mínima concentración de antifúngico capaz de inhibir el crecimiento del hongo. Así se puede evaluar la sensibilidad *in vitro* de un hongo a uno o más antifúngicos, correlacionar estos resultados con la actividad de los fármacos en estudios *in vivo* y predecir el pronóstico terapéutico. Es útil también para detectar el desarrollo de cepas resistentes y determinar el potencial valor terapéutico de un nuevo agente antifúngico (Espinel-

Ingroff, 1994). Por desgracia el proceso requerido para la estandarización de las pruebas de estudio de los antifúngicos ha sido lento, debido al gran número de variables que pueden influir en los resultados, como son: el medio de cultivo, el pH del medio, la densidad del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación (Doern *et al.*, 1986; Espinel-Ingroff y Shadomy, 1989; McGinnis *et al.*, 1991; Pfaller y Rinadi, 1992; Pujol *et al.*, 1997, Rex *et al.*, 1993; Shadomy y Shadomy 1991).

Los estudios que han evaluado las correlaciones *in vitro* – *in vivo* son muy escasos, aún así, estas pruebas han jugado un papel importante en el desarrollo de los nuevos antifúngicos, y también en las evaluaciones *in vivo* que preceden a los estudios clínicos. También ha influido el hecho que las infecciones por hongos son menos frecuentes que las infecciones bacterianas, y esto implica que haya un número inferior de datos para establecer posibles correlaciones. Tener un número suficiente de datos acumulados es lo más importante a la hora de poder establecer los puntos críticos y poder separar las cepas sensibles de las resistentes.

Los métodos para determinar la sensibilidad de los hongos *in vitro* no tuvieron relevancia alguna hasta los años 70, cuando se inició el uso de los primeros azoles. Teniendo en cuenta que el primer antifúngico se descubrió 30 años después del primer antibacteriano, y que pasaron casi 20 años antes de la introducción de la 5-fluorocitosina y de los primeros azoles, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos llevan unos 50 años de retraso respecto a las pruebas de sensibilidad a los antibióticos antibacterianos (Revankar y Graybill, 2003).

Es por este motivo que los métodos para evaluar la sensibilidad *in vitro* a los diferentes antifúngicos no fueron estandarizados en el caso de levaduras hasta el año 1997 (NCCLS M27-A) y en el caso de hongos filamentosos hasta el año 2002 (NCCLS M38-A).

1.5.1. Métodos *in vitro*

El año 1982 el NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) actualmente CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), creó un subcomité para estandarizar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Su objetivo fue unificar los criterios metodológicos, primero para las levaduras y más tarde para los hongos

filamentosos, con el fin de establecer las correlaciones entre los resultados obtenidos en el laboratorio y en clínica.

1.5.1.1. Las levaduras

La primera iniciativa del subcomité, en el año 1986, fue realizar una encuesta con la finalidad de conocer el estado de los estudios de sensibilidad *in vitro* de los antifúngicos en los Estados Unidos (Calhoun *et al.*, 1986). Los resultados de las encuestas, enviados a 350 hospitales que tenían más de 300 camas, mostraron, que aunque existía un gran interés por estas pruebas, muy pocos hospitales las realizaban, y los hospitales que las utilizaban solo lo hacían en el caso de levaduras. La mayor parte de los hospitales que realizaban estudios de sensibilidad, utilizaban el método de macrodilución en medio líquido, aunque la metodología utilizada era muy diversa.

En los años 1987, 1988, 1990, i 1993 se realizaron cuatro estudios en colaboración entre diversos laboratorios, en los cuales se fueron perfilando cuales eran las condiciones con las cuales se obtenía una mayor uniformidad en los resultados y una mayor correlación con los resultados clínicos. Los antifúngicos ensayados fueron la anfotericina B, la 5-fluorocitosina y el ketoconazol, que eran los fármacos aprobados en aquella época en los Estados Unidos para el tratamiento sistémico de les micosis. Se comenzó por comparar cuatro métodos de preparación del inóculo. El método espectrofotométrico fue el que mostró una mayor correlación de los resultados tanto intra como entre los laboratorios participantes, siendo corroborado posteriormente por otros autores (Espinel-Ingroff y Kerkering, 1991; Espinel-Ingroff *et al.*, 1992; Fromtling *et al.*, 1993; Pfaller *et al.*, 1990).

Posteriormente se evaluaron cuatro medios de cultivo: el YNB glucosado (medio con base de nitrógeno para levaduras), el H-R, el medio sintético de aminoácidos y el RPMI-1640, todos ellos tamponados con MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico) a pH 7.0, y se compararon dos temperaturas de incubación (30 y 35°C). Finalmente se estableció el criterio de lectura de las CMI para cada uno de los antifúngicos ensayados. Como resultado de todos estos estudios realizados en colaboración entre diferentes laboratorios, en el año 1992 se redactó una propuesta, el documento M27-P. Durante los cuatro años siguientes (1992-1996), se establecieron los rangos de referencia de las CMI de los antifúngicos disponibles para las dos cepas control. Además se establecieron las condiciones que se deberían utilizar para el método de

microdilución y el de macrodilución. Esta información se incluyó en una versión revisada y publicada en el año 1995 (M27-T). En una revisión posterior el subcomité centró su atención en desarrollar puntos de corte significativos para los diferentes antifúngicos, (Rex *et al.*, 1997) y se incluyeron en el documento M27-A publicado el año 1997 (NCCLS M27-A). A partir de aquel momento, el subcomité estableció rangos de referencia para las CMI_s leídas a 24 y 48 horas para todos los antifúngicos, tanto los tradicionales como algunos de los nuevos (Barry *et al.*, 2000). Los resultados de este estudio están recogidos en el documento M27-A2 actual. Sin embargo, este presenta varias limitaciones ya que sólo incluye a *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*, y no está aún extensamente validado para las formas levaduriformes de hongos dimórficos ni para otras levaduras no comunes. Además, los únicos puntos de corte que se han descrito en el documento han sido para el fluconazol, el itraconazol y la 5-fluorocitosina y sólo se han podido establecer para *Candida* spp. ya que se dispone de suficientes datos clínicos. Stone *et al.*, (2002) propuso un punto de corte para la caspofungina (≥ 1 , R). Posteriormente, Pfaller *et al.*, 2006 (CLSI Subcomité, reunión en enero 2005) proponen unos puntos de corte para el voriconazol y *Candida* spp. (≤ 0.25 , S; 0.5-2, SDD; ≥ 4 , R). Actualmente, aunque se están estudiando, no existen aún puntos de corte para la micafungina, la anidulafungina, el albaconazol y el ravuconazol.

1.5.1.2. Los hongos filamentosos

Tomando como partida las condiciones básicas acordadas en el documento M27-A, el subcomité del CLSI formó un grupo para realizar estudios, recoger datos, y poner a punto la metodología para poder realizar los estudios de sensibilidad con los hongos filamentosos. Espinel-Ingroff y Kerkering en un estudio publicado el año 1991 evaluaron el método espectrofotométrico para la preparación de las suspensiones de conidios que constituían el inóculo en el caso de los hongos filamentosos (Espinel y Kerkering, 1991). Se ensayaron 25 cepas de hongos filamentosos incluyendo *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix schenckii*. Se establecieron los rangos de % de transmitancia a los cuales se tenía que ajustar las suspensiones de conidios de cada género teniendo en cuenta la medida de los conidios de los diferentes hongos filamentosos. El medio de cultivo que el subcomité evaluó como medio de referencia potencial para realizar los estudios de sensibilidad fue el RPMI 1640, porque había dado buenos resultados en los estudios por levaduras. El subcomité evaluó

también otros medios, pero fue el RPMI el que permitió identificar la posible resistencia de cepas de *Aspergillus* al itraconazol (Denning *et al.*, 1997). Para preparar el inóculo se utilizaron los procedimientos previamente aprobados para las levaduras en el documento M27.

Posteriormente el subcomité del CLSI propuso un estudio multicéntrico para evaluar por un lado el método para la preparación de suspensiones de conidios recomendado por Espinel y Kerkering (1991), y por otro lado, para comparar los métodos de macro y microdilución en la determinación de la actividad *in vitro* de los antifúngicos frente a los hongos filamentosos (Espinel-Ingroff *et al.*, 1995). Participaron seis laboratorios y se utilizaron 25 cepas pertenecientes a las especies *Aspergillus flavus* y *A. fumigatus*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix schenckii*. La concentración de los inóculos formados por suspensiones de conidios se ajustó con la ayuda de un espectrofotómetro a un valor de transmitancia diferente para cada especie estudiada, y que en general oscilaba entre el 68 y el 82%. Se utilizó el medio RPMI 1640, la temperatura de incubación fue de 35°C y la concentración del inóculo utilizado en ambos métodos fue de aproximadamente 10^4 ufc/ml, en lugar del recomendado para levaduras que es de 10^3 ufc/ml. Los valores de CMI para la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el miconazol y el ketoconazol, en ambos métodos, fueron determinados a las 24 horas de incubación en el caso de *Aspergillus* spp. y *Rhizopus arrhizus* y de 72 horas para los demás. La reproducibilidad (± 2 diluciones) de los resultados que se obtuvieron para los métodos de macro y microdilución fue alta tanto intra como entre los laboratorios participantes y para todos los antifúngicos ensayados, con excepción del itraconazol.

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

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

referencia que, con ligeras variaciones, dio lugar al documento definitivo M38-A en el año 1998.

El método descrito en el documento M38-A hace referencia a un número muy limitado de géneros de hongos filamentosos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallescheria boydii*, y la forma filamentosa del hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*), no incluyéndo a los hongos dermatofitos, *Chaetomium* spp., *Paecilomyces* spp., ni a *Scedosporium* spp., entre otros. Posteriormente a la publicación del documento aprobado, se han realizado más estudios colaborativos para encontrar las condiciones más idóneas para determinar la sensibilidad de hongos poco comunes a los antifúngicos clásicos y también a los de reciente introducción (Espinel-Ingroff *et al.*, 2001; Espinel-Ingroff *et al.*, 2002).

1.5.2. Métodos *in vivo*. Modelos experimentales

En las primeras fases de desarrollo de un antifúngico (fase preclínica), los estudios *in vitro* son útiles para determinar su eficacia en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. Estos estudios determinaran el potencial valor terapéutico del antifúngico. Posteriormente los ensayos en cultivos celulares permitirán evaluar su potencial carcinogénico así como otros efectos tóxicos. Antes de llevar a cabo los estudios clínicos es imprescindible realizar estudios preclínicos con modelos animales.

Para demostrar la eficacia terapéutica del antifúngico es necesario desarrollar previamente un modelo animal que emule el proceso de la enfermedad infecciosa observada en clínica humana. La eficacia de la terapia se puede evaluar mediante la prolongación de la supervivencia de los animales infectados y/o la reducción de la carga fúngica detectable en los órganos, así como con el estudio histopatológico (Graybill *et al.*, 1986). El animal de experimentación es seleccionado de acuerdo a la farmacocinética y a la toxicidad del antifúngico en estudio.

El animal más utilizado en el ensayo de nuevos compuestos antifúngicos es el ratón debido a la facilidad de su manejo, adquisición y mantenimiento, y a la similitud, en muchos casos, de la evolución de la infección con las observaciones realizadas en humanos (Graybill, 2000).

Introducción

La rata, el conejo o el cobaya son los animales de elección en las ocasiones en las que el ratón no se puede utilizar para la experimentación, dada la farmacocinética del antifúngico, o bien cuando es necesario contrastar los resultados con los obtenidos en otros animales de experimentación.

Los modelos animales sirven también para el estudio de las propiedades farmacocinéticas del compuesto, tales como la vía de administración, la distribución en los tejidos, su eliminación, y las posibles interacciones con otros fármacos. Finalmente, los modelos animales sirven para determinar la tolerancia y toxicidad del producto.

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

2. INTERÉS Y OBJETIVOS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

Las terapias utilizadas actualmente para el tratamiento de infecciones fúngicas invasoras causadas por levaduras oportunistas están lejos de ser las óptimas. Estas infecciones afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos, dando lugar a tasas de mortalidad muy elevadas. Aunque varias especies de *Candida* son las responsables del mayor porcentaje de infecciones fúngicas invasoras causadas por levaduras oportunistas, otros géneros, como *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Blastoschizomyces* ocasionan también infecciones de incidencia creciente y de difícil tratamiento. Por estos motivos, el objetivo principal de esta tesis ha sido **contribuir al desarrollo experimental de nuevos tratamientos frente a infecciones invasoras causadas por levaduras oportunistas emergentes o a la mejora de los tratamientos ya existentes.**

El tratamiento empírico de estas micosis invasoras se basa en el empleo del fluconazol y la anfotericina B sola o asociada a la 5-fluorocitosina. Sin embargo el aumento del número de cepas resistentes al fluconazol y la toxicidad de los otros dos antifúngicos citados, plantean la necesidad de estudiar nuevas estrategias terapéuticas. Por ello en esta tesis se ha evaluado la actividad *in vitro* e *in vivo* frente a levaduras oportunistas de relevante y creciente importancia clínica, de nuevos antifúngicos tales como el voriconazol (Pfizer), el ravuconazol (Briston-Myers Squibb), el albaconazol (Uriach) y la micafungina (Astellas), así como de asociaciones de los mismos con antifúngicos tradicionales,

La utilización de los modelos animales adecuados para determinar la efectividad de estas moléculas está en función de la farmacocinética del antifúngico. Es por ello que hemos tenido que desarrollar un modelo animal adecuado para cada antifúngico y para cada especie fúngica.

Diferentes especies del género *Trichosporon* causan infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos, con una tasa de mortalidad más elevada que la ocasionada por la candidiasis sistémica, siendo *T. asahii* la más frecuente. Las especies del género *Trichosporon* presentan una baja sensibilidad a la anfotericina B y a las equinocandinas, y aunque experimentalmente los azoles parecen poseer una buena eficacia, se han descrito casos de tricosporonosis en pacientes sometidos a tratamiento profiláctico con itraconazol. Por todo ello un objetivo de la tesis ha sido **evaluar experimentalmente la eficacia de nuevos antifúngicos frente a *T. asahii*.**

Los puntos concretos de este objetivo son:

- Determinar la actividad *in vitro* de los nuevos antifúngicos y también de los clásicos, así como de sus combinaciones, frente a *T. asahii*.
- Desarrollar un modelo de infección diseminada por *T. asahii* en el ratón para poder evaluar la eficacia de la anfotericina B, el fluconazol y la micafungina así como de la terapia combinada (micafungina / anfotericina B y micafungina / fluconazol).
- Desarrollar un modelo de infección diseminada por *Trichosporon asahii* en el cobaya y evaluar en el mismo la eficacia de la terapia con el voriconazol.

Blastoschizomyces capitatus es también un hongo oportunista emergente que afecta a pacientes inmunocomprometidos. La tasa de mortalidad es del 50% en pacientes con leucemia aguda y del 90% en pacientes con neutropenia profunda. El tratamiento de elección consiste en la administración de la anfotericina B sola o asociada con 5-fluorocitosina seguido de la administración de fluconazol o de nuevos antifúngicos. No obstante, la aparición de cepas resistentes al fluconazol, y la toxicidad de la anfotericina B y de la 5-fluorocitosina hacen necesario el estudio de nuevas terapias. Además no existe ninguna publicación donde se describa un modelo animal de infección diseminada por *B. capitatus* que pueda ser útil para estudiar la eficacia de diversos tratamientos. Es por ello que otro objetivo de la presente tesis ha sido **desarrollar un modelo animal repetible de blastosquizomicosis diseminada y evaluar en él la eficacia de diferentes tratamientos antifúngicos.**

Concretamente:

- Desarrollar un modelo de infección diseminada por *B. capitatus* en el ratón para poder evaluar la eficacia de los antifúngicos de uso clínico tradicional y los de reciente aparición.
- Determinar la eficacia la anfotericina B en combinación con la micafungina, la 5-fluorocitosina y el voriconazol en el tratamiento de la blastosquizomicosis sistémica en el ratón.

La criptococosis es una causa de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en infectados por el VIH. El tratamiento de elección, incluyendo la afectación del sistema nervioso central, se basa en el uso de la anfotericina B, la 5-fluorocitosina, y el fluconazol. Como ya hemos comentado anteriormente la aparición de cepas resistentes al fluconazol, y la toxicidad de la anfotericina B y de la 5-fluorocitosina hacen necesario el estudio de nuevas terapias. Es por todo ello, que otro objetivo de esta tesis ha sido **evaluar experimentalmente la eficacia de nuevos tratamientos frente a las especies de *Cryptococcus* de mayor relevancia en clínica.**

Concretamente:

- Determinar la actividad *in vitro* de combinaciones de antifúngicos tradicionales y de reciente introducción frente a las cuatro especies de *Cryptococcus* (*C. neoformans*, *C. gattii*, *C. albidus*, y *C. laurentii*) de mayor importancia clínica.
- Desarrollar un modelo de criptococosis cerebral producida por *C. neoformans* en el ratón para poder evaluar la eficacia de la terapia con el voriconazol.

Otros géneros de levaduras, como *Sporobolomyces* y *Rhodotorula* causan también infecciones graves y refractarias a los tratamientos en pacientes inmunocomprometidos, aunque con una incidencia inferior a la de las especies citadas anteriormente. Otro objetivo de la presente tesis ha sido **evaluar la eficacia de nuevos antifúngicos frente a levaduras oportunistas poco comunes.**

Concretamente:

- Determinar la actividad *in vitro* de combinaciones de antifúngicos tradicionales y de reciente desarrollo, frente a diversas cepas de *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*.

Candida spp. constituyen la mayor causa de infecciones nosocomiales oportunistas de elevada mortalidad producidas por hongos. A pesar de que *Candida albicans* sigue siendo la de mayor incidencia, otras especies del género son importantes y frecuentes agentes etiológicos de candidiasis diseminada. La anfotericina B es el antifúngico más utilizado en el tratamiento de la candidiasis invasiva, pero su toxicidad limita su uso. El

fluconazol es otro antifúngico recomendado para el tratamiento de candidiasis, pero muestra una actividad variable frente a las especies de *Candida no-albicans*, especialmente *C. glabrata* y nula frente a *C. krusei*. Las equinocandinas, una clase de antifúngicos con nuevas dianas de acción, constituyen otra opción recomendada para el tratamiento de las candidiasis. Es por ello que otro objetivo de la tesis ha sido **evaluar la eficacia de nuevos antifúngicos frente a siete especies de *Candida* de importancia clínica.**

Concretamente:

- Determinar la actividad *in vitro* de la combinación de micafungina y anfotericina B frente a siete de las especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*) de mayor importancia clínica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIOS *IN VITRO*

3.1.1. Cepas

Para efectuar las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, se seleccionó un total de 192 cepas correspondientes a 16 especies de levaduras oportunistas de interés clínico (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de cepas de hongos ensayadas en los diferentes estudios <i>in vitro</i> y su origen		
Especie (nº de cepas ensayadas)	Procedencia	(Nº de cepas)
<i>Blastoschizomyces capitatus</i> (6)	IHEM	6
<i>Candida albicans</i> (20)	ACIA	2
	HSJ	5
	ACIA	13
<i>C. dubliniensis</i> (20)	ACIA	20
<i>C. glabrata</i> (15)	HSJ	15
<i>C. krusei</i> (21)	HSJ	10
	ACIA	10
	ATCC 6258	1
<i>C. lusitaniae</i> (10)	ACIA	10
<i>C. parapsilosis</i> (16)	HSJ	10
	ACIA	5
	ATCC 22019	1
<i>C. tropicalis</i> (15)	HSJ	15
<i>Cryptococcus albidus</i> (10)	IHEM	10
<i>C. gattii</i> (10)	FMR	10
<i>C. laurentii</i> (7)	IHEM	7
<i>C. neoformans</i> (10)	FMR	10

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

Especie (nº de cepas ensayadas)	Procedencia	(Nº de cepas)
<i>Rodothorula glutinis</i> (10)	FMR	10
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (10)	IHEM	3
	CBS	2
	FMR	5
<i>Trichosporon asahii</i> (10)	IHEM	4
	CBS	6
<i>T. mucoides</i> (2)	IHEM	2

ACIA, Asesoría científica y de Investigación aplicada, Dep. de Microbiología, Barcelona, España

HSJ, Hospital Sant Joan de Reus, Reus, España

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

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

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda

ATCC, American type culture collection, Manassas, USA

3.1.2. Conservación de las cepas

Las cepas de levaduras fueron liofilizadas y también fueron mantenidas a 4°C en tubos de agar patata y dextrosa (PDA) inclinado. Para la obtención del inóculo, las cepas se subcultivaban en placas de agar Sabouraud y se incubaban a 37°C durante 24-72 horas, dependiendo de la especie.

3.1.3. Agentes antifúngicos

Los antifúngicos ensayados en las pruebas *in vitro* fueron la micafungina (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japón), la anfotericina B (USP, Rockville, MD), el fluconazol (Pfizer Inc., Madrid, España), el itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica), el voriconazol (Pfizer Inc., Madrid, España), el ravuconazol (Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, NJ), el albaconazol (J. Uriach & Cía, Barcelona, España) y la terbinafina (Novartis, Basel, Suiza).

Tabla 2. Antifúngicos ensayados *in vitro* en los diferentes estudios

Antifúngicos	Procedencia	Forma de presentación	Disolvente	Conservación
Anfotericina B	Squibb Industria, Farmacéutica, Barcelona, España	Pureza: 99.8%. Sustancia en polvo	DMSO	Temperatura ambiente
Fluconazol	Pfizer, Madrid, España	Pureza: 98.5%. Sustancia en polvo	Agua destilada	Temperatura ambiente
Itraconazol	Janssen, Pharmaceutica, Beerse, Bélgica	Pureza: 100%. Sustancia en polvo	DMSO	Temperatura ambiente
Voriconazol	Pfizer, Madrid, España	Pureza: 100%. Sustancia en polvo	DMSO	Temperatura ambiente
Ravuconazol	Squibb Industria, Farmacéutica, New Brunswick, N. J., USA	Pureza: 99 %. Sustancia en polvo	DMSO	Temperatura ambiente
Albaconazol	Uriach S. A., Barcelona, España	Pureza: 99.8%. Sustancia en polvo	DMSO	Temperatura ambiente
Micafungina	Astellas Pharma Inc., Tokio, Japan	Pureza: 100%. Sustancia en polvo	Agua destilada	Temperatura ambiente
Terbinafina	Novartis-Pharma AG, Basel, Suiza	Pureza: 100%. Sustancia en polvo	DMSO	Guardar en nevera (-20°C)
5-fluorocitosina	Sigma-Aldrich Corp., Sant Louis, M.O.	Pureza: 100%. Sustancia en polvo	Agua destilada	Guardar en nevera (-20°C)

3.1.4. Metodología

Para estudiar la sensibilidad de las levaduras a diferentes antifúngicos, se siguió el protocolo recomendado por el “Clinical Laboratory Standard Intitute” (CLSI), documento M24-A2.

3.1.4.1. Preparación de las microplacas de antifúngicos

Los antifúngicos ensayados con sus respectivos disolventes se describen en la Tabla 2. El proceso seguido fue:

Preparación de la solución madre del antifúngico

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

Preparación del gradiente de concentraciones

A partir de la solución madre (1600 µg/ml en el ejemplo de la Figura 6) se preparó un banco de diluciones dobles progresivas siguiendo el esquema de la Figura 6. Posteriormente se diluyó el contenido de cada tubo en medio RPMI en la proporción 1:50 y se dispensaron 100 µl de cada dilución en cada uno de los pocillos de una columna empezando por la columna 1 en orden de mayor a menor concentración. Las dos últimas columnas se rellenaron con RPMI + 2% de DMSO. Estas dos columnas se utilizaran como control negativo (control de esterilidad del medio) y como control positivo (control de crecimiento del hongo).

Las concentraciones de antifúngico ensayadas fueron: de 0.03 a 16 µg/ml en el caso de la anfotericina B, el itraconazol, el voriconazol, el ravuconazol, el albaconazol, y la terbinafina. En el caso del fluconazol el rango de concentraciones fue de 0.25 a 128 µg/ml, y de 0.12 a 64 µg/ml para la micafungina.

Una vez preparadas las microplacas se sellaron para evitar la evaporación del líquido y se guardaron en el congelador a -20° C un máximo de seis meses. El día del ensayo, las microplacas se descongelaron a temperatura ambiente y se dispensaron 100 µl de inóculo en cada pocillo, con excepción del correspondiente al control de esterilidad del medio. Las microplacas se incubaron a 35° C durante 24-72 horas dependiendo de la especie de levadura estudiada.

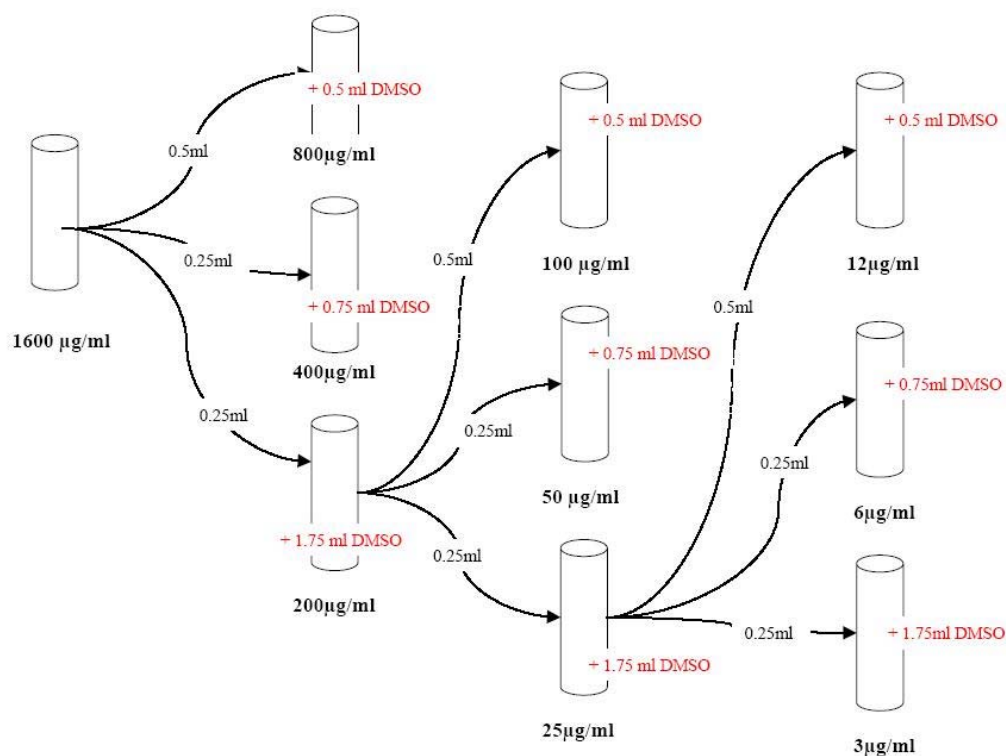


Figura 6. Esquema del banco de diluciones utilizado para realizar los ensayos *in vitro*.

3.1.4.2. Preparación de las microplacas de combinaciones antifúngicas

Se preparó un gradiente de concentraciones para cada uno de los antifúngicos utilizados siguiendo el método descrito por el CLSI documento M27-A2. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo cóncavo. El volumen final fue de 100 µl en todos los pocillos de las microplacas. Se estudiaron un total de cinco combinaciones de antifúngicos, que se dispusieron en filas o en columnas en las microplacas para acabar formando un gradiente doble de concentraciones en forma de tablero de ajedrez (Figura 7).

Micafungina. Se utilizó un gradiente de concentraciones de 32 a 0.06 µg/ml dispensándose 50 µl en los pocillos de las columnas 2-11 de la microplaca para todas las combinaciones.

Itraconazol, voriconazol y ravuconazol. Se utilizó un gradiente de concentraciones de 8 a 0.12 µg/ml dispensándose 50 µl en los pocillos de las filas de la A a la G.

Fluconazol. Se utilizó un gradiente de concentraciones de 64 a 1 $\mu\text{g/ml}$ dispensándose 50 μl en los pocillos de las filas de la A a la G.

Anfotericina B. Se utilizó un gradiente de concentraciones de 4 a 0.06 $\mu\text{g/ml}$ dispensándose 50 μl en los pocillos de las filas de la A a la G.

En la columna 1 (filas de la A-G) de cada microplaca, se dispensó un único antifúngico (micafungina) para establecer la CMI del antifúngico solo.

En la fila H (columnas de la 2-11) de cada microplaca, se dispensó un único antifúngico (itraconazol, voriconazol, ravuconazol, fluconazol o anfotericina B) para establecer la CMI del antifúngico solo.

Los pocillos de la última columna (A12-G12) se destinaron al control positivo (crecimiento del hongo en ausencia de antifúngicos). Los pocillos H1 y H12 se destinaron al control negativo (control de esterilidad del medio de cultivo).

Anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol o ravuconazol solo

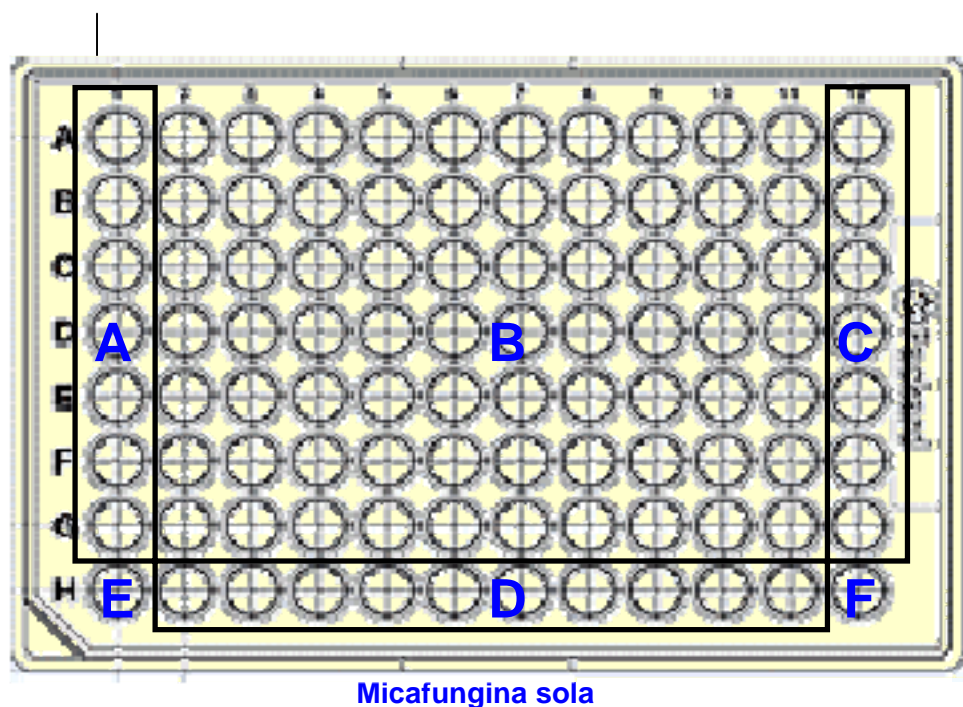


Figura 7. Esquema de la distribución de las diferentes concentraciones de antifúngicos en una placa de combinaciones de antifúngicos. Se definen 6 zonas: A) zona donde se encuentra únicamente el antifúngico que se ha dispensado en las filas, B) zona de combinaciones de los dos antifúngicos en forma de tablero de ajedrez, C) zona con solo RPMI utilizada como control positivo (control de crecimiento del hongo), D) zona donde se encuentra únicamente el antifúngico que se ha dispensado en las columnas, E y F) control de esterilidad del medio.

3.1.4.3. Definiciones

- **CMI (concentración mínima inhibitoria):**

Para la anfotericina B, la terbinafina y la micafungina, la CMI se definió como la menor concentración de antifúngico que provocaba un 100% de inhibición del crecimiento fúngico después de 24, 48 o 72 horas de incubación, dependiendo de la levadura estudiada.

Para los azoles, y a partir del 2006 también para la micafungina, la CMI se definió como la menor concentración que provocaba un 50% de inhibición del crecimiento fúngico, comparado con el control, después de 24, 48 o 72 horas de incubación, dependiendo de la levadura estudiada.

- **CME (concentración mínima efectiva):**

Fue determinada para *T. asahii*, y se definió como la concentración más baja del antifúngico que produjo cambios morfológicos en las hifas. Macroscópicamente la CME fue reconocida por la presencia de colonias muy compactas y redondas en los pocillos de la microplaca. Las lecturas de CME se realizaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Para el estudio de las interacciones entre antifúngicos, se utilizó el índice de concentración inhibitoria fraccionada (FICI) que nos permite clasificar las interacciones en sinérgicas, indiferentes o antagonistas.

El FICI corresponde a la suma de los FIC de cada antifúngico. El FIC se define como la CMI de cada antifúngico cuando actúa en combinación dividido por la CMI del antifúngico cuando actúa solo.

$$\text{FICI} = \frac{\text{CMI de A en combinación}}{\text{CMI de A solo}} + \frac{\text{CMI de B en combinación}}{\text{CMI de B solo}}$$

Se definió la interacción como sinérgica si el FICI era ≤ 0.5 , indiferente si $0.5 < \text{FICI} \leq 4$, y antagonista si $\text{FICI} > 4$.

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

Los inóculos se prepararon suspendiendo en 10 ml de solución salina fisiológica estéril dos o tres colonias de levaduras a partir de un cultivo en placa en medio de Sabouraud a las 24 a 72 horas de incubación, según la especie de levadura estudiada. Si las levaduras producían pseudohifas o hifas verdaderas se filtraba esta solución con una gasa estéril para eliminarlas. La suspensión se ajustaba con la cámara de Neubauer a 1×10^6 - 5×10^6 levaduras/ml (tubo 1). La concentración y la viabilidad del inóculo se verificaban sembrando 100 μ l de las diluciones 1:1000 y 1:10000 del mismo en placas de Sabouraud.

En cada pocillo de las placas conteniendo los antifúngicos se dispensaban 100 μ l de una dilución 1/1000 del inóculo en RPMI.

Siguiendo las recomendaciones del documento M-27A2, en cada ensayo se incluyeron las cepas control:

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

3.2. ESTUDIOS *IN VIVO*

3.2.1. Cepas

Para las pruebas de sensibilidad in vivo a los antifúngicos, se seleccionaron diferentes cepas pertenecientes a diferentes especies de levaduras (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de las cepas utilizadas en estudios in vivo	
<i>Trichosporon asahii</i>	
IHEM 17910	Hemocultivo de un paciente con aplasia medular posthepatitis.
IHEM 17911	Hemocultivo de un paciente con leucemia linfocítica aguda.
IHEM 9325	Ambiental
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	
IHEM 5666	Hemocultivo de un paciente con leucemia aguda
IHEM 16105	Espuito de un paciente con fibrosis quística
<i>Cryptococcus neoformans</i>	
FMR 8398	Clínica. Procedente de Brasil.
FMR 8411	Clínica. Procedente de Brasil.
FMR 8409	Clínica. Procedente de Brasil.

3.2.2. Animales de experimentación

Para el desarrollo de los modelos experimentales de infección diseminada causada por levaduras y de su tratamiento, se utilizaron diferentes animales:

- Ratones machos OF-1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) de 30 gramos de peso para la mayoría de experimentos. Para el desarrollo del modelo experimental de inoculación intracerebral se utilizaron ratones de 14 gramos de peso.
- Cobayas machos Hartley (Charles River, Criffa S. A. Barcelona) de 500 gramos de peso.

Todos los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rovira i Virgili. Los animales se estabularon en condiciones estándar con acceso libre a la comida y a la bebida.

Los animales se supervisaban diariamente atendiendo especialmente los siguientes aspectos:

- Aspecto del animal (pelo liso y brillante o piloerección).
- Postura (normal o encorvado).
- Secreciones (nasal, diarrea,...).
- Convulsiones.
- Locomoción (movimientos repentinos y rápidos, ataxia,...)
- Comportamiento no provocado (vocalizaciones, auto-mutilaciones...)
- Comportamiento en respuesta a estímulos (agresividad, estado comatoso).

La eutanasia por sufrimiento de los animales se realizaba por inhalación de CO₂. Al final del estudio los animales supervivientes eran sacrificados por este procedimiento.

3.2.3. Inmunosupresión

Se utilizaron dos pautas diferentes de inmunosupresión:

- **Combinación de ciclofosfamida con 5-fluorouracilo.** La ciclofosfamida se administraba en dosis única de 200 mg/Kg intraperitonealmente y el 5-fluorouracilo en dosis única de 150 mg/Kg por vía intravenosa. Ambos fueron administrados el mismo día de la infección (día 0). Esta pauta de inmunodepresión sólo se empleó en los estudios realizados en el ratón.
- **Ciclofosfamida.** En los estudios realizados en el cobaya, se utilizó la ciclofosfamida a dosis de 100 mg/kg, comenzando el día -3 y continuando la administración cada 2 días.

3.2.4. Infección

Preparación del inóculo

Los inóculos se prepararon suspendiendo en 10 ml de solución salina fisiológica estéril varias colonias de levaduras a partir de un cultivo en placa en medio de Sabouraud a las 24 a 72 horas de incubación, según la especie de levadura estudiada. Si las levaduras producían pseudohifas o hifas verdaderas, la suspensión se filtraba a través de una gasa estéril para eliminarlas. La suspensión se ajustaba con ayuda de la

cámara de Neubauer al inóculo deseado. La concentración y la viabilidad del inóculo se verificaban siempre sembrando las diluciones adecuadas en placas de Sabouraud.

Vía de administración

La metodología para producir la infección en los animales se estableció en función del modelo experimental empleado. Para ello utilizamos diferentes vías de inoculación.

- Para el establecimiento de la tricosporonosis y blastosquizomicosis sistémicas en ratón, los inóculos se administraron intravenosamente a través de la vena lateral de la cola. En el caso de la tricosporonosis en cobayas, la inoculación se realizó a través de la vena lateral del pene.
- Para establecer el modelo de criptococosis cerebral se usó la punción intracraneal a través de la fontanela, previa anestesia de los animales.

3.2.5. Antifúngicos

Los antifúngicos empleados en los tratamientos experimentales se muestran en la Tabla 4.

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

Antifúngicos	Procedencia	Disolvente
Anfotericina B	Fungizona [®] Squibb Industria farmacéutica, Madrid, España.	solución glucosada al 5%
Fluconazol	Pfizer, Madrid, España	solución salina fisiológica
Voriconazol	Pfizer, Madrid, España	polietilenglicol 200
Voriconazol	Vfend [®] Pfizer, Ltd., Sandwich, Reino Unido	solución salina fisiológica
Micafungina	Astellas Pharma Inc., Tokio, Japan	solución salina fisiológica
5-fluorocitosina	Sigma-Aldrich Corp., Sant Louis, M.O.	agua destilada estéril

3.2.6. Tratamientos y vías de administración

Los tratamientos se iniciaron el mismo día de la infección (día 0) o 24 horas después de la misma (día 1). En la tabla 5 se muestran las vías de administración para cada uno de los antifúngicos utilizados en los diferentes tratamientos.

Tabla 5. Relación de las vías de administración de antifúngicos y volúmenes administrados según el modelo animal desarrollado			
Sustancia activa	Animal	Vía de administración	Volumen administrado
Micafungina	Ratones OF-1, 30 g	Subcutánea	0.1 ml
Fluconazol	Ratones OF-1, 30 g	Oral	0.1 ml
Anfotericina B	Ratones OF-1, 30 g	Intraperitoneal	0.2 ml
Voriconazol	Ratones OF-1, 30 g	Oral	0.1 ml
	Ratones OF-1, 14 g	Oral	0.1 ml
	Cobayas 500 g	Oral	1 ml
5-fluorocitosina	Ratones OF-1, 14 g	Oral	Aprox. 4ml/día/ratón

- **Vía intravenosa:** usada para la administración del 5-fluorouracilo en las pautas de inmunosupresión en el ratón. Se utilizaron agujas del calibre 30 G x ½. La inyección se realizó a través de una de las venas laterales de la cola.
- **Vía intraperitoneal:** usada para la administración de la anfotericina B y de la ciclofosfamida en el ratón y en el cobaya. Se utilizaron agujas del calibre 26 G x ½. La punción se realizó en la zona inferior y lateral del abdomen del animal inmovilizado en posición de Trendelenburg.
- **Vía subcutánea:** usada para la administración de la micafungina. Se usaron agujas del calibre 30 G x ½, inyectando perpendicularmente a través de un pellizco de la piel en la zona de la nuca.
- **Vía respiratoria:** usada para la administración del halotano como anestésico o como método de eutanasia por sobredosisificación.

- **Vía oral:** usada para la administración del fluconazol, el voriconazol y la 5-fluorocitosina. Los dos primeros se administraban a través de una cánula esofágica. La 5-fluorocitosina se añadió al agua de bebida, calculando que cada ratón bebe aproximadamente 4 ml de agua al día.

3.2.7. Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado

El método de sacrificio utilizado siempre fue el más adecuado al peso del animal y el menos traumático para el mismo. En la Tabla 6 se resumen los métodos utilizados para el sacrificio de los diferentes animales utilizados en experimentación.

Tabla 6. Métodos de eutanasia aplicados en función del modelo animal utilizado

Animal (peso)	Método de eutanasia
Ratón (25-35 g)	Dislocación cervical
	Anoxia por inhalación de CO₂
	Sobredosificación de halotano por inhalación
Cobayas (500-600 g)	Sobredosificación de pentotal sódico i.p. (0.3g/animal)

Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los órganos diana utilizando material quirúrgico estéril. Se estudiaron riñón, bazo, hígado, pulmón y cerebro. Se dispensaba solución salina estéril en tubos estériles de 10 ml de capacidad, a razón de 1 ml por tubo, procediendo al tarado de los mismos. Se introducía en el tubo correspondiente el órgano, se pesaba el tubo y se homogenizaban los órganos con varillas de vidrio estériles. Se realizaban diluciones seriadas 1:10 de los homogenizados y se sembraban en placas de Sabouraud que se incubaban a 37°C, procediéndose al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48-72 horas de incubación. La carga fúngica en los órganos se expresaba en UFC/g según la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{UFC/ml} \times (\text{peso del \acute{o}rgano} + 1\text{ml utilizado para homogenizar})^*}{\text{Peso del \acute{o}rgano}}$$

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

3.2.8. Análisis estadístico

Para la realización de los diferentes estudios estadísticos se utilizó el paquete de programas estadísticos SPSS para Windows en las versiones 11.0 y 11.5 y Graph Pad Prism versión 4.0 para Windows

Método de Kaplan Meier. Este método permite calcular el Tiempo Medio de Supervivencia (TMS) para un grupo de ratones. Tiene en cuenta los animales que quedan vivos al final del estudio y también que día han muerto los animales que no sobreviven hasta el final del período de observación. Una vez calculados los TMS para cada grupo, se utiliza el Log-rank test para comparar los TMSs de los diferentes grupos entre sí o respecto al grupo control y establecer que grupos son estadísticamente diferentes y cuales se han de considerar iguales.

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

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

3.2.9. Histopatología

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

Deshidratación de las muestras

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

Parafinado

Una vez eliminado el alcohol de los tejidos, se procedía a la inclusión de las muestras en una mezcla de parafina blanda y xilol a partes iguales durante una hora y posteriormente en xilol saturado de parafina. Para obtener un parafinado óptimo, las muestras se dejaban 8 horas en parafina blanda (a 50 – 55 °C). Luego se introducían las piezas en parafina de punto de fusión de 56 – 58 °C durante 4 horas a 60°C hasta conseguir la total impregnación de los tejidos. El colado de los bloques de parafina se realizaba en cubetas de plástico.

Realización de cortes histológicos

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

Desparafinado y rehidratación de las muestras

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

Tinción de las muestras

Las técnicas de tinción empleadas fueron:

- Hematoxilina-eosina (H-E). En las muestras teñidas con dicha tinción, el citoplasma celular, las sustancias hialinas, amiloides y el colágeno presentaban color rosado. Las estructuras fúngicas, los núcleos celulares y sustancias mucoides se teñían de color morado oscuro.
- Ácido periódico de Schiff (PAS). Los núcleos celulares se teñían de color morado, mientras que los mucopolisacáridos y las estructuras fúngicas presentaban un color rojo.
- Nitrato de metenamina argéntica de Grocott (GMS). Los tejidos adoptaban una coloración verde y las células fúngicas color negro.

4. RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

4.1. Sensibilidad *in vitro* de levaduras oportunistas a los antifúngicos.

In vitro antifungal susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts.
Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Capilla J, Nolard N, and Guarro J.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004, 48:2724-2726.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

In Vitro Antifungal Susceptibilities of Uncommon Basidiomycetous Yeasts

Carolina Serena,¹ Francisco Javier Pastor,¹ Montserrat Ortoneda,¹
Javier Capilla,¹ Nicole Nolard,² and Josep Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat
Rovira i Virgili, Reus, Spain,¹ and Scientific Institute of
Public Health, Brussels, Belgium²

Received 22 December 2003/Returned for modification 24 January 2004/Accepted 5 March 2004

The in vitro activities of eight antifungal drugs against 50 isolates of basidiomycetous yeasts were determined by a microdilution method. In general fluconazole and micafungin were inactive. Terbinafine was active only against *Sporobolomyces salmonicolor*. The activities of the other antifungals were variable and depended on the species tested. The new triazoles showed the lowest MICs, but amphotericin B and itraconazole were the only drugs active against *Cryptococcus albidus*.

Basidiomycetous yeasts are anamorphs (asexual states) of members of jelly fungi (*Tremellales*) or smuts (*Ustilaginales*). Some of these yeasts, such as *Cryptococcus neoformans* and *Malassezia* spp., are well-known human pathogens. However, many other species are also able to cause human infections, mainly in immunosuppressed patients. Among these, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Rhodotorula glutinis*, and, more commonly, *Trichosporon asahii* have been reported to cause severe infections (1, 4, 10, 12, 19, 23). In general the most common treatment for yeast infections is based on the use of amphotericin B (AMB) and fluconazole (FLC). However, against infections caused by the five above-mentioned species, these drugs have repeatedly failed (3, 5, 7, 12, 13, 21). Such a limitation, associated with AMB toxicity, determines the interest in evaluating the potential antifungal role of the new azoles and echinocandins. Although some of these species have been tested in vitro, only the responses of a reduced number of isolates are known (6, 24). *Trichosporon* has received the most attention (2, 3, 21–23), but in most studies the strains tested were identified as *Trichosporon beigeli*, which is a not valid name, and so it is not known which current species were actually tested.

In this study we have evaluated the in vitro activity of eight antifungal drugs against the five opportunistic species mentioned above. Although a reference method for testing these species does not exist, we have used M27-A2 (17), which has been shown to be very useful for testing the more-common yeasts.

A total of 50 isolates were tested (10 species each of *C. albidus*, *C. laurentii*, *R. glutinis*, *S. salmonicolor*, and *T. asahii*). Most of them are clinical isolates provided by the BCCM/IHEM Biomedical Fungi/Yeast collection or Centraalbureau voor Schimmelcultures. The isolates were stored lyophilized and were subcultured on Sabouraud dextrose agar for the study. *T. asahii*, *S. salmonicolor*, and *R. glutinis* were incubated

at 35°C for 24 to 72 h, and *C. albidus* and *C. laurentii* were incubated at 30°C for 48 to 72 h. *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 were included in each batch of tests as a quality control.

Antifungal agents were obtained as pure powders. AMB (USP, Rockville, Md.), albaconazole (ABC; J. Uriach & Cía, Barcelona, Spain), voriconazole (VRC; Pfizer Inc., Madrid, Spain), itraconazole (ITC; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), ravuconazole (RVC; Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, N.J.), and terbinafine (TBF; Novartis, Basel, Switzerland) were diluted in dimethyl sulfoxide (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain). Micafungin (MFG; Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan) and FLC (Pfizer Inc., Madrid, Spain) were diluted in sterile distilled water. Microdilution plates were prepared as described in the document M27-A2 (17). Final drug concentrations on the microdilution plates were mainly those recommended by the NCCLS guidelines for yeasts (17) or were based on previous data on basidiomycetous yeasts published by other authors (11, 18, 20). They ranged from 128 to 0.25 µg/ml for FLC, from 64 to 0.12 µg/ml for MFG, and from 16 to 0.03 µg/ml for the other antifungal agents.

Yeast suspensions were adjusted to 10⁶ CFU/ml with a hemocytometer. Suspensions of *T. asahii* were filtered through sterile gauze in order to eliminate hyphal elements prior to the count. Inoculum concentrations were checked by quantitative colony counts on Sabouraud dextrose agar plates.

Antifungal susceptibility testing was performed by a broth microdilution method that followed the NCCLS guidelines for yeasts (17). The MICs of AMB, TBF, and MFG were defined as the lowest concentrations resulting in 100% inhibition of growth, and those for all the azoles were defined as the lowest concentrations at which there was 50% inhibition of growth compared with a drug-free control. Geometric means, ranges, and MICs at which 90% of the isolates were inhibited (MIC₉₀s) were obtained for each species-drug combination tested.

Minimal effective concentration (MEC) was determined for *T. asahii* and was defined as the lowest drug concentration that produced morphological changes in fungal hyphae (15). Mac-

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone: 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: umb@fmc.s.uv.es.

roscopically it was recognized by the presence of very compact and round colonies in the microtiter wells. MEC readings were made with the aid of a stereoscopic microscope.

MIC results are shown in Table 1. MICs for the control strains were in agreement with the NCCLS guidelines (17). AMB MICs for *C. laurentii* and *R. glutinis* were always lower than 0.5 µg/ml. These results agree with the favorable clinical outcomes observed in infections by *Rhodotorula* spp. treated with AMB (1, 24). In contrast, AMB MICs were lower than 1 µg/ml for only 4 of the 10 strains of *T. asahii* tested. This correlates with the poor clinical outcomes usually observed for trichosporonosis treated with AMB (3, 5, 7, 16). The highest MICs of this drug (mean MICs = 3.03 µg/ml) were observed against *S. salmonicolor*.

Recently Wolf et al. (23) also studied the AMB susceptibilities of six isolates of *T. asahii* using the microdilution and Etest methods and obtained a low correlation between methods. The MICs for some isolates were very high, even higher than 32 µg/ml, by the microdilution method. We tested those six strains, and our results were much more homogenous. The use of a different medium, RPMI 1640 medium supplemented with 2% glucose, by Wolf et al. could explain these important discrepancies.

One of the most remarkable aspects of the study was the low activity of FLC (MIC₉₀ ≥ 64 µg/ml for all isolates tested). This agrees with results reported by other authors (6, 8, 9, 23, 24) and correlates with the failure of this drug to resolve infections by *T. asahii* (3, 5) and *C. laurentii* (14). By contrast, the other azoles generally showed good activity against all the fungi tested with the exception of *C. albidus*. MICs of all the azoles for some isolates of this species were very high, which confirms the data published by other authors (9). As the MICs for other species tested were very low, these important differences in antifungal susceptibility to azoles among the different species of *Cryptococcus* emphasize the need for a correct identification at species level of clinical isolates of *Cryptococcus*. ITC in general worked well against all the species tested, with the exception of *R. glutinis* (mean MICs = 2.65 µg/ml). The new triazoles showed mean MICs lower than 0.20 µg/ml against *C. laurentii*, *S. salmonicolor*, and *T. asahii*. The good activity of VRC and RVC against some of these species had also been reported previously (6, 18; R. Falk, D. G. Wolf, H. Shapiro, and I. Polacheck, Letter, J. Clin. Microbiol. 41:911, 2003; T. Peláez, V. García-Arias, L. Alcalá, A. Blázquez, J. V. Guinea, P. Muñoz, and E. Bouza, Abstr. 42nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 3829, 2003). By contrast, VRC showed poor activity against *Rhodotorula* spp., as also demonstrated by Zaas et al. (24).

MFG was inactive against all the species tested, which was to some extent expected because it had been demonstrated that echinocandins are not active against other basidiomycetous yeasts, such as *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon cutaneum* (20), and *Rhodotorula* spp. (24). MECs of this drug were determined only for *T. asahii* and did not differ from MICs.

TBF seemed generally inactive for all the species tested but surprisingly showed very low MICs against *S. salmonicolor* (mean MICs = 0.08 µg/ml). However, there are no data on the use of this compound in clinical cases where this species was involved in order to confirm these findings.

In summary, and although further in vivo studies are re-

TABLE 1. In vitro susceptibilities of 50 isolates of basidiomycetous yeasts^a

Drug	<i>C. albidus</i>		<i>C. laurentii</i>		<i>R. glutinis</i>		<i>S. salmonicolor</i>		<i>T. asahii</i>		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258				
	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM			
AMB	0.12-2	0.42	0.5	0.25-0.5	0.41	0.5	0.12-0.5	0.35	1-8	3.03	4	0.25-2	0.76	2	0.5	0.5	1
FLC	0.5-256	9.8	64	16-64	35.75	64	256	256	64-256	172	256	0.5-128	25.8	64	1.4	1.51	1
ITC	0.03-1	0.4	1	0.03-0.25	0.09	0.25	1-32	2.65	0.03-4.06	0.03	0.06	0.03-0.5	0.23	0.5	0.12-0.5	0.19	0.5
VRC	0.06-32	1.23	32	0.06-0.25	0.10	0.25	1-8	2.30	0.06-1	0.20	0.12	0.03-0.25	0.12	0.25	0.03	0.03	0.25-0.5
RVC	0.06-32	1.21	32	0.06-0.25	0.08	0.25	0.06-0.5	0.15	0.03-0.12	0.04	0.06	0.06-0.25	0.15	0.25	0.03	0.03	0.25-0.5
ABC	0.03-32	0.45	32	0.03-0.12	0.06	0.12	0.03-0.25	0.07	0.03-0.12	0.05	0.06	0.03-0.25	0.03	0.25	0.03	0.03	0.12-0.25
MFG	64-128	118.3	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	1-8	2.5	8
TBF	16-32	29.6	32	8-32	14.2	32	0.5-32	2	0.06-0.12	0.08	0.12	2-32	19.7	32	0.5-32	8.12	32

^a MICs were determined after 72h of incubation for all the yeasts with the exception of isolates of *T. asahii* *Candida parapsilosis* ATCC 22019, and *Candida krusei* ATCC 6258, for which MICs were determined after 48h of incubation. Units for all values are micrograms per milliliter. GM, geometric mean.

quired, these results seem to indicate that the new triazoles and even ITC could be alternatives for the treatment of infections by the yeasts tested here.

We thank C. Sanmarti for her technical assistance.

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. Anatoliotaki, M., E. Mantadakis, E. Galanakis, and G. Samonis. 2003. *Rhodotorula* species fungemia: a threat to the immunocompromised host. Clin. Lab. **49**:49–55.
2. Arikian, S., and G. Hasçelik. 2002. Comparison of NCCLS microdilution method and estest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **43**:107–111.
3. Cawley, M. J., G. R. Braxton, L. R. Haith, Jr., K. J. Reilly, R. E. Guilday, and M. L. Patton. 2000. *Trichosporon beigelii* infection: experience in a regional burn center. Burns **26**:483–486.
4. de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras (ed.). 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, and University Rovira i Virgili, Reus, Spain.
5. Ebricht, J. R., M. R. Fairfax, and J. A. Vazquez. 2001. *Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia. Clin. Infect. Dis. **33**:28–30.
6. Espinel-Ingroff, A. 1998. In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. J. Clin. Microbiol. **36**:198–202.
7. Fournier, S., W. Pavageau, M. Feuillade, S. Deplus, A. M. Zagdanski, O. Verola, H. Dombret, and J. M. Molina. 2002. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **21**:892–896.
8. Galán-Sánchez, F., P. García-Martos, C. Rodríguez-Ramos, P. Marín-Casanova, and J. Mira-Gutiérrez. 1999. Microbiological characteristics and susceptibility patterns of strains of *Rhodotorula* isolated from clinical samples. Mycopathologia **145**:109–112.
9. García-Martos, P., J. F. Noval, A. García-Tapia, P. Marín, J. L. Puerto, and A. Sepúlveda. 2002. Susceptibility to antifungal agents of *Cryptococcus* species of clinical interest. Med. Clin. **119**:211–213.
10. Groll, A. H., and T. J. Walsh. 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. Clin. Microbiol. Infect. **7**:8–24.
11. Jessup, C. J., N. S. Rider, and M. A. Ghannoum. 2000. An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. Med. Mycol. **38**:155–159.
12. Johnson, L. B., S. F. Bradley, and C. A. Kauffman. 1998. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptoccaemia. Mycoses **41**:277–280.
13. Kordossis, T., A. Avlami, A. Velegraki, I. Stefanou, G. Georgakopoulos, C. Papalambrou, and N. J. Legakis. 1998. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. Med. Mycol. **36**:335–339.
14. Kovacicova, G., M. Lovaszova, J. Hanzen, A. Roidova, F. Mateicka, M. Lesay, and V. Krcmery. 2001. Persistent fungemia—risk factors and outcome in 40 episodes. J. Chemother. **13**:429–433.
15. Kurtz, M. B., I. B. Heath, J. Marrinan, S. Dreikorn, J. Onishi, and C. Douglas. 1994. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)- β -D-glucan synthase. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:1480–1489.
16. Moretti-Branchini, M. L., K. Fukushima, A. Z. Schreiber, K. Nishimura, P. M. Papaiordanou, P. Trabasso, R. Tanaka, and M. Miyaji. 2001. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **39**:161–164.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
18. Paphitou, N. I., L. Ostrosky-Zeichner, V. L. Paetznick, J. R. Rodriguez, E. Chen, and J. H. Rex. 2002. In vitro susceptibilities of *Trichosporon* species. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:1144–1146.
19. Plazas, J., J. Portilla, V. Boix, and M. Pérez-Mateo. 1994. *Sporobolomyces salmonicolor* lymphadenitis in AIDS patient. Pathogen or passenger? AIDS **8**:387–388.
20. Tawara, S., F. Ikeda, K. Maki, Y. Morishita, K. Otomo, N. Teratani, T. Goto, M. Tomishima, H. Ohki, A. Yamada, K. Kawabata, H. Takasugi, K. Sakane, H. Tanaka, F. Matsumoto, and S. Kuwahara. 2000. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:57–62.
21. Walsh, T. J., G. P. Melcher, M. G. Rinaldi, J. Lecciones, D. A. McGough, P. Kelly, J. Lee, D. Callender, M. Rubin, and P. A. Pizzo. 1990. *Trichosporon beigelii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. J. Clin. Microbiol. **28**:1616–1622.
22. Wildfeuer, A., H. P. Seidl, I. Paule, and A. Haberreiter. 1998. In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. Mycoses **41**:309–319.
23. Wolf, D. G., R. Falk, M. Hacham, B. Theelen, T. Boekhout, G. Scorzetti, M. Shapiro, C. Block, I. F. Salkin, and I. Polachek. 2001. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patient in three intensive care units. J. Clin. Microbiol. **39**:4420–4425.
24. Zaas, A. K., M. Boyce, W. Schell, B. A. Lodge, J. L. Miller, and J. R. Perfect. 2003. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. J. Clin. Microbiol. **41**:5233–5235.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

4.2. Eficacia de la micafungina en combinación con otros antifúngicos en un modelo de tricosporonosis diseminada en el ratón.

Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis.

Serena C, Pastor FJ, Gilgado F, Mayayo E, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005, 49:497-502.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

Efficacy of Micafungin in Combination with Other Drugs in a Murine Model of Disseminated Trichosporonosis

Carolina Serena, F. Javier Pastor, Félix Gilgado, Emilio Mayayo, and Josep Guarro*

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

Received 1 September 2004/Returned for modification 8 September 2004/Accepted 25 September 2004

Using a murine model of disseminated infection caused by *Trichosporon asahii*, we have evaluated the efficacies of amphotericin B (AMB; 1 mg/kg of body weight/day), fluconazole (FLC; 20 mg/kg/twice a day), and micafungin (MFG; 5 mg/kg/twice a day). We tested these drugs alone and in combination (MFG with AMB and MFG with FLC). MFG with AMB showed a synergistic effect and demonstrated a higher degree of efficacy in prolonging survival and reducing the kidney fungal burden than either agent alone. The combination MFG with FLC was able to reduce significantly the kidney fungal burden in comparison to that achieved with either drug administered alone.

Disseminated trichosporonosis is a severe infection that mainly affects immunocompromised patients, particularly those with hematological malignancies (13, 20, 21, 23). *Trichosporon asahii* is the most common species that causes disseminated trichosporonosis (10, 11, 13, 16). Penetration of this fungus into the body is facilitated by indwelling vascular catheters, drainage tubes, burns, or microbial translocation from the intestinal mucosa (20, 21). One of the most important problems inherent to these infections is that *Trichosporon* is often morphologically confused with *Candida* spp. Such misidentification could lead to the administration of inappropriate therapy because *Trichosporon* is generally less susceptible to amphotericin B (AMB), the drug usually used empirically for the treatment of suspected yeast infections (19). Up to now the use of a drug alone to treat systemic trichosporonosis has not been completely satisfactory (7, 22). Despite the administration of AMB or fluconazole (FLC) (1, 5, 7, 9, 13, 22), this infection is almost always fatal, with the mortality rate from trichosporonosis being even higher than that from candidiasis (19). However, the usefulness of combined therapy for the treatment of this infection has not yet been extensively investigated. The combination AMB with FLC has demonstrated some beneficial effects for the experimental treatment of a murine infection caused by *T. beigeli* (2, 15), which is no longer an accepted name, as it has been used to refer to different currently accepted species of this genus.

In this study we have evaluated the activity of the new echinocandin micafungin (MFG) in combination with FLC or AMB in a murine model of disseminated trichosporonosis. Although it has been demonstrated that MFG alone is not active against *T. asahii* in vitro (18), it is unknown whether this drug in combination with azoles or polyenes could be effective, as it has proven to be in experimental infections caused by *Candida* or *Aspergillus* (4, 12).

MATERIALS AND METHODS

Fungi. Two clinical isolates of *T. asahii*, isolates IHM 17910 and IHM 17911, from blood cultures of patients with medullar aplasia posthepatitis and acute lymphocytic leukemia, respectively, were used in this study. The isolates were stored at -80°C in potato dextrose broth with glycerol, and prior to testing they were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) at 35°C . On the day of infection, 24-h cultures on SDA were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells or hyphae. The resulting suspensions, which contained $\geq 95\%$ conidial forms (arthroconidia and blastoconidia), were adjusted to the desired inoculum size with a hemocytometer. Dilutions of the original suspension were cultured on SDA plates to confirm the counts determined with the hemocytometer.

In vitro studies. The MICs of MFG, AMB, and FLC for the two strains used in the study were determined by a broth microdilution method, according to the NCCLS guidelines for yeasts (17). Antifungal interactions were studied by a checkerboard microdilution method (8).

Animals. Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) with a mean weight of 30 g were used. The animals were housed in standard boxes with corncob bedding and had free access to food and water. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee.

Drugs. AMB was purchased as Fungizona (Squibb Industrial Farmaceutica S. A., Barcelona, Spain), FLC was obtained from Pfizer Inc. (Madrid, Spain), and MFG was from Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd (Osaka, Japan).

Immunosuppression. Mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk S. A., Barcelona, Spain) per kg of body weight plus a single intravenous injection of 150 mg of 5-fluorouracil (Fluoro-uracil; Productos Roche S. A., Madrid, Spain) per kg on the day of infection.

Infection and therapy. For the survival studies, groups of 20 mice each were established for infection with each strain and for each treatment. The mice were challenged with 6×10^6 CFU in 0.2 ml injected into the lateral tail vein. Preliminary experiments with both strains (data not shown) demonstrated that this concentration of fungal elements was the optimal dose for producing an acute infection, with 80% of the animals dying within 10 days of infection. Control animals received no treatment. Different groups were treated as follows: AMB at 1 mg/kg of body weight/dose given i.p. once daily (QD), FLC at 20 mg/kg of body weight/dose given orally twice daily (BID), MFG at 5 mg/kg of body weight/dose given subcutaneously (s.c.) BID, MFG given s.c. (5 mg/kg BID) plus FLC given orally (20 mg/kg BID), and MFG given s.c. (5 mg/kg/BID) plus AMB given i.p. (1 mg/kg QD). All treatments began 1 h after challenge, and the therapy lasted for 4 days. The mice in each experiment were checked daily for 30 days after challenge. All the experiments were performed as a single study, with the exception that the combined therapy for the treatment of infection caused by strain IHM 17911 was done separately. In this case the study with the control was repeated to confirm the reproducibility of the results.

Tissue burden studies. Five groups of 10 mice each infected with strain IHM 17910 were used for the tissue burden studies. Three groups were treated with the same monotherapies indicated above, and in a different experiment two

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

TABLE 1. In vitro antifungal activities and interactions among antifungal drugs against two strains of *T. asahii*

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			AMB + MFG			FLC + MFG		
	AMB	FLC	MFG	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FICI	Effect	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FICI	Effect
IHEM 17910	1	4	64	0.25/16	0.50	S ^a	2/0.06	0.5009	I ^b
IHEM 17911	1	4	64	0.25/0.25	0.25	S	2/0.06	0.5009	I

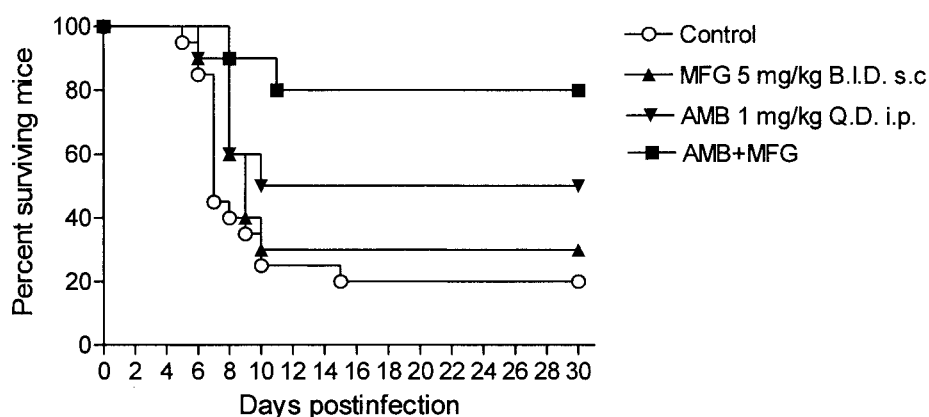
^a S, synergism.
^b I, indifference.

groups were treated with the combinations MFG with AMB and MFG with FLC, respectively, at the doses described above. A control group of 10 untreated animals was included in each experiment to confirm the reproducibility of the results. For all treatments, therapy began 1 h after challenge and lasted for 4 days. All mice were killed 1 day after the completion of treatment. The livers, spleens, and kidneys were aseptically removed; and portions of each organ were homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on SDA and incubated 48 h at 35°C, and the numbers of CFU per gram of tissue were calculated.

Histological studies. For the histopathology studies, a portion of each specimen was placed in 10% buffered formalin. The organs were sectioned in paraffin blocks; and for microscopic observation, sections of 3 μm were stained with periodic acid-Schiff, hematoxylin-eosin, and Grocott methenamine silver stains.

Statistics. The mean survival time (MST) was estimated by the Kaplan-Meier method, and the MSTs among the groups were compared by the log-rank test. In the tissue burden studies the colony counts were analyzed by a parametric method that consisted of an analysis of variance. Calculations were made by using SPSS software for Windows (version 11.0).

(A) *T. asahii* IHEM 17910



(B) *T. asahii* IHEM 17911

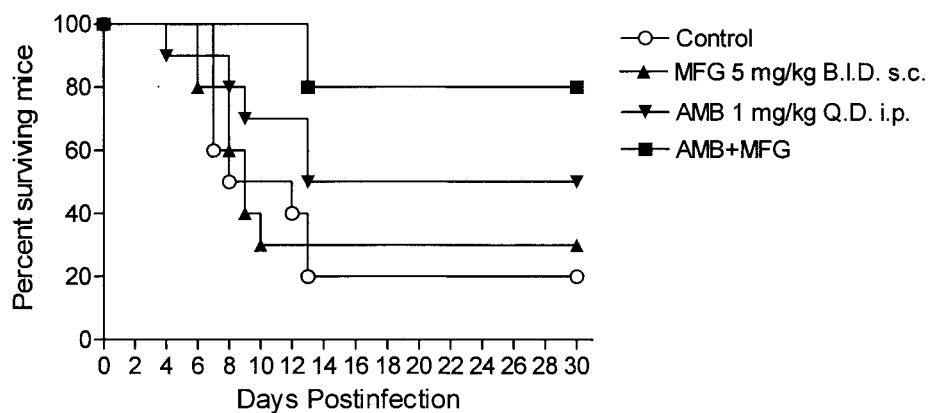
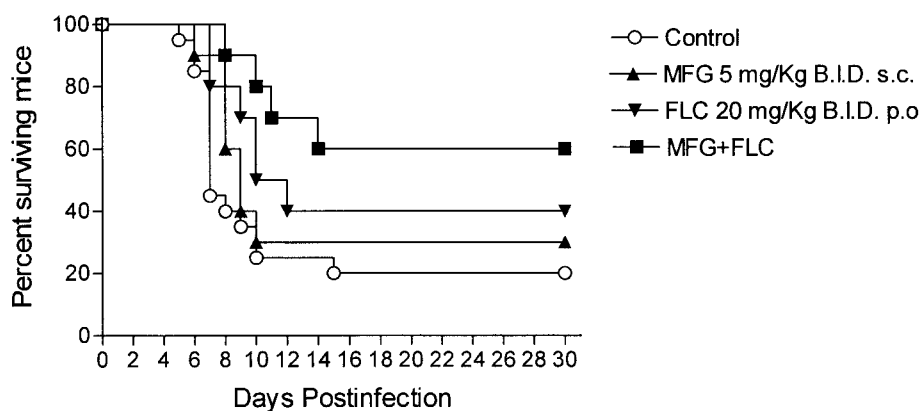


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with *T. asahii* IHEM 17910 (A) or *T. asahii* IHEM 17911 (B) and treated with MFG and AMB. All the experiments were performed as a single study with the exception of the combined therapy against strain IHEM 17911, which was done separately. The experiment with the control group was repeated, and the results were not different from the previous ones. In this case the curve is the result of the mean for both data sets.

(A) *T. asahii* IHEM 17910



(B) *T. asahii* IHEM 17911

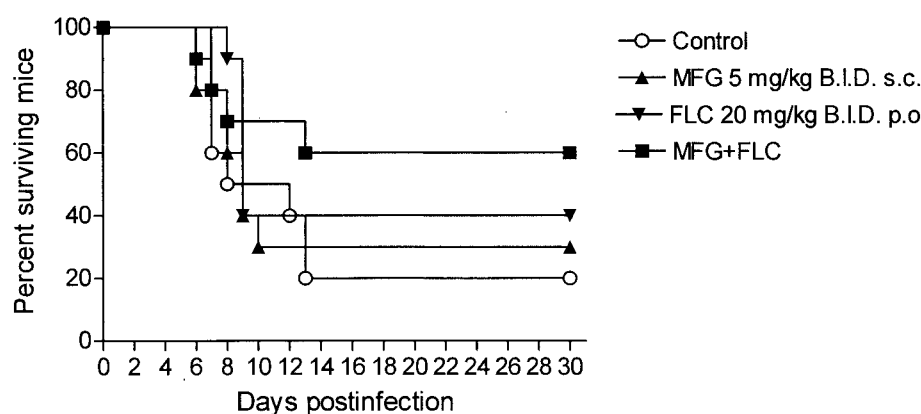


FIG. 2. Cumulative mortality of mice infected with *T. asahii* IHEM 17910 (A) or *T. asahii* IHEM 17911 (B) and treated with MFG and FLC. All the experiments were performed as a single study with the exception of the combined therapy against strain IHEM 17911, which was done separately. In this case the experiment with the control group was repeated to confirm the reproducibility of the results, and the curve is the result of the mean for both data sets.

RESULTS

In vitro results. The antifungal activities of the drugs tested and the interactions among them are shown in Table 1. The MICs of the drugs for the two strains were identical, i.e., >64 µg/ml for MFG, 1 µg/ml for AMB, and 4 µg/ml for FLC. The combination MFG with AMB showed a synergistic interaction against the two strains tested (fractional inhibitory concentration indices [FICIs], 0.50 and 0.25, respectively), while the combination MFG with FLC showed an indifferent interaction against the two strains (FICIs = 0.5009) (14).

In vivo results. The effects of the different treatments on mouse survival are shown in Fig. 1 and 2 and Table 2. In tests with both strains, treatment with the combination MFG with AMB resulted in survival rates higher than those for the control group ($P < 0.0001$) and the group treated with MFG or AMB alone ($P = 0.0025$ and $P = 0.0331$, respectively). However, treatment with the combination MFG with FLC improved the survival rate only compared with that for the con-

TABLE 2. Survival of mice infected with *T. asahii* strains IHEM 17910 and IHEM 17911 and treated with antifungal agents

Antifungal therapy (dose [mg/kg/day])	MST (days [95% CI ^a])	
	IHEM 17910	IHEM 17911 ^b
None	12.25 (8.26–16.24)	13.40 (9.61–17.19)
AMB (1)	19.00 ^c (14.16–23.84)	19.70 ^c (15.07–24.33)
FLC (40)	17.50 (11.12–23.88)	17.30 (12.75–21.85)
MFG (10)	14.80 (8.60–21.00)	14.60 (10.15–19.05)
MFG (10) + AMB (1)	25.90 ^d (22.29–29.51)	26.60 ^d (23.62–29.58)
MFG (10) + FLC (40)	22.30 ^c (16.39–28.21)	21.40 ^c (16.72–26.08)

^a CI, confidence interval.

^b The combined therapy for mice infected with strain *T. asahii* IHEM 17911 was done in a separate experiment. In this case, the experiment with the control group was repeated, and the results were not different. The results for the control group are the mean values for both data sets.

^c $P < 0.05$ versus the results for the control group.

^d $P < 0.001$ versus the results for the control group and $P < 0.05$ versus the results achieved with the monotherapies.

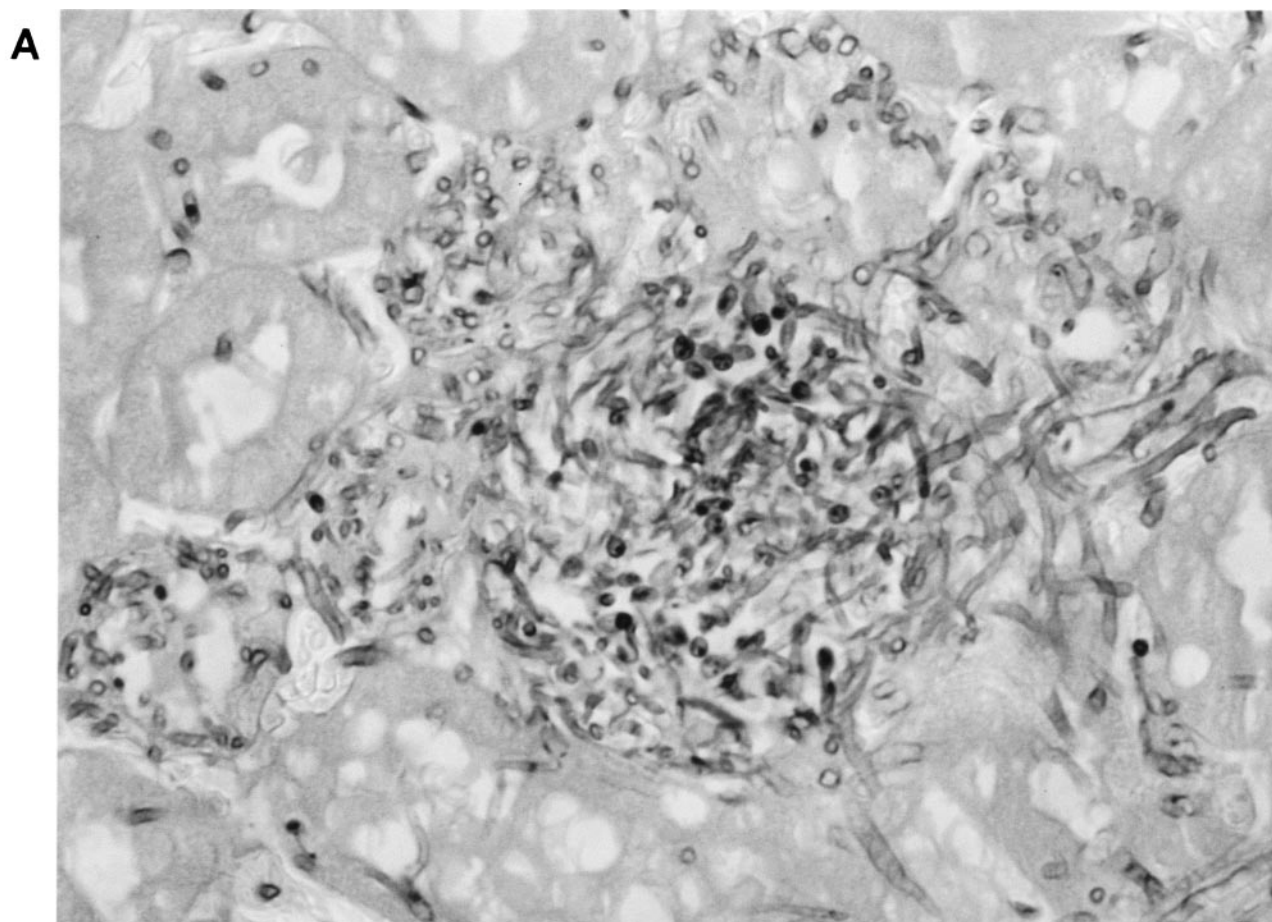


FIG. 3. Kidney lesions in murine trichosporonosis. The animals were killed 4 days after infection with 6×10^6 CFU of *T. asahii* strain IHEM 17910. (A) Transversal section showing hyphae, blastoconidia, and arthroconidia in the lumen of the vessel and some of them around it. Grocott methenamine silver stain. Magnification, $\times 400$. (B) Longitudinal section showing intra- and extravascular hyphal elements. Grocott methenamine silver stain. Magnification, $\times 400$.

control group ($P = 0.0136$). Among the monotherapies, only AMB was able to increase the rate of survival in comparison to that for the control group ($P = 0.0245$). In addition, in experiments with both strains, the rate of survival obtained with FLC or MFG alone was no different from that for the control group.

The livers, spleens, and kidneys of mice infected with *T. asahii* IHEM 17910 and not treated showed high fungal loads

(Table 3). The organ most affected was the kidney. Both combinations, MFG with AMB and MFG with FLC, significantly reduced the organism burdens in kidney tissue with respect to those achieved with the monotherapies ($P < 0.05$) and in the control group ($P < 0.001$). Only AMB and the combination MFG with AMB were able to reduce significantly the organism burden in liver tissue compared with that in the liver tissue of

TABLE 3. Effects of the antifungal treatment on *T. asahii* colony counts in the liver, spleen, and kidneys of the mice

Treatment ^a (dose [mg/kg/day])	Mean log ₁₀ CFU/g of tissue (95% CI ^b)		
	Liver	Spleen	Kidney
None	5.57 (4.94–6.21)	5.88 (5.58–6.18)	7.47 (6.45–8.48)
MFG (10)	4.02 (3.83–4.21)	4.59 (4.05–5.13) ^c	4.72 (4.41–5.31)
FLC (40)	4.23 (3.57–4.90)	4.92 (4.43–5.39)	4.49 (3.82–5.16) ^c
AMB (1)	3.86 (3.52–4.20) ^c	4.41 (3.90–4.93) ^c	4.75 (4.30–5.20)
MFG (10) + FLC (40)	4.17 (3.99–4.34)	5.04 (4.86–5.23)	3.66 (3.23–4.10) ^d
MFG (10) + AMB (1)	3.88 (3.44–4.33) ^c	4.10 (3.57–4.63) ^c	3.92 (3.32–4.53) ^d

^a Monotherapies and combined therapies were tested in two different studies. The results for the control groups obtained in both cases were not different, and the results for the control group are the mean values for both experiments.

^b CI, confidence interval.

^c $P < 0.05$ versus the results for the control group.

^d $P < 0.001$ the results for the control group and $P < 0.05$ versus the results achieved with the monotherapies.

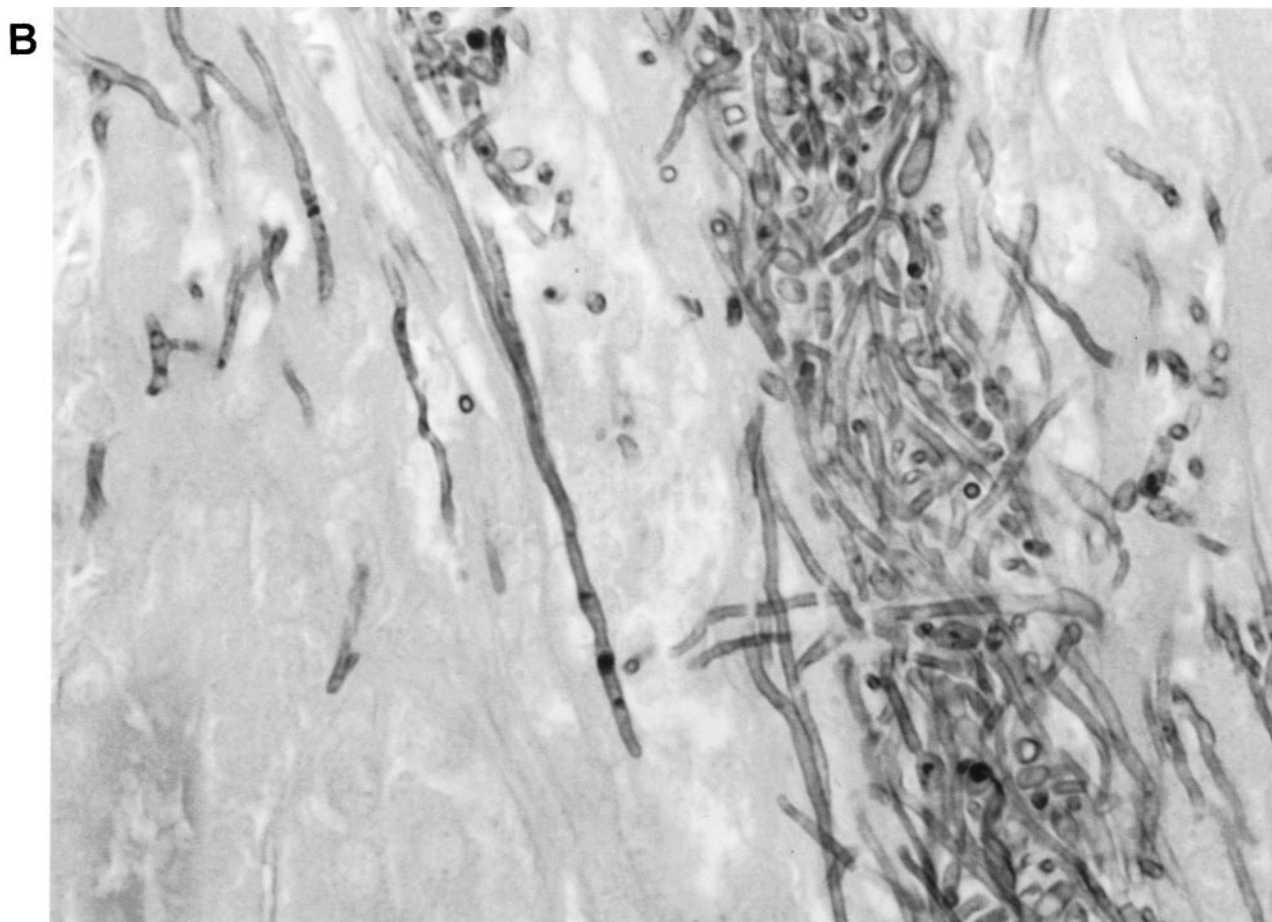


FIG. 3—Continued.

the control group ($P < 0.05$). The two combination regimens and MFG alone were all able to reduce significantly the fungal load in the spleen in comparison to that in the spleen of the control group ($P < 0.05$).

Histological studies revealed that conidial and hyphal elements diffusely infiltrated all the organs examined (Fig. 3). Little inflammatory response appeared in any of the lesions that developed as a result of infection with either strain, and no remarkable differences in the inflammatory responses to the two strains were found. While the organs of infected mice treated with monotherapies showed numerous fungal elements, these were practically absent from the organs of mice treated with the combination therapies.

DISCUSSION

We have established a murine model of disseminated trichosporonosis using two strains of *T. asahii*. The rates of survival were practically identical among the mice infected with each of the two strains and were very similar to those reported by other investigators (2, 15), although the immunosuppression regimens used in the two studies were different, as were probably the mouse species tested. The lack of efficacy of AMB and FLC observed in our study when they were administered alone agrees with clinical data that show that, despite treatment with

such drugs, approximately 80% of patients die (9). Improvement in the neutropenic state of patients with disseminated trichosporonosis implies a better prognosis for their recovery, although it is not always sufficient to cure the infections, and antifungal treatment is also required (9, 23). The best strategy for the treatment of severe trichosporonosis is not yet clearly defined (9). In persistently neutropenic patients the use of FLC or the combination FLC with AMB has been recommended (10, 23), even though in some cases treatments fail (9). In our study, although the MICs of AMB and FLC were not high and the strains could have been considered susceptible to the two drugs, the effectiveness of these drugs was poor in vivo. For this reason it is very important to have reliable therapeutic alternatives. Some recent data seem to emphasize this need. A recent study (24) reported on *T. asahii* strains that infected nongranulocytopenic patients in different intensive care units for which AMB MICs were 2 to >32 $\mu\text{g/ml}$ and FLC MICs were 32 to 128 $\mu\text{g/ml}$. In the present study the activity of FLC was not superior to that of AMB, and the MFG MIC for the two strains of *T. asahii* tested was high, which also agrees with the low survival rate of mice treated with this antifungal drug. Although MFG is considered intrinsically inactive against *Trichosporon* spp. (6), when it was combined with AMB in our study, it was able to prolong significantly the MST in compar-

ison to those achieved with the monotherapies and for the control group. This combination was able to reduce significantly the fungal loads in the three organs studied in comparison with the loads in the controls and, in addition, was able to reduce the burdens in kidney tissues, the organ most affected by the fungi, with respect to those achieved with the monotherapies. It is possible that a more marked reduction would be achieved with a longer treatment. The actual mechanism that explains the positive interaction between MFG and AMB is unclear. Arikan et al. (3) found a similar effect between another echinocandin, caspofungin, and AMB when they tested clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* in vitro. They concluded that the echinocandin could enhance the penetration of AMB into the cell membrane, causing the decrease in the AMB MICs. However, how the echinocandin MICs are lowered when the drug is used in combination with AMB is more difficult to explain.

The other combination, MFG with FLC, was able to prolong significantly the MST only with respect to that for the control group. None of the regimens tested was able to sterilize any organ, similarly to that happened with the combination FLC with AMB tested by other investigators (2, 15), probably due to the short duration of the therapy.

MFG is effective against systemic trichosporonosis when it is given in combination with AMB or FLC, although only the combination MFG plus AMB shows synergistic effects. Further studies are warranted to determine the optimal treatment regimens that might potentially result in cures.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Josepa Rovira for technical assistance.

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

REFERENCES

1. Anaissie, E. J., G. P. Bodey, H. Kantarjian, J. Ro, S. E. Vartivarian, R. Hopfer, J. Hoy, and K. Rolston. 1989. New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev. Infect. Dis.* **11**:369–378.
2. Anaissie, E. J., R. Hachem, N. C. Karyotakis, A. Gokaslan, M. C. Dignani, L. C. Stephens, and C. K. Tin-U. 1994. Comparative efficacies of amphotericin B, triazoles, and combination of both as experimental therapy for murine trichosporonosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2541–2544.
3. Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, and J. H. Rex. 2002. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:245–247.
4. Capilla, J., 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.
5. Cawley, M. J., G. R. Braxton, L. R. Haith, K. J. Reilly, R. E. Guilday, and M. L. Patton. 2000. *Trichosporon beigelii* infection: experience in a regional burn center. *Burns* **26**:483–486.
6. Denning, D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**:1142–1151.
7. Ebright, J. R., M. R. Fairfax, and J. A. Vazquez. 2001. *Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia. *Clin. Infect. Dis.* **33**:28–30.
8. Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering. 1991. Antimicrobial combinations, p. 432–492. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
9. Fournier, S., W. Pavageau, M. Feuillade, S. Deplus, A. M. Zagdanski, O. Verola, H. Dombret, and U. M. Molina. 2002. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:892–896.
10. Groll, A. H., and T. J. Walsh. 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:824.
11. Guého, E., M. T. Smith, G. S. de Hoog, G. Billon-Grand, R. Christen, and W. H. Batenburg-van der Vegte. 1992. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Leeuwenhoek* **62**:289–316.
12. Ikeda, F., Y. Wakai, S. Matsumoto, K. Maki, E. Watabe, S. Tawara, T. Goto, Y. Watanabe, F. Matsumoto, and S. Kuwahara. 2000. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:614–618.
13. Itoh T., H. Hosokawa, U. Kohdera, N. Toyazaki, and Y. Asada. 1996. Disseminated infection with *Trichosporon asahii*. *Mycoses* **39**:195–199.
14. Johnson, M. D., C. MacDougall, L. Ostrosky-Zachner, J. R. Perfect, and J. H. Rex. 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:693–715.
15. Kamperi, P., H. Atsuro, T. Takayoshi, and N. Masaru. 1998. Efficacy of amphotericin B and azoles alone and in combination against disseminated trichosporonosis in neutropenic mice. *Chemotherapy (Basel)* **44**:55–62.
16. Moretti-Branchini, M. L., K. Fukushima, A. Z. Schreiber, K. Nishimura, P. M. Papaioordanou, P. Trabasso, R. Tanaka, and M. Miyaji. 2001. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **39**:161–164.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 2nd ed., M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
18. Serena, C., F. J. Pastor, M. Ortoneda, J. Capilla, N. Nolard, and J. Guarro. 2004. In vitro antifungal susceptibility of uncommon basidiomycetous yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2724–2726.
19. Steinbach, W. J., and J. R. Perfect. 2003. Newer antifungal therapy for emerging fungal pathogens. *Int. J. Infect. Dis.* **7**:525.
20. Tashiro, T., H. Nagai, H. Nagaoka, Y. Goto, P. Kamperi, and M. Nasu. 1995. *Trichosporon beigelii* pneumonia in patients with hematologic malignancies. *Chest* **108**:190–195.
21. Vasta, S., M. Menozzi, R. Scime, A. Indovina, A. Speciale, G. Liberti, C. Spano, and I. Majolino. 1993. Central catheter infection by *Trichosporon beigelii* after autologous blood stem cell transplantation. A case report and review of the literature. *Haematologica* **78**:64–67.
22. Walsh, T. J., G. P. Melcher, M. G. Rinaldi, J. Lecciones, D. A. McGough, P. Kelly, J. Lee, D. Callender, M. Rubin, and P. A. Pizzo. 1990. *Trichosporon beigelii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1616–1622.
23. Walsh, T. J., K. R. Newman, M. Moody, R. C. Wharton, and J. C. Wade. 1986. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. *Medicine (Baltimore)* **65**:268–279.
24. Wolf, D. G., R. Falk, M. Hacham, B. Theelen, T. Boekhout, G. Scorzetti, M. Shapiro, C. Block, I. F. Salkin, and I. Polacheck. 2001. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4420–4425.

4.3. Interacciones *in vitro* de la micafungina con antifúngicos convencionales y nuevos frente a cepas clínicas de *Trichosporon*, *Sporobolomyces* y *Rhodotorula*.

In vitro interaction of micafungin with conventional and new antifungals against clinical isolates of *Trichosporon*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorula*.

Serena C, Marine M, Pastor FJ, Nolard N, and Guarro J.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005. 55:1020-1023.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

In vitro interaction of micafungin with conventional and new antifungals against clinical isolates of *Trichosporon*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorula*

Carolina Serena¹, Marçal Mariné¹, F. Javier Pastor¹, Nicole Nolard² and Josep Guarro^{1*}

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

²Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium

Received 2 March 2005; returned 11 March 2005; revised 21 March 2005; accepted 21 March 2005

Objectives: The infections caused by basidiomycetous yeasts are often difficult to resolve. Combined therapy might be useful in those severe cases where a monotherapy was ineffective. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of combinations of micafungin with amphotericin B or fluconazole, itraconazole, voriconazole and ravuconazole against isolates of *Trichosporon*, *Rhodotorula* and *Sporobolomyces*.

Methods: Twenty-seven clinical isolates were tested, i.e. 10 of *Trichosporon asahii*, two of *Trichosporon mucoides*, five of *Sporobolomyces salmonicolor* and 10 of *Rhodotorula glutinis*. Drug interactions were assessed by the checkerboard technique using the NCCLS microdilution method (M27-A2). The fractional inhibitory concentration index (FICI) was used to classify drug interactions. Results were interpreted as follows: synergy (FICI ≤ 0.5), no interaction (FICI >0.5 and ≤ 4.0), or antagonism (FICI >4.0).

Results: Micafungin combined with amphotericin B showed the highest percentage of synergic interactions (78%) followed by micafungin/ravuconazole and micafungin/itraconazole (48% for each), and micafungin/fluconazole and micafungin/voriconazole (34% for each). Antagonism was not observed in any case.

Conclusions: Some of the combinations tested, especially micafungin/amphotericin B, have potential for the treatment of basidiomycetous yeast infections.

Keywords: basidiomycetous yeasts, antifungal susceptibility, combined therapy

Introduction

The frequency of life-threatening fungal infections caused by *Trichosporon* species and other basidiomycetous yeasts has increased in recent years.^{1–4} The antifungal agents approved for the treatment of invasive yeast infections are limited. In general, the most common treatment of yeast infections is based on the use of amphotericin B and fluconazole. However, these drugs have repeatedly failed against infections caused by *Trichosporon* species, *Rhodotorula glutinis* and *Sporobolomyces salmonicolor*.^{3,5} Such a limitation, associated with amphotericin B toxicity, makes interesting the evaluation of the combination of new and conventional drugs to obtain better clinical results and to reduce the antifungal doses. Echinocandins are a new class of antifungal agents with novel targets that can constitute new alternatives

that need testing, especially in combined therapies.⁶ Few studies have been done on the *in vitro* interaction of antifungal drugs against the above mentioned fungi.⁷ We have recently demonstrated that the combination of micafungin with amphotericin B is effective for the treatment of murine disseminated infection by two strains of *Trichosporon asahii*.⁸ This is very interesting because the infection caused by this species commonly does not respond to the recommended treatment with amphotericin B or fluconazole. However, since drug–drug interaction is frequently strain specific, and in that study only two isolates were tested, it is important to prove if this combination can be selected to suit all members of this species.

The aim of this study, therefore, was to determine if the combination micafungin/amphotericin B is active against more strains of *T. asahii* ($n = 10$) and thus to confirm

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

Table 1. Interactions of MFG with AMB and various azoles against *Trichosporon asahii*, *Trichosporon mucoides*, *Rhodotorula glutinis* and *Sporobolomyces salmonicolor*

Strain	MIC (mg/L)				MIC (mg/L)			MIC (mg/L)			MIC (mg/L)			MIC (mg/L)			
	AMB	MFG	AMB/MFG	FICI	FLC	FLC/MFG	FICI	ITC	ITC/MFG	FICI	VRC	VRC/MFG	FICI	RVC	RVC/MFG	FICI	
<i>R. glutinis</i>	FMR 7467	0.25	64	0.12/4	0.56	64	64/64	2	2	0.5/16	0.50	2	2/64	2	0.25	0.06/0.06	0.25
	FMR 7471	0.5	64	0.12/0.06	0.25	64	16/0.06	0.25	16	16/64	2	8	2/2	0.28	2	0.5/0.06	0.25
	FMR 7483	0.5	64	0.12/16	0.50	64	64/64	2	16	16/64	2	16	4/0.06	0.25	0.5	0.12/0.06	0.25
	FMR 7484	0.25	64	0.12/1	0.75	64	64/64	2	2	0.5/0.5	0.26	8	2/0.12	0.25	0.5	0.12/0.12	0.25
	FMR 7487	0.25	64	0.12/16	0.75	64	64/64	2	2	0.5/8	0.37	4	4/64	2	0.12	0.12/0.12	1
	FMR 7488	0.25	64	0.06/0.12	0.25	64	64/64	2	2	1/4	0.56	4	1/0.12	0.25	0.5	0.12/0.12	0.25
	FMR 7497	0.5	64	0.12/0.12	0.25	64	64/64	2	16	16/64	2	2	2/64	2	0.5	0.12/0.06	0.25
	FMR 7490	0.25	64	0.06/4	0.30	64	64/64	2	4	1/0.06	0.25	8	2/0.06	0.25	0.25	0.12/32	1
	FMR 7477	0.5	64	0.12/16	0.50	64	16/0.06	0.25	4	1/0.06	0.25	4	4/64	2	0.5	0.12/0.06	0.25
	FMR 7478	0.25	64	0.06/4	0.30	64	64/64	2	2	0.5/0.5	0.26	8	2/2	0.28	2	0.06/0.06	0.25
<i>S. salmonicolor</i>	IHEM 2904	4	64	1/1	0.31	16	8/1	0.51	0.25	0.12/16	0.75	0.12	0.12/0.12	1	0.25	0.12/0.25	0.51
	FMR 8128	1	64	0.5/2	0.53	8	2/0.25	0.25	0.5	0.12/0.06	0.25	0.25	0.25/64	2	0.25	0.06/0.12	0.25
	CBS 6832	0.25	64	0.12/16	0.75	64	16/16	0.50	0.5	0.5/64	2	0.25	0.25/64	2	0.12	0.12/0.12	1
	IHEM 3932	8	64	4/1	0.51	32	16/1	0.51	0.5	0.12/0.06	0.25	0.12	0.12/0.12	1	0.5	0.5/64	2
	IHEM 6706	16	64	0.25/16	0.50	16	8/1	0.51	0.5	0.12/0.06	0.25	1	0.25/4	0.30	1	0.25/4	0.30
<i>T. asahii</i>	IHEM 9324	0.25	64	0.06/16	0.50	4	4/64	2	0.12	0.12/0.12	1	0.25	0.25/64	2	0.5	0.12/0.06	0.25
	IHEM 9325	0.5	64	0.12/16	0.49	4	4/64	2	1	0.25/0.06	0.25	0.25	0.25/64	2	0.5	0.5/64	2
	FMR 8131	1	64	0.25/16	0.50	4	2/0.06	0.51	0.5	0.25/0.25	0.51	0.12	0.12/0.12	1	0.25	0.25/64	2
	FMR 8132	1	64	0.25/0.25	0.25	4	2/0.06	0.51	0.25	0.25/64	2	0.25	0.25/64	2	0.25	0.25/64	2
	CBS 8973	0.5	64	0.12/0.06	0.25	1	1/64	2	0.5	0.5/64	2	0.12	0.12/0.12	1	0.25	0.25/64	2
	CBS 8970	0.5	64	0.12/8	0.36	8	2/0.06	0.25	1	0.5/8	0.62	1	0.25/0.06	0.25	0.25	0.25/64	2
	CBS 7631	0.5	64	0.12/0.12	0.24	4	1/0.06	0.25	0.25	0.25/64	2	0.12	0.12/0.12	1	0.5	0.12/0.06	0.24

Table 1. (Continued)

Strain	MIC (mg/L)					MIC (mg/L)					MIC (mg/L)						
	AMB	MFG	AMB/MFG	FICI	FIC	FLC	FLC/MFG	FICI	ITC	ITC/MFG	FICI	VRC	VRC/MFG	FICI	RVC	RVC/MFG	FICI
CBS 8972	1	64	0.25/16	0.50	16	4/0.25	0.25	0.25	0.5	0.12/16	0.50	0.25	0.25/64	2	0.25	0.12/0.25	0.51
CBS 8969	1	64	0.25/0.06	0.25	8	2/4	0.31	0.31	0.5	0.12/0.06	0.25	0.25	0.25/64	2	0.25	0.25/64	2
CBS 8971	0.5	64	0.12/16	0.49	8	8/64	2	2	0.25	0.25/64	1	0.5	0.12/0.06	0.24	0.5	0.12/0.06	0.25
<i>T. mucoides</i> IHEM 13920	1	64	0.25/0.06	0.25	2	0.5/0.06	0.25	0.25	0.25	0.25/64	1	0.12	0.12/0.12	1	0.12	0.12/0.12	1
IHEM 19066	1	64	0.12/8	0.25	64	64/64	2	2	2	0.5/0.06	0.25	16	16/64	2	16	16/64	2

AMB, amphotericin B; MFG, micafungin; FLC, fluconazole; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; FICI, fractional inhibitory concentration index (≤ 0.5 synergic; > 0.5 and ≤ 4 no interaction; and > 4 antagonistic); FMR, Faculty of Medicine, University of Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain; IHEM, Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute, Brussels, Belgium; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.

the effectiveness of this combination, and also to determine if it is active against other pathogenic yeasts. In addition, we have evaluated the combination of micafungin with some other traditional and new azoles.

Materials and methods

A total of 27 clinical isolates were tested (10 *T. asahii*, 2 *Trichosporon mucoides*, 10 *R. glutinis* and 5 *S. salmonicolor*) provided by the BCCM/IHEM Biomedical Fungi/Yeast collection, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) and Faculty of Medicine of Reus (FMR). The isolates were stored lyophilized and were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) for the study. The cultures were incubated at 35°C. Although a reference method for determining the *in vitro* activity of antifungal agents against these species does not exist, we have followed the guidelines of the NCCLS (M27-A2).⁹

Antifungal agents were obtained as pure powders. Amphotericin B (USP, Rockville, MD, USA), voriconazole (Pfizer Inc., Madrid, Spain), itraconazole (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) and ravuconazole (Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, NJ, USA) were diluted in dimethyl sulphoxide (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain). Micafungin (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan) and fluconazole (Pfizer Inc., Madrid, Spain) were diluted in sterile distilled water. The MIC was defined as the lowest drug concentration that produced complete absence of growth. Drug interactions were assessed by a checkerboard microdilution method that also included the determination of the MIC of each drug alone in the same plate by using the parameters outlined in the NCCLS document M27-A2.⁹ Antifungal agents were placed in the rows or in the columns of the trays to perform all possible combinations, with concentrations from 4 to 0.06 mg/L for amphotericin B, 8 to 0.12 mg/L for itraconazole, voriconazole and ravuconazole, 64 to 1 mg/L for fluconazole and 32 to 0.06 mg/L for micafungin. Microplates were read at 48 h for *T. asahii* and *T. mucoides* and at 72 h for *R. glutinis* and *S. salmonicolor*. *Candida krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were included as quality controls.

The fractional inhibitory concentration index (FICI) was used to classify drug interaction. The FICI is the sum of the FIC of each of the drugs, which in turn is defined as the MIC of each drug when used in combination divided by the MIC of the drug when used alone. Interaction was considered synergic if the FIC index was ≤ 0.5 , non-existent if it was > 0.5 and ≤ 4 , and antagonistic if it was > 4 .¹⁰

Results and discussion

Table 1 shows the *in vitro* interactions obtained with the five antifungal drug combinations tested against the clinical isolates of the four species. Of the 135 combinations evaluated, 65 were synergic, and the rest showed no interaction. No antagonistic interactions were produced in any case. Micafungin combined with amphotericin B showed the highest percentage of synergic interactions (78%) when all the isolates were studied together, followed by micafungin/ravuconazole and micafungin/itraconazole (48%) and micafungin/fluconazole and micafungin/voriconazole (34%).

Against *T. asahii*, as has been reported previously, when we tested the antifungals alone only the triazoles showed *in vitro* activity.¹¹ However, here the combination micafungin/amphotericin B demonstrated synergic interactions against all the strains tested, with MIC values for one or the two combined antifungal drugs within the achievable plasma levels.^{6,12}

The other combinations showed a lower percentage of synergic interactions (20–40%) against the isolates of this species. The response to the antifungals of the two strains of *T. mucoides* was very different. Practically all the drugs showed high MICs against one strain and low MICs against the other. But also for this species, the combination micafungin/amphotericin B demonstrated synergic interactions against the two strains tested. The combinations micafungin/fluconazole and micafungin/itraconazole only showed synergy against one strain. The other antifungal combinations did not show synergy against either of the two strains of *T. mucoides* tested.

In our study, the amphotericin B MICs against *R. glutinis* were relatively low (0.25–0.5 mg/L), which agrees with the favourable clinical outcomes observed in infections by *Rhodotorula* spp. treated with this drug.^{1,4} However, due to the high toxicity of this drug, other alternatives have to be explored. In our study, micafungin and azoles, with the exception of ravuconazole, were generally inactive against this species. Diekema *et al.*¹³ obtained similar results. They tested the activity of eight antifungal agents alone against *Rhodotorula* species and only amphotericin B and ravuconazole showed low MIC values against this fungi. For this reason, it is an interesting result that in our study all the antifungal combinations showed a high percentage of synergic interactions (60–80%) with the exception of micafungin/fluconazole that only showed 20% of synergic interactions. For *S. salmonicolor*, the amphotericin B MICs were very variable with a 6-fold difference between the lowest and the highest values (0.25–16 mg/L). But, in general, these values were high, similar to those of fluconazole and micafungin. Against this species, all the drug–drug interactions were strain dependent. The best combination was micafungin/itraconazole with 60% synergic interactions. The other combinations only showed 20–40% synergic interactions. Although these percentages are not as high as for the other species tested, some of these combined therapies could be helpful when amphotericin B fails.

One of the most significant results of this study has been the good activity showed by the combination micafungin/amphotericin B against *T. asahii*, which was synergic against the 10 strains tested. This confirms the *in vivo* effectiveness demonstrated by this combination against two strains of this fungus.⁸ *T. asahii* is the most frequent species of those tested in this study and causes severe human infections. The fact proved here that the susceptibility of this species to this combination is general and probably not strain dependent emphasizes the potential of this combined therapy for trichosporonosis treatment. Further *in vivo* studies are warranted to

elucidate the potential usefulness of these combination therapies against the species tested in this study.

Acknowledgements

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. Anatoliotaki M, Mantadakis E, Galanakis E *et al.* *Rhodotorula* species fungemia: a threat to the immunocompromised host. *Clin Lab* 2003; **49**: 49–55.
2. Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7**: 8–24.
3. Wildfeuer A, Seidl HP, Paule I *et al.* In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses* 1998; **41**: 309–19.
4. Zaas AK, Boyce M, Schell W *et al.* Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5233–5.
5. Ebright JR, Fairfax MR, Vazquez JA. *Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 28–30.
6. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003; **362**: 1142–51.
7. Ryder NS. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses* 1999; **42**: 115–9.
8. Serena C, Pastor FJ, Gilgado F *et al.* Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 497–502.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Second Edition: Approved Standard M27-A2*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
10. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA *et al.* Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 163–94.
11. Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M *et al.* In vitro susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **48**: 2724–6.
12. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE *et al.* Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 828–33.
13. Diekema DJ, Petroelje B, Messer SA *et al.* Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 476–8.

4.4. Interacciones *in vitro* de la micafungina con otros antifúngicos frente a cepas clínicas pertenecientes a cuatro especies de *Cryptococcus*.

In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*.

Serena C, Fernandez B, Pastor FJ, Nolard N, and Guarro J.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005, 49:2994-2996.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

In Vitro Interactions of Micafungin with Other Antifungal Drugs against Clinical Isolates of Four Species of *Cryptococcus*

Carolina Serena,¹ Belkys Fernández-Torres,¹ F. Javier Pastor,¹ Luciana Trilles,² Márcia dos Santos Lazéra,² Nicole Nolard,³ and Josep Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain¹; Serviço de Micologia Médica, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil²; and Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium³

Received 3 February 2005/Returned for modification 3 March 2005/Accepted 11 March 2005

The combination of micafungin (MFG) with amphotericin B (AMB), fluconazole, itraconazole, voriconazole, or ravuconazole was evaluated against 37 strains of four species of *Cryptococcus* by the checkerboard method. Antagonism was never seen. Synergy was observed for some isolates for each combination and was most frequent with MFG-AMB.

Cryptococcosis is, despite aggressive antifungal therapy, an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients, especially those with AIDS (4, 6, 12). Apart from *Cryptococcus neoformans*, other species of this genus are commonly involved in human infections, e.g., *C. gattii* and, less frequently, *C. albidus* and *C. laurentii* (13, 15, 16). The treatment of choice for cryptococcosis is amphotericin B (AMB), with or without flucytosine (5FC) and fluconazole (FLC) (24). The toxicity of AMB and 5FC and the increasing isolation of FLC-resistant strains (5, 25) underline the need for improved treatments and the use of new strategies. Combined therapies can be useful for this purpose (17). Several studies have evaluated the interactions of AMB or 5FC with other drugs or with each other against *Cryptococcus* (1, 2, 3, 10, 20, 21, 26), but little is known about the interactions between echinocandins and AMB or azoles (10, 23). We have evaluated the activity of micafungin (MFG) in combination with four other drugs against strains of the four species of *Cryptococcus* mentioned above.

We tested a total of 37 clinical isolates (Tables 1 and 2). Antifungal agents were obtained as pure powders. AMB, voriconazole (VRC), itraconazole (ITC), and ravuconazole (RVC) were diluted in dimethyl sulfoxide. MFG and FLC were diluted in sterile distilled water. For all drugs, the MIC was defined as the lowest drug concentration that produced 100% inhibition of visible fungal growth after 72 h of incubation. Antifungal agents were placed in rows or in columns of the trays to test all possible combinations; the highest concentrations were 4 µg/ml for AMB, 8 µg/ml for ITC, VRC and RVC, and 32 µg/ml for FLC and MFG. Drug interactions were assessed by a checkerboard microdilution method (8). The MIC of each drug alone was determined according to the NCCLS (19). The fractional inhibitory concentration index (FICI) was used to classify drug interactions (14). The procedure, conservation of the strains, and quality controls have all been detailed previously (22, 28). Approximately 80% of the tests were repeated,

and interactions mainly showed the same tendencies (data not shown).

Table 1 shows the in vitro interactions between MFG and AMB or FLC against clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii*. Due to the low MICs of ITC, VRC, and RVC for the strains of *C. neoformans* and *C. gattii* tested (<0.12 µg/ml in all cases), we could not evaluate the in vitro interactions of MFG with these azoles against these species. MFG-AMB showed the highest percentage of synergistic interactions (70% for *C. neoformans* and 80% for *C. gattii*). MFG-FLC showed a lower percentage of synergistic interactions (30% for *C. neoformans* and 20% for *C. gattii*).

Table 2 shows the in vitro interactions between MFG and AMB or azoles against clinical isolates of *C. albidus* and *C. laurentii*. MFG in combination with AMB showed synergy for five isolates of *C. albidus* (50%) and five of *C. laurentii* (71%). Synergistic interactions between MFG and FLC were observed for four isolates of *C. albidus* (40%) and three isolates of *C. laurentii* (15%). For the two species, MFG combined with ITC showed similar percentages of synergistic interactions, i.e., 30 and 29%, respectively. Interactions between MFG and VRC were highly dependent on the species tested. With six isolates of *C. albidus* (60%), this combination showed synergy, whereas for all isolates of *C. laurentii* tested, the results were indifferent. A high number of synergistic interactions were observed with MFG in combination with RVC for both species tested (60% for *C. albidus* and 71% for *C. laurentii*).

Antagonism was not detected for any of the antifungal combinations assayed, although in 14% of the cases MICs were higher than the highest concentrations used to detect any interaction.

In our study, AMB generally showed low MICs against all the isolates tested. AMB alone or in combination with 5FC is commonly used in the treatment of *C. neoformans* and *C. gattii* infections (24), but its toxicity limits its usefulness. FLC is an alternative regimen for colonization and mild to moderate pulmonary disease in the immunocompetent host and constitutes a consolidation therapy for severe and progressive pulmonary and central nervous system disease (24). However, in our study we observed a wide range of FLC MICs, with a

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone: 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.net.

TABLE 1. Interactions of MFG with AMB and FLC against isolates of *C. neoformans* and *C. gattii*

Species (n) and isolate ^a tested	MIC (µg/ml)			FICI ^b for AMB-MFG	MIC (µg/ml)		FICI ^b for FLC-MFG
	AMB	MFG	AMB-MFG		FLC	FLC-MFG	
<i>C. neoformans</i> (10)							
FMR 8393	1	64	0.25/16	0.5	16	16/64	2
FMR 8398	1	64	0.25/16	0.5	32	32/64	2
FMR 8400	0.5	64	0.12/8	0.4	16	16/64	2
FMR 8401	0.5	64	0.12/8	0.4	8	2/2	0.3
FMR 8408	0.25	64	0.12/4	0.6	2	2/64	2
FMR 8409	0.5	64	0.12/16	0.5	1	1/64	2
FMR 8411	1	64	0.25/2	0.3	32	4/0.25	0.1
FMR 8415	0.5	64	0.25/4	0.6	8	8/64	2
FMR 8416	0.5	64	0.12/16	0.5	8	8/64	2
FMR 8420	0.25	64	0.12/8	0.6	4	1/16	0.5
<i>C. gattii</i> (10)							
FMR 8402	0.5	64	0.12/16	0.5	64	64/64	2
FMR 8403	0.06	64	0.06/0.06	1	32	32/64	2
FMR 8404	0.5	64	0.12/0.25	0.2	64	64/64	2
FMR 8405	0.25	64	0.12/2	0.6	64	64/64	2
FMR 8406	0.5	64	0.12/0.5	0.2	32	32/64	2
FMR 8407	0.25	64	0.06/16	0.5	64	64/64	2
FMR 8410	0.25	64	0.06/16	0.5	32	8/16	0.5
FMR 8412	0.25	64	0.06/16	0.5	8	2/16	0.5
FMR 8413	0.25	64	0.06/16	0.5	32	32/64	2
FMR 8414	0.5	64	0.12/0.25	0.2	32	32/64	2

^a FMR, Faculty of Medicine, University of Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain.

^b FICI scores: ≤0.5, synergistic; >0.5 and ≤4, indifferent; >4, antagonistic (14).

predominance of MICs of 64 µg/ml. ITC can be an alternative to FLC in *C. neoformans* infections (24). In our study this drug showed low MICs for *C. neoformans*, *C. gattii*, and *C. laurentii* strains, but MICs as high as 16 µg/ml were obtained for 3 of the 10 isolates of *C. albidus*, suggesting a lack of activity. No clinical reports exist on the use of ITC for the treatment of *C. laurentii* and *C. albidus* infections. The high toxicity of AMB, the variable activity of FLC, and the poor experience in the management of *C. laurentii* and *C. albidus* infections have led

to the testing of new therapeutic approaches. Combined treatments seem to be good candidates for this purpose. In a preliminary study (data not shown), we observed a higher percentage of synergistic interactions with MFG-azole or MFG-AMB than with AMB-azole combinations. Echinocandins are inactive against *C. neoformans* (7), and data showing their in vitro activities against other *Cryptococcus* spp. are scarce (9, 28, 29). In this study, MFG alone was also inactive against all of the 37 isolates tested. However, when MFG was combined with other

TABLE 2. Interactions of MFG with AMB and various azoles against isolates of *C. albidus* and *C. laurentii*

Species (n) and isolate ^a tested	MIC (µg/ml)			FICI ^b for AMB-MFG	MIC (µg/ml)		FICI for FLC-MFG	MIC (µg/ml)		FICI for ITC-MFG	MIC (µg/ml)		FICI for VRC-MFG	MIC (µg/ml)		FICI for RVC-MFG
	AMB	MFG	AMB-MFG		FLC	FLC-MFG		ITC	ITC-MFG		VRC	VRC-MFG		RVC	RVC-MFG	
<i>C. albidus</i> (10)																
IHEM 4786	0.5	64	0.25/8	0.6	64	64/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2	16	8/32	1
IHEM 2740	0.25	64	0.06/16	0.5	64	64/64	2	1	1/64	2	2	2/64	2	1	0.25/16	0.5
IHEM 3267	0.5	64	0.12/16	0.5	64	64/64	2	0.25	0.25/64	2	8	2/8	0.4	8	1/8	0.2
IHEM 5516	0.5	64	0.25/8	0.6	64	16/16	0.5	0.5	0.12/16	0.5	0.5	0.12/0.25	0.2	1	0.25/16	0.5
IHEM 6283	0.25	64	0.12/8	0.6	32	16/0.06	0.6	4	1/8	0.3	16	4/0.06	0.2	16	8/8	0.6
IHEM 6286	0.5	64	0.25/4	0.6	64	64/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2
IHEM 6699	0.25	64	0.06/0.25	0.4	64	16/4	0.3	0.5	0.5/64	2	2	0.5/16	0.5	0.25	0.06/0.06	0.2
IHEM 6723	1	64	0.25/16	0.5	64	64/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2
IHEM 6895	0.5	64	0.12/16	0.5	64	16/0.5	0.2	1	0.25/16	0.5	1	0.25/16	0.5	2	0.5/16	0.5
IHEM 10432	0.25	64	0.12/1	0.6	16	4/0.25	0.2	0.25	0.12/2	0.6	0.25	0.06/16	0.5	0.25	0.06/16	0.5
<i>C. laurentii</i> (7)																
IHEM 8060	0.5	64	0.12/16	0.5	16	16/64	2	1	0.25/16	0.5	0.25	0.25/64	2	0.25	0.06/16	0.5
IHEM 8061	0.5	64	0.12/8	0.3	4	4/64	2	4	4/64	2	2	2/64	2	4	1/16	0.5
IHEM 8062	0.5	64	0.12/16	0.5	32	16/0.06	0.6	1	0.25/16	0.5	2	2/64	2	0.25	0.12/8	0.6
IHEM 8063	0.5	64	0.12/16	0.5	2	1/0.06	0.6	0.25	0.25/64	2	1	1/64	2	0.25	0.06/16	0.5
IHEM 8064	0.25	64	0.12/64	0.7	64	64/64	2	0.12	0.12/64	2	0.12	0.12/64	2	0.5	0.5/64	2
FMR 8123	0.25	64	0.06/0.06	0.2	32	32/64	2	0.5	0.5/64	2	0.25	0.25/64	2	0.12	0.12/64	2
FMR 8515	0.5	64	0.12/16	0.5	64	16/0.06	0.2	0.5	0.12/16	0.5	0.5	0.25/16	0.7	0.5	0.5/64	2

^a FMR, Faculty of Medicine, University of Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain; IHEM, Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute, Brussels, Belgium.

^b FICI scores: ≤0.5, synergistic; >0.5 and ≤4, indifferent; >4, antagonistic (14).

antifungals, especially AMB, MFG MICs often went down by as much as 10 dilutions, and in many cases they went below peak plasma levels achieved by this drug in humans (7) and experimental infection (11). Although combinations of MFG with azoles have also frequently resulted in synergistic interactions, MICs were generally over the therapeutic values.

MFG combined with AMB or azoles has also demonstrated synergy and efficacy in animal model infections of *Aspergillus fumigatus* (18) and *Trichosporon asahii* (27). The good results obtained in this study encourage us to perform further studies with animal models to confirm the potential of these combinations for the treatment of cryptococcosis.

We thank C. Sanmarti for technical assistance.

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

REFERENCES

1. Barchiesi, F., D. Arzeni, A. W. Fothergill, L. F. Di Francesco, F. Caselli, M. G. Rinaldi, and G. Scalise. 2000. In vitro activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:226–229.
2. Barchiesi, F., D. Gallo, F. Caselli, L. F. Di Francesco, D. Arzeni, A. Giacometti, and G. Scalise. 1999. In-vitro interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:65–70.
3. Barchiesi, F., A. M. Schimizzi, L. K. Najvar, R. Bocanegra, F. Caselli, S. Di Cesare, D. Giannini, L. F. Di Francesco, A. Giacometti, F. Carle, G. Scalise, and J. R. Graybill. 2001. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1355–1359.
4. Bennett, J. E., W. E. Dismukes, R. J. Duma, G. Medoff, M. A. Sande, H. Gallis, J. Leonard, B. T. Fields, M. Bradshaw, H. Haywood, Z. A. McGee, T. R. Cate, C. G. Cobbs, J. F. Warner, and D. W. Alling. 1979. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* **301**:126–131.
5. Currie, B. P., M. Ghannoum, L. Bessen, and A. Casadevall. 1995. Decreased fluconazole susceptibility of a relapse *Cryptococcus neoformans* isolate after fluconazole treatment. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **4**:318–319.
6. de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, and University Rovira I Virgili, Reus, Spain.
7. Denning, D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**:1142–1151.
8. Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering. 1991. Antimicrobial combinations, p. 432–492. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
9. 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.
10. Franzot, S. P., and A. Casadevall. 1997. Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:331–336.
11. Groll, A. H., D. Mickiene, V. Petraitis, R. Petraitiene, K. H. Ibrahim, S. C. Piscitelli, I. Bekersky, and T. J. Walsh. 2001. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal echinocandin lipopeptide micafungin (FK463) in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3322–3327.
12. Groll, A. H., and T. J. Walsh. 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**(Suppl. 2):8–24.
13. Johnson, L. B., S. F. Bradley, and C. A. Kauffman. 1998. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcaemia. *Mycoses* **41**:277–280.
14. Johnson, M. D., C. MacDougall, L. Ostrosky-Zeichner, J. R. Perfect, and J. H. Rex. 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:693–715.
15. Karstaedt, A. S., H. H. Crewe-Brown, and F. Dromer. 2002. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, in AIDS patients in Soweto, South Africa. *Med. Mycol.* **40**:7–11.
16. Kordosis, T., A. Avlami, A. Velegraki, I. Stefanou, G. Georgakopoulos, C. Papalambrou, and N. J. Legakis. 1998. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med. Mycol.* **36**:335–339.
17. Lewis, R. E., and D. P. Kontoyiannis. 2001. Rationale for combination antifungal therapy. *Pharmacotherapy* **21**:149S–164S.
18. Luque, J. C., K. V. Clemons, and D. A. Stevens. 2003. Efficacy of micafungin alone or combination against systemic murine aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1452–1455.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
20. Nguyen, M. H., F. Barchiesi, D. A. McGough, V. L. Yu, and M. G. Rinaldi. 1995. In vitro evaluation of combination of fluconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1691–1695.
21. Nguyen, M. H., L. K. Najvar, C. Y. Yu, and J. R. Graybill. 1997. Combination therapy with fluconazole and flucytosine in the murine model of cryptococcal meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1120–1123.
22. Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol, C. Yustes, C. Serena, and J. Guarro. 2004. In vitro interactions of approved and novel drugs against *Paeclomyces* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2727–2729.
23. Roling, E. E., M. E. Klepser, A. Wasson, R. E. Lewis, E. J. Ernst, and M. A. Pfaller. 2002. 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.* **43**:13–17.
24. Saag, M. S., R. J. Graybill, R. A. Larsen, P. G. Pappas, J. R. Perfect, W. G. Powderly, J. D. Sobel, and W. E. Dismukes. 2000. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin. Infect. Dis.* **30**:710–718.
25. Sar, B., D. Monchy, M. Vann, C. Keo, J. L. Sarthou, and Y. Buisson. 2004. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:563–565.
26. Schwarz, P., F. Dromer, O. Lortholary, and E. Dannaoui. 2003. In vitro interaction of flucytosine with conventional and new antifungals against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3361–3364.
27. Serena, C., F. J. Pastor, F. Gilgado, E. Mayayo, and J. Guarro. 2005. Efficacy of micafungin in combination in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:497–502.
28. Serena, C., F. J. Pastor, M. Ortoneda, J. Capilla, N. Nolard, and J. Guarro. 2004. In vitro antifungal susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2724–2726.
29. Trilles, L., B. Fernández-Torres, M. D. S. Lazera, B. Wanke, and J. Guarro. 2004. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4815–4817.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

4.5. Eficacia del voriconazol en un modelo de tricosporonosis invasiva en el cobaya.

Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive trichosporonosis.

Serena C, Gilgado F, Marine M, Pastor FJ, and Guarro J.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006, 50:2240-2243.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

Efficacy of Voriconazole in a Guinea Pig Model of Invasive Trichosporonosis

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

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

Received 11 January 2006/Returned for modification 13 February 2006/Accepted 15 March 2006

We have evaluated the efficacy of voriconazole (VRC) in a systemic infection by *Trichosporon asahii* in immunosuppressed guinea pigs. VRC was more effective than amphotericin B in prolonging survival and reducing tissue burden. The best results were obtained with VRC at 10 mg/kg of body weight/day.

Trichosporonosis is an uncommon but frequently fatal invasive infection of immunocompromised patients caused by *Trichosporon* spp. (12, 18, 20, 21). *Trichosporon asahii* is the most common species involved (10, 11, 12, 13). Trichosporonosis is generally treated with amphotericin B (AMB) or fluconazole, commonly with an unsatisfactory outcome (1, 4, 6, 9, 12, 22). In a previous study we also demonstrated, using a murine model of disseminated infection by *T. asahii*, that the efficacy of both drugs was very limited but improved when each of them was combined with micafungin (16).

The aim of this study was to determine whether other therapeutic alternatives would also be effective in the treatment of trichosporonosis. Since voriconazole (VRC) has demonstrated in vitro activity (7, 9, 17, 19) even against multidrug-resistant strains of *T. asahii* (8), and favorable outcomes in several clinical cases have been reported (3, 9), we have evaluated the effectiveness of this drug in a guinea pig model. The pharmacokinetics of VRC in guinea pigs makes these animals appropriate for testing of this drug (15).

We have tested two isolates of *T. asahii*, IHEM 17910, from a blood culture of a patient with posthepatitis medullar aplasia, and IHEM 9325, from the floor of a swimming pool. On the day of infection, 24-h cultures on Sabouraud dextrose agar (SDA) were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells or hyphae. The resulting suspensions, containing $\geq 95\%$ conidial forms (arthroconidia and blastoconidia), were adjusted to the desired inoculum based on hemocytometer counts and by serial plating on SDA to confirm viability.

MICs of AMB and VRC against the two strains used in the study were determined by using a broth microdilution method for yeasts (14) and were defined as the lowest concentration resulting in 100% inhibition of growth for AMB and 50% inhibition of growth for VRC.

We used Hartley albino guinea pigs weighing 450 to 500g, and the Animal Welfare Committee at our university approved the conditions. Neutropenia was induced by intraperitoneal administration of cyclophosphamide at 100 mg/kg of

body weight on days -3, -1, +1, +3, +8, and +13 (5). Animals were challenged intravenously with 6×10^6 CFU for strain IHEM 17910 and 1.2×10^7 CFU for IHEM 9325 in 0.2 ml. During a preliminary study to establish the lethal dose, we tested inocula of 6×10^6 , 1.2×10^7 , and 2×10^7 CFU, and we chose those inocula that produced an acute infection, with 100% of animals dying within 7 days of infection.

Groups of six animals were treated with VRC or AMB, both administered once a day. VRC was dissolved in polyethylene glycol and administered at 5 mg/kg/day (V5) or 10 mg/kg/day (V10) orally. AMB was administered at 1.5 mg/kg/day (A1.5) intraperitoneally. All the treatments began 24 h after infection and continued for 7 days. For tissue burden studies, we did a second experiment under the conditions described above, and the day after treatment finished, five animals for each strain and each treatment were sacrificed. Kidneys, spleens, and liver were removed aseptically, weighed, and homogenized in 2 ml of saline. Serial 10-fold dilutions were plated on SDA plates to determine numbers of CFU per gram, and plates were incubated at 35°C for 48 h.

Survival rates were evaluated by the Kaplan-Meier test with Graph Pad Prism software for Windows. CFU counts were analyzed by the Mann-Whitney U test using SPSS 11.5 for Windows.

In vitro results. VRC showed very low MICs for both strains, IHEM 17910 and IHEM 9325 (0.06 and 0.03 $\mu\text{g/ml}$, respectively). The AMB MIC for both strains was 1 $\mu\text{g/ml}$.

In vivo results. For strain IHEM 17910, A1.5 surprisingly decreased survival relative to that of the control group ($P = 0.009$) and V5 was not able to improve the survival of the control group ($P = 0.2034$). V10 prolonged survival relative to that of the control group ($P = 0.0052$), A1.5 ($P = 0.0058$), and V5 ($P = 0.0069$). Survival with V10 was 83.3%. For strain IHEM 9325, survival was improved over that of the control group by A1.5, V5, and V10 ($P = 0.0047$, $P = 0.0082$, and $P = 0.0047$, respectively). No significant mean survival time differences between V5 and V10 were observed for this strain ($P = 0.0736$). Only V10 prolonged survival relative to that with A1.5, attaining 100% survival ($P = 0.0058$) (Fig. 1).

A1.5 did not reduce the fungal load in kidneys, spleens, and livers of animals infected with strain IHEM 17910. However, for strain IHEM 9325, this drug reduced the fun-

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone: 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.net.

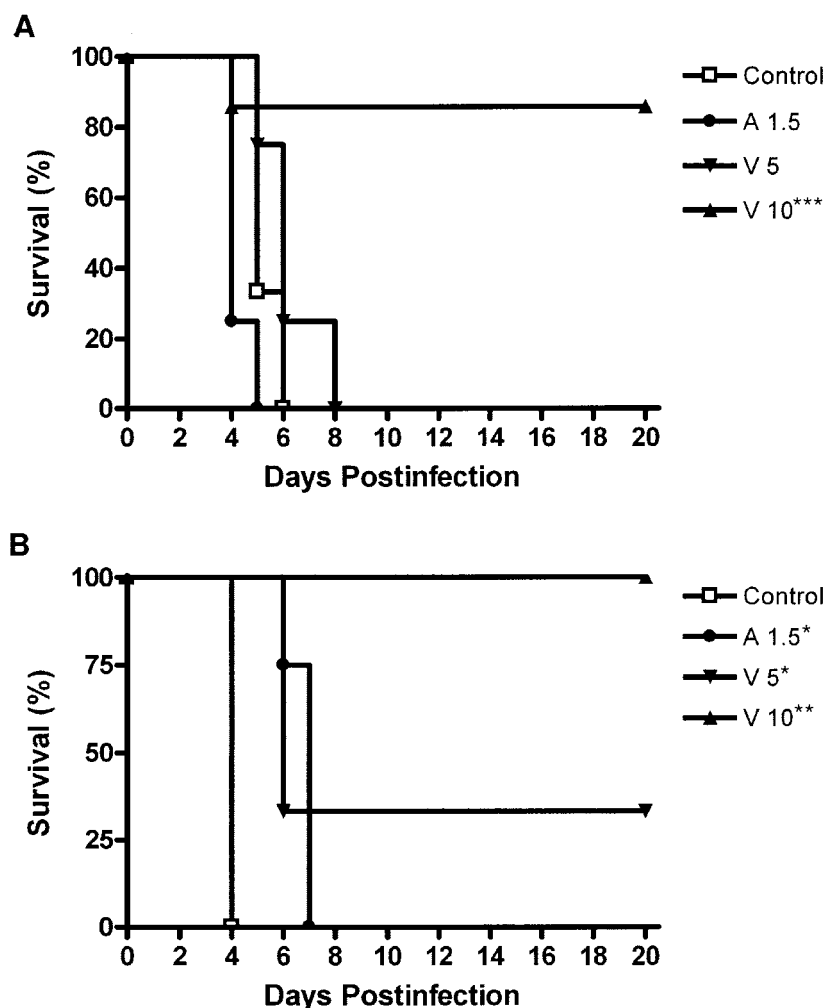


FIG. 1. Cumulative mortality of guinea pigs ($n = 6$) infected with *T. asahii* IHEM 17910 (A) or *T. asahii* IHEM 9325 (B) and given the indicated treatments. * $P < 0.05$ versus control; **, $P < 0.05$ versus control and A1.5; ***, $P < 0.05$ versus V5.

gal loads in the three organs relative to those for the control group ($P < 0.05$). V5 for strain IHEM 17910 was able to reduce fungal loads significantly only in the kidneys and liver in comparison to the control group and A1.5. However, for strain IHEM 9325, V5 was able to reduce the fungal load in the liver only relative to that of the control group ($P < 0.05$), not versus A1.5. V10 significantly reduced tissue burdens for the two strains in comparison to controls and to the other two treatments (Fig. 2).

To our knowledge, this is the first report of disseminated trichosporonosis in a guinea pig model. The lack of efficacy of AMB observed here agrees with previous work using another animal model (16) and with clinical data (9). However, in some clinical cases, after failure of AMB and fluconazole therapy, the infection improved with VRC (3, 9). Our results confirmed the effectiveness of this drug (3, 9).

Pharmacodynamic parameters have proved to be useful in predicting antifungal efficacy (2). For azoles, values of the AUC (the 24-h area under the concentration-time curve)/MIC ratio over 25 are associated with a good outcome (2). In guinea pigs, the AUC for VRC at 10 mg/kg given once a day for 7 days

is 29.0 (15). Consequently, the drug AUC/MIC ratio in our study was clearly superior to 25, even considering that the plasma protein binding of VRC in guinea pigs is 45% (15).

In summary, VRC has shown efficacy against systemic trichosporonosis and may represent an important advance in the therapy of this disease.

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

REFERENCES

- Anaissie, E. J., G. P. Bodey, H. Kantarjian, J. Ro, S. E. Vartivarian, R. Hopper, J. Hoy, and K. Rolston. 1989. New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev. Infect. Dis.* **11**:369–378.
- Andes, D., K. Marchillo, T. Stamstad, and R. Conklin. 2003. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3165–3169.
- Antachopoulos, C., E. Papakonstantinou, J. Dotis, E. Bibashi, M. Tamiolaki, D. Kolioukas, and E. Roilides. 2005. Fungemia due to *Trichosporon asahii* in a neutropenic child refractory to amphotericin B: clearance with voriconazole. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **27**:283–285.
- Cawley, M. J., G. R. Braxton, L. R. Haith, K. J. Reilly, R. E. Guilday, and M. L. Patton. 2000. *Trichosporon beigelii* infection: experience in a regional burn center. *Burns* **26**:483–486.

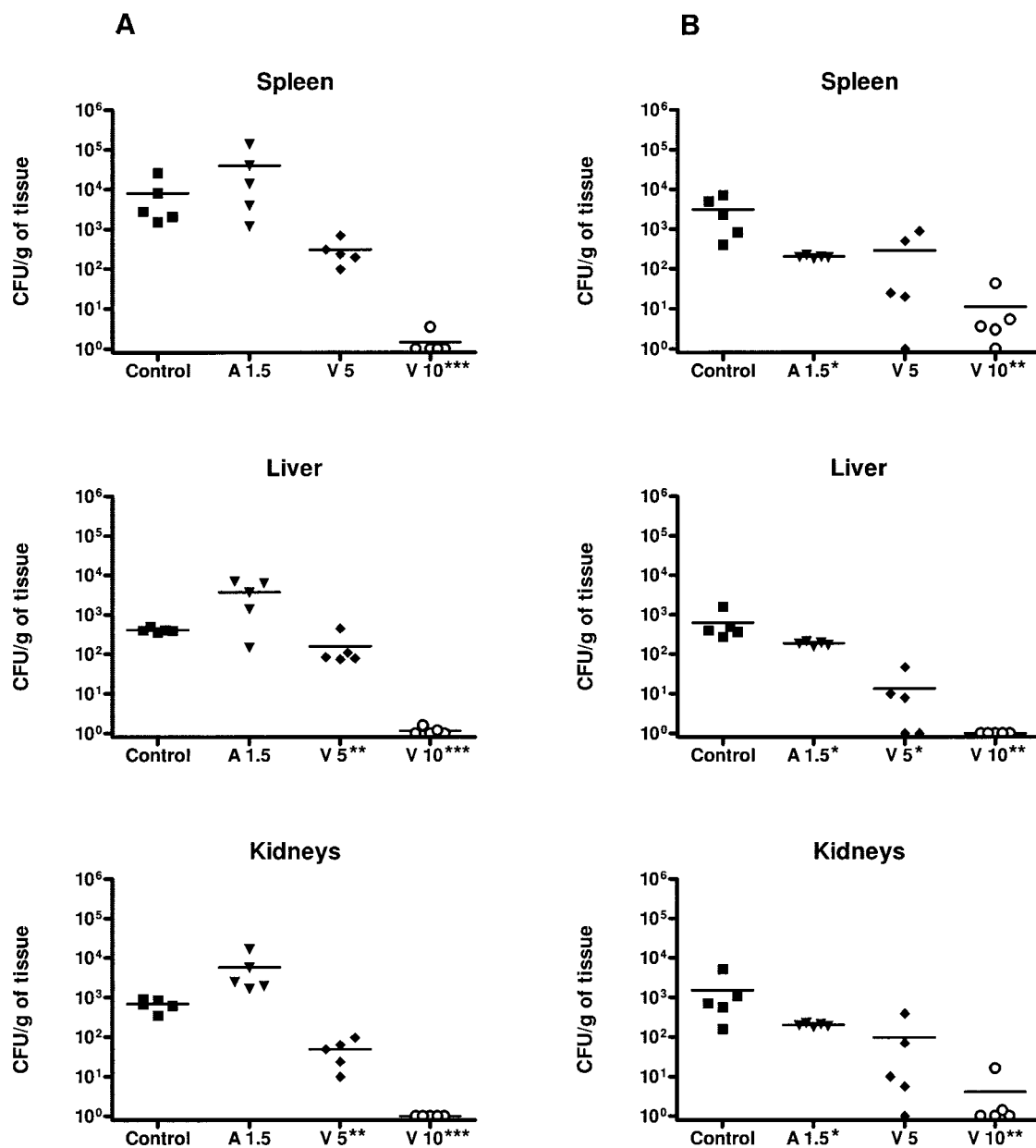


FIG. 2. Effects of the antifungal treatments on colony counts of *T. asahii* strains IHEM 17910 (A) and IHEM 9325 (B) in spleens, livers, and kidneys of guinea pigs. *, $P < 0.05$ versus control; **, $P < 0.05$ versus control and A1.5; ***, $P < 0.05$ versus V5. Horizontal lines indicate mean values.

- Chandrasekar, P. H., J. Cutright, and E. Manavathu. 2000. Efficacy of voriconazole against invasive pulmonary aspergillosis in a guinea pig model. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:673–676.
- Ebright, J. R., M. R. Fairfax, and J. A. Vazquez. 2001. *Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia. *Clin. Infect. Dis.* 33:28–30.
- Espinel-Ingroff, A. 1998. In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36:198–202.
- Falk, R., D. G. Wolf, M. Shapiro, and I. Polacheck. 2003. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* isolates are susceptible to voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* 41:911.
- Fournier, S., W. Pavageau, M. Feuillhade, S. Deplus, A. M. Zagdanski, O. Verola, H. Dombret, and U. M. Molina. 2002. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21:892–896.
- Groll, A. H., and T. J. Walsh. 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin. Microbiol. Infect.* 7:824.
- Guého, E., M. T. Smith, G. S. de Hoog, G. Billon-Grand, R. Christen, and W. H. Batenburg-van der Vegte. 1992. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Leeuwenhoek* 62:289–316.
- Itoh, T., H. Hosokawa, U. Kohdera, N. Toyazaki, and Y. Asada. 1996. Disseminated infection with *Trichosporon asahii*. *Mycoses* 39:195–199.
- Moretti-Branchini, M. L., K. Fukushima, A. Z. Schreiber, K. Nishimura, P. M. Papiadnanou, P. Trabasso, R. Tanaka, and M. Miyaji. 2001. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 39:161–164.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27–A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Roffey, S. J., S. Cole, P. Comby, D. Gibson, S. G. Jezequel, A. N. R. Nedderman, D. A. Smith, D. K. Walker, and N. Wood. 2003. The dispo-

- sition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog and human. *Drug Metab. Dispos.* **31**:731-741.
16. **Serena, C., F. J. Pastor, F. Gilgado, E. Mayayo, and J. Guarro.** 2005. Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:497-502.
 17. **Serena, C., F. J. Pastor, M. Ortoneda, J. Capilla, N. Nolard, and J. Guarro.** 2004. In vitro antifungal susceptibility of uncommon basidiomycetous yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2724-2726.
 18. **Tashiro, T., H. Nagai, H. Nagaoka, Y. Goto, P. Kamberi, and M. Nasu.** 1995. *Trichosporon beigelii* pneumonia in patients with hematologic malignancies. *Chest* **108**:190-195.
 19. **Uzun, O., S. Arikan, S. Kocagoz, B. Sancak, and S. Unal.** 2000. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish university hospital and effect of time of reading. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **38**:101-107.
 20. **Vasta, S., M. Menozzi, R. Scime, A. Indovina, A. Speciale, G. Liberti, C. Spano, and I. Majolino.** 1993. Central catheter infection by *Trichosporon beigelii* after autologous blood stem cell transplantation. A case report and review of the literature. *Haematologica* **78**:64-67.
 21. **Walsh, T. J., K. R. Newman, M. Moody, R. C. Wharton, and J. C. Wade.** 1986. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. *Medicine (Baltimore)* **65**:268-279.
 22. **Walsh, T. J., G. P. Melcher, M. G. Rinaldi, J. Lecciones, D. A. McGough, P. Kelly, J. Lee, D. Callender, M. Rubin, and P. A. Pizzo.** 1990. *Trichosporon beigelii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1616-1622.

4.6. Efecto del tratamiento antifúngico en un modelo de blastosquizomicosis en ratón.

Effect of antifungal treatment in a murine model of blastoschizomycosis.

Serena C, Marine M, Marimon R, Pastor FJ, and Guarro J.

International Journal of Antimicrobial Agents. 2007. 29:79-83.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007



ELSEVIER

International Journal of Antimicrobial Agents 29 (2007) 79–83

INTERNATIONAL JOURNAL OF
**Antimicrobial
Agents**

www.ischemo.org

Effect of antifungal treatment in a murine model of blastoschizomycosis

Carolina Serena, Marçal Mariné, Rita Marimon, Francisco Javier Pastor, 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 29 May 2006; accepted 7 August 2006

Abstract

Blastoschizomyces capitatus is an emerging pathogenic fungus that can cause deep invasive diseases in neutropenic patients. We developed a model of disseminated blastoschizomycosis in immunosuppressed mice to evaluate the effectiveness of amphotericin B, flucytosine, fluconazole and voriconazole. High-dose fluconazole was the most effective drug at prolonging the survival of mice and at reducing fungal burden in the kidneys, spleen and liver.

© 2006 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

Keywords: *Blastoschizomyces capitatus*; *Geotrichum capitatum*; Blastoschizomycosis; Antifungal agents; Murine model

1. Introduction

Blastoschizomyces capitatus (formerly known as *Geotrichum capitatum*) is an emerging opportunistic fungus that predominantly affects immunosuppressed patients [1]. Infections by *B. capitatus* occur mainly in Europe and in patients with acute leukaemia [2,3]. The estimated mortality rate is ca. 50% [2] and in patients with profound neutropenia it can be >90% [4]. It has been recommended that these infections are treated by rapid removal of the central venous catheter if there is one, and by amphotericin B (AMB), either alone, associated with flucytosine (5-FC) or followed by fluconazole (FLC) [2,4], or by novel antifungal therapies [5]. However, some controversy exists regarding the susceptibility of this fungus to AMB. Some authors have reported that susceptibility to this drug is reduced [5], whilst others have indicated that it is high [3,6]. In addition, FLC-resistant strains have been reported to be nosocomial pathogens [7] and 5-FC is not suitable for neutropenic patients. Although voriconazole (VRC) has shown some in vitro activity [6,8], few data are available regarding the activity of the new triazoles against *B. capitatus* isolates. In the present study, we have developed a murine model of disseminated blastoschizomycosis in immunosuppressed

mice to evaluate the efficacy of AMB, FLC, 5-FC and VRC against two strains of *B. capitatus*.

2. Materials and methods

2.1. Fungi

The in vitro antifungal susceptibilities of six clinical strains of *B. capitatus* were tested against AMB, FLC, 5-FC and VRC using a broth microdilution method following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly the National Committee for Clinical Laboratory Standards) for yeasts [9]. For the in vivo studies, the *B. capitatus* strains IHEM 5666 from a blood culture of a patient with acute leukaemia and IHEM 16105 from the sputum of a patient with cystic fibrosis were chosen, since they showed the highest minimum inhibitory concentration (MIC) differences for VRC and 5-FC. The isolates were stored at -80°C in potato dextrose broth with glycerol. Prior to testing they were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) at 35°C . On the day of infection, 24 h cultures on SDA were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells or hyphae. The resulting suspensions, containing $\geq 95\%$ conidial forms (arthroconidia and blastoconidia), were adjusted to the desired inoculum based on haemocytometer counts. Dilutions of the original suspension

* Corresponding author. Tel.: +34 977 759 341; fax: +34 977 759 322.
E-mail address: josep.guarro@urv.cat (J. Guarro).

were cultured on SDA plates to confirm the haemocytometer count.

2.2. Animals

OF1 male mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) with a mean weight of 30 g were used. Animals were housed in standard boxes with corn cob bedding and free access to food and water. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee.

2.3. Drugs

AMB was purchased as Fungizona® (Squibb Industrial Farmaceutica S.A., Barcelona, Spain) and VRC as Vfend® (Pfizer Ltd., Sandwich, UK). FLC was supplied by Pfizer Inc. (Madrid, Spain) and 5-FC was obtained from Sigma–Aldrich Corp. (St Louis, MO).

2.4. Immunosuppression

Mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal injection of 200 mg/kg cyclophosphamide (Genoxal®; Laboratorios Funk S.A., Barcelona, Spain) plus a single intravenous injection of 150 mg/kg 5-fluorouracil (Productos Roche S.A., Madrid, Spain) on the day of infection [10].

2.5. Infection and therapy

To establish the infective dose, groups of ten mice were challenged with each of the following inocula: 2×10^5 , 2×10^6 or 2×10^7 colony-forming units (CFU)/mouse of strains IHEM 16105 or IHEM 5666 in 0.2 mL of sterile saline into the lateral tail vein.

Groups of 15 mice were established for each strain and treatment. Ten mice were used for survival studies and five mice for tissue burden studies. Mice used for tissue burden studies were identified before the study started. Treatment began 1 day after infection and continued for 6 days. AMB was given at 1 mg/kg/day or 3 mg/kg/day intraperitoneally in a volume of 0.2 mL; FLC was given at 40 mg/kg/day or 80 mg/kg/day administered twice a day orally by gavage (p.o.) in a volume of 0.1 mL; VRC was given at 40 mg/kg/day administered twice a day p.o. in a volume of 0.1 mL; and 5-FC was given at 60 mg/kg/day dissolved in the sole source of drinking water [11,12]. Control animals received no treatment. Three days prior to infection, the mice receiving VRC were given grapefruit juice (Hero España, Murcia, Spain) in place of water [11]. Mice were checked daily for 30 days after the challenge.

2.6. Tissue burden studies

For tissue burden studies, the day after treatment finished five mice for each *B. capitatus* strain and each treatment

were sacrificed. The liver, spleen and kidneys were aseptically removed and portions of each organ were homogenised in 1 mL of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on SDA and incubated for 48 h at 35 °C. The numbers of CFU per gram of tissue were calculated.

2.7. Statistics

Mean survival time (MST) was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups using the log-rank test. Colony counts in tissue burden studies were analysed by the Mann–Whitney *U*-test. Calculations were done using SPSS for Windows version 11.5.

3. Results

3.1. In vitro results

The antifungal activities of the drugs tested against six strains of *B. capitatus* are shown in Table 1.

3.2. In vivo results

In groups of mice inoculated both with strains IHEM 16105 and IHEM 5666, mortality increased with the size of the inoculum (Fig. 1). For survival and tissue burden studies, an inoculum of 2×10^6 CFU/mouse was chosen, which killed all the animals within 5–8 days (median 6.77 days) for strain IHEM 16105 and within 5–9 days (median 6.67 days) for strain IHEM 5666.

Fig. 2 and Table 2 show the effects of each treatment on mice survival. For strain IHEM 16105, all the antifungals tested significantly prolonged the MST compared with the control group ($P < 0.05$). AMB at 3 mg/kg/day did not significantly prolong the MST compared with AMB at 1 mg/kg/day. FLC at 40 mg/kg/day or 80 mg/kg/day and 5-

Table 1

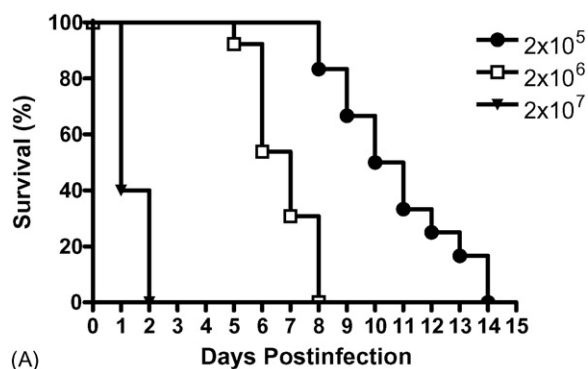
In vitro antifungal activities of various antifungal drugs against six clinical strains of *Blastoschizomyces capitatus*

Strains IHEM ^a	MIC (µg/mL) ^b			
	AMB	FLC	VRC	5-FC
5091	2	4	0.25	16
5665	2	8	0.25	0.25
5666	1	16	0.25	64
6803	4	16	0.5	0.25
16105	1	8	1	0.25
16109	1	32	1	0.25

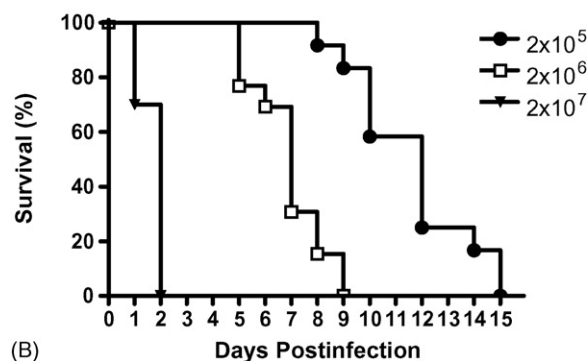
MIC, minimum inhibitory concentration; AMB, amphotericin B; FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; 5-FC, flucytosine.

^a IHEM, Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute, Brussels, Belgium.

^b The MIC of AMB corresponds to complete (100%) growth inhibition, and those of FLC, VRC and 5-FC correspond to prominent growth inhibition (ca. 50% of the growth control).

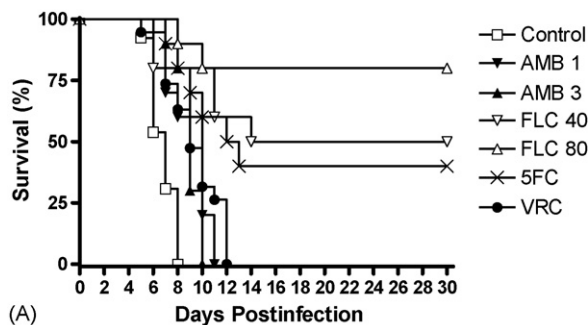


(A)

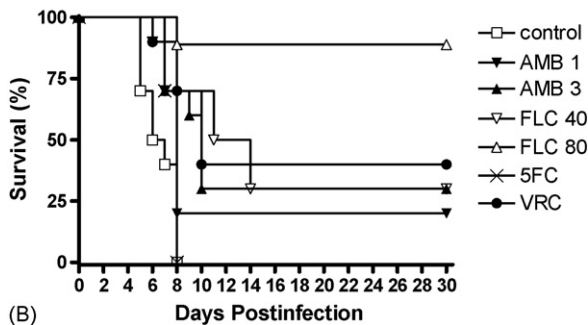


(B)

Fig. 1. Survival curves of immunosuppressed mice infected with 2×10^5 , 2×10^6 or 2×10^7 colony-forming units/mouse of (A) *Blastoschizomyces capitatus* IHEM 16105 and (B) *B. capitatus* IHEM 5666.



(A)



(B)

Fig. 2. Survival curves of immunosuppressed mice infected intravenously with (A) *Blastoschizomyces capitatus* IHEM 16105 and (B) *B. capitatus* IHEM 5666 and treated for six consecutive days with amphotericin B at 1 mg/kg/day (AMB 1) or 3 mg/kg/day (AMB 3), fluconazole at 40 mg/kg/day (FLC 40) or 80 mg/kg/day (FLC 80), flucytosine at 60 mg/kg/day (5-FC) or voriconazole at 40 mg/kg/day (VRC).

Table 2

Survival of mice infected with *Blastoschizomyces capitatus* strains IHEM 16105 and IHEM 5666 and treated with various antifungal agents

Antifungal therapy (dose in mg/kg/day)	MST (95% CI) (days)	
	IHEM 16105	IHEM 5666
None	6.77 (6.22–7.32)	6.67 (6.05–7.28)
AMB (1)	9.10 (8.07–10.13) ^a	12.00 (8.41–17.59) ^a
AMB (3)	9.00 (8.42–9.58) ^a	15.00 (8.87–21.13) ^{a,c}
5-FC (60)	17.90 (11.69–20.11) ^{a,b}	7.70 (7.40–8.00)
VRC (40)	9.32 (8.34–10.29) ^a	17.20 (10.68–23.72) ^{a,c}
FLC (40)	19.80 (13.33–26.27) ^{a,b}	16.00 (10.09–21.91) ^{a,c}
FLC (80)	26.18 (21.39–30.97) ^{a,b}	27.56 (23.04–32.07) ^{a,d}

MST, mean survival time; 95% CI, 95% confidence interval; AMB, amphotericin B; FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; 5-FC, flucytosine.

^a $P < 0.05$ vs. control.

^b $P < 0.05$ vs. AMB 1, AMB 3 and VRC.

^c $P < 0.05$ vs. 5-FC.

^d $P < 0.05$ vs. all therapies.

FC significantly prolonged the MST compared with AMB at 1 mg/kg/day or 3 mg/kg/day and VRC. For strain IHEM 5666, all the therapies significantly prolonged the MST compared with the control group, with the exception of 5-FC. No significant differences in MST were observed between AMB at 1 mg/kg/day and 3 mg/kg/day for this strain. FLC at 40 mg/kg/day, AMB at 3 mg/kg/day and VRC significantly prolonged the MST compared with 5-FC. In contrast, FLC at 80 mg/kg/day significantly prolonged the MST compared with all the other therapies tested, including FLC at a lower dose.

The liver, spleen and kidneys of untreated mice infected with each strain showed a high fungal load, the kidney being the most affected organ (Table 3). For strain IHEM 16105, all the therapies significantly reduced the tissue burden compared with the control group in the three organs tested, with the exception of AMB at 1 mg/kg/day, which only significantly reduced the tissue burden in the liver and spleen. However, the two doses of FLC were significantly more effective than the other drugs.

For strain IHEM 5666, 5-FC was ineffective at reducing tissue burden, which agrees with the null effect on prolonging survival. AMB at 3 mg/kg/day and FLC at 80 mg/kg/day were the only regimens that reduced the tissue burden compared with the control group in all three organs tested. AMB at 1 mg/kg/day and VRC and FLC at 40 mg/kg/day reduced the tissue burden compared with control group in only two of the three organs studied. FLC at 80 mg/kg/day significantly improved the results obtained with the other therapies in the three organs studied.

4. Discussion

Improving the state of neutropenia in patients with disseminated blastoschizomycosis leads to better prognosis, although it is not always sufficient to cure the infection, which also requires antifungal treatment [13]. We established

Table 3

Effects of antifungal treatment on colony counts of *Blastoschizomyces capitatus* in the liver, spleen and kidneys of mice

Strain/treatment (dose in mg/kg/day)	Mean log ₁₀ CFU/g of tissue (range)		
	Liver	Spleen	Kidney
IHEM 16105			
None	7.51 (6.61–8.03)	7.73 (6.34–9.00)	7.87 (7.33–8.25)
AMB (1)	5.23 (4.09–6.52) ^a	6.00 (4.60–7.60) ^a	7.47 (7.29–7.72)
AMB (3)	3.94 (2.60–5.15) ^a	2.78 (2.00–4.18) ^a	4.17 (2.60–5.04) ^a
5-FC (60)	4.27 (3.69–5.02) ^a	5.50 (5.00–5.94) ^a	7.27 (6.68–7.66) ^a
VRC (40)	4.27 (3.38–4.91) ^a	5.21 (4.00–5.94) ^a	6.94 (6.56–7.31) ^a
FLC (40)	2.96 (2.83–3.14) ^b	3.40 (2.96–3.58) ^b	4.27 (3.72–4.83) ^b
FLC (80)	1.77 (0.86–2.22) ^c	2.22 (1.62–2.60) ^c	3.20 (1.84–3.97) ^b
IHEM 5666			
None	6.20 (5.47–7.45)	7.24 (6.82–7.72)	7.29 (6.67–8.29)
AMB (1)	4.21 (3.85–4.64) ^a	4.82 (4.38–5.19) ^a	7.31 (6.40–8.30)
AMB (3)	3.72 (2.14–3.78) ^a	3.38 (2.26–4.13) ^a	4.16 (2.62–5.01) ^a
5-FC (60)	5.61 (5.02–6.57)	6.64 (5.64–7.64)	7.03 (6.07–7.57)
VRC (40)	5.75 (3.77–7.43)	4.87 (4.28–6.54) ^a	6.76 (6.55–7.06) ^a
FLC (40)	4.22 (3.67–5.29) ^a	3.71 (2.80–4.48) ^a	5.94 (4.19–7.63)
FLC (80)	2.68 (1.58–4.32) ^c	2.32 (0.00–3.80) ^c	4.52 (2.73–5.80) ^c

CFU, colony-forming units; AMB, amphotericin B; FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; 5-FC, flucytosine.

^a $P < 0.05$ vs. control.

^b $P < 0.05$ vs. control and all therapies, except FLC 80.

^c $P < 0.05$ vs. control and all therapies.

a murine model of disseminated blastoschizomycosis to evaluate the effectiveness of the most commonly used antifungal therapies against this infection. Undesirable pharmacokinetics of VRC limits the use of murine models for evaluating the efficacy of this antifungal drug, since the concentrations of this drug in the serum of mice are very low [14]. However, grapefruit juice inhibits the cytochrome P450 enzymes that are involved in the metabolism of VRC. Therefore, administration of grapefruit juice in place of water allows sufficient plasma concentrations of the drug to be achieved after oral administration in mice [12,15–17]. Recent studies revealed that VRC doses of 40 mg/kg/day given orally result in plasma concentrations that can be clinically useful when administered for no more than 10 days [18]. Similar results occur with 5-FC, since pharmacokinetic studies in mice have revealed that this drug is cleared very quickly. However, it has been proven that frequent administration of low doses can be as effective as a higher dose administered at longer intervals [19]. In our case, we added this drug to the water source at low doses, which has shown to be of benefit [11,12].

Two strains with different in vitro antifungal responses (equal or higher than two dilutions) to two of the drugs tested (i.e. VRC and 5-FC) were studied to obtain more conclusive results. A correlation was found between the in vitro susceptibility of both strains and the in vivo data. For strain IHEM 16105, which had a low 5-FC MIC (0.25 µg/mL), 5-FC significantly prolonged the MST compared with the control group. On the other hand, for the strain IHEM 5666, which showed a very high 5-FC MIC (64 µg/mL), 5-FC did not improve the MST compared with the control group. Similarly, VRC significantly prolonged the MST for strain IHEM 5666 (MIC 0.25 µg/mL) versus strain IHEM 16105 (MIC 1 µg/mL). In the case of AMB, for both strains the two doses

significantly prolonged the MST and reduced the fungal loads in most of the organs studied. Clinical data show moderate survival rates (up to 38%) in blastoschizomycosis patients treated with AMB [3,6].

For azoles, 24 h area under the concentration–time curve (AUC_{0–24})/MIC ratios >25 are associated with good outcome [19]. On the basis of the AUC of FLC in mice reported by other authors [19], we calculated that the values of the AUC/MIC ratio in our study were >25 with the high dose tested for the two strains, which correlates with the positive results. For the dose of 40 mg/kg/day, it can be estimated that the AUC/MIC ratios were in the range 12–24, which is considered to be predictive of a 50% maximal effect [19]. With this dose, effectiveness was lower. In the case of VRC, the AUC/MIC ratio was >25 only for mice infected with the strain IHEM 5666, which correlates with a higher effectiveness of this drug in this strain [14,18]. In a recent retrospective multicentre study of invasive infections by *B. capitatus* performed in Italy, results were best after therapy with FLC [2]. This drug cured 9 (90%) of the 10 patients with haematological diseases recorded in that study. In our study, FLC was also the most effective drug, both in survival and tissue burden studies, especially at doses of 80 mg/kg/day.

This study demonstrates the potential use of this murine model for evaluating therapies against systemic blastoschizomycosis and the higher efficacy of FLC.

Acknowledgment

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] Martino P, Venditti M, Micozzi A, et al. *Blastoschizomyces capitatus*: an emerging cause of invasive fungal disease in leukemia patients. *Rev Infect Dis* 1990;12:570–82.
- [2] Girmenia C, Pagano L, Martino B, et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol* 2005;43:1818–28.
- [3] Martino R, Salavert M, Parody R, et al. *Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases. *Clin Infect Dis* 2004;38:335–41.
- [4] Bouza E, Muñoz P. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:76–85.
- [5] Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:8–24.
- [6] Girmenia C, Pizarelli G, D'Antonio D, et al. In vitro susceptibility testing of *Geotrichum capitatum*: comparison of the E-test, disk diffusion, and Sensititre colorimetric methods with the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3985–8.
- [7] D'Antonio D, Mazzoni A, Icone A, et al. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Blastoschizomyces capitatus* causing nosocomial infections in cancer patients. *J Clin Microbiol* 1996;34:753–5.
- [8] Espinel-Ingroff A. In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1998;26:198–202.
- [9] 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.
- [10] Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, et al. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2467–73.
- [11] Graybill JR, Najvar LK, Holmberg JD, et al. Fluconazole, D0870, and flucytosine treatment of disseminated *Candida tropicalis* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:924–9.
- [12] Graybill JR. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resist Updat* 2000;3:364–83.
- [13] Steinbach WJ, Perfect JR. Newer antifungal therapy for emerging fungal pathogens. *Int J Infect Dis* 2003;7:5–20.
- [14] Roffey SJ, Cole S, Comby P, et al. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos* 2003;31:731–41.
- [15] Sugar AM, Liu XP. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:601–4.
- [16] Capilla J, Serena C, Pastor FJ, et al. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3976–8.
- [17] Graybill JR, Najvar LK, Gonzalez GM, et al. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1373–6.
- [18] Clemons KV, Espiritu M, Parmar R, et al. Comparative efficacies of conventional amphotericin B, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4867–75.
- [19] Andes D, Ogtrop M. Characterization and quantitation of the pharmacodynamics of fluconazole in a neutropenic murine disseminated candidiasis infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2116–20.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

4.7. Eficacia del voriconazol en una infección del sistema nervioso central por *Cryptococcus* en el ratón.

Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection.

Serena C, Pastor FJ, Marine M, Rodríguez MM, and Guarro J.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007. doi:10.1093/jac/dkm123.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection

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

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

Received 5 December 2006; returned 16 February 2007; revised 15 March 2007; accepted 5 April 2007

Objectives: We studied the efficacy of voriconazole compared with amphotericin B in a murine model of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*. Infection was established intracerebrally.

Methods: Mice were treated with voriconazole at 10, 40 or 60 mg/kg/day orally or with amphotericin B at 1.5 mg/kg/day intraperitoneally. Treatment began 1 day after infection and continued for 10 days post-infection. Tissue burden studies were performed on day 7 and 1 day after the treatment finished.

Results: Both drugs were able to significantly prolong survival with respect to the control group. The highest tissue burden reduction was achieved with voriconazole at 60 mg/kg/day.

Conclusions: We have developed a murine model of cryptococcal central nervous system infection and demonstrated that voriconazole has a potential for the treatment of cryptococcosis.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, intracranial murine model, amphotericin B, voriconazole

Introduction

In spite of aggressive antifungal therapy, cryptococcosis is still an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients, especially those with AIDS.^{1–3} The treatment of choice for severe cryptococcosis, including CNS disease, is amphotericin B alone or combined with flucytosine, and for less severe disease fluconazole could be an alternative.⁴ The toxicity of amphotericin B and flucytosine and the increasing isolation of fluconazole-resistant strains^{5,6} underline the need for improved treatments and the use of new strategies. Voriconazole has demonstrated excellent *in vitro* activity against *Cryptococcus neoformans*,⁷ achieves good levels in CSF⁸ and there is some evidence of clinical efficacy.^{9–11} The aim of the current study was to evaluate the activity of voriconazole in a murine model of cryptococcal CNS infection.

Materials and methods

Three clinical isolates were used in this study, two belonging to *C. neoformans* var. *neoformans* [strains FMR 8398 (strain A) and FMR 8411 (strain B), both with serotype AD, from the CSF of an HIV-negative patient and an HIV-positive patient, respectively] and one belonging to *C. neoformans* var. *grubii* [FMR 8409 (strain C),

serotype A, isolated from the CSF of an HIV-negative patient]. They were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) plates and incubated at 35°C for 48 h. *In vitro* susceptibilities of the three strains to the antifungals were tested using a microdilution reference method.¹² For azoles and flucytosine, the MICs were defined as the lowest concentrations at which there was 50% inhibition of growth when compared with a drug-free control. For amphotericin B, the MIC was defined as the lowest concentration resulting in 100% inhibition of growth.

Male OF-1 mice weighing 18–20 g were briefly anaesthetized with fluothane and challenged intracerebrally with ~700 cfu of strains A or B, or 2500 cfu of strain C. Preliminary experiments with the three strains (data not shown) demonstrated that these concentrations of fungal elements were the optimal dose for producing an acute infection, with 100% of the animals dying within 15 days of infection. The inoculum was delivered in a volume of 0.05 mL through a 27-gauge needle by direct puncture through the cranial vault, ~6 mm posterior to the orbit. The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of the Rovira i Virgili University.

For survival studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain and treatment before starting the study. Treatment began 1 day after infection and continued for 10 days post-infection. Amphotericin B purchased as Fungizone was given at 1.5 mg/kg/day intraperitoneally in a volume of 0.2 mL; voriconazole purchased as Vfend was given at 10, 40 or 60 mg/kg/day orally by gavage in a volume of 0.1 mL. Control animals received no

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

treatment. From 3 days prior to infection, the mice that received voriconazole and the control group were given grapefruit juice (Hero, Spain) instead of water. Mice were checked daily for 30 days after challenge.

For tissue burden studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain and treatment and one group as control. Five animals from each group, randomly chosen before starting the study, were sacrificed on day 7 post-infection and the remaining five 1 day after the treatment finished (day 11 post-infection). Brain and lungs were aseptically removed and 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 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 analysed by the Mann–Whitney *U*-test using SPSS for Windows, version 11.5.

Results and discussion

MICs of amphotericin B and voriconazole were similar for the three strains, the differences among them never being higher than one dilution. Voriconazole showed very low MIC values for the strains A, B and C (0.03, 0.03 and 0.06 mg/L, respectively). MICs of amphotericin B for the strains A, B and C were 0.5, 0.5–1 and 1 mg/L, respectively.

All treatments significantly prolonged survival of mice infected with the three strains of *C. neoformans* tested with respect to the control group ($P < 0.05$) (Figure 1). The survival prolongation was markedly evident in animals that received voriconazole at 60 mg/kg/day, being 100% at day 30 for mice infected with the strains A and B and 80% for those infected with strain C. Voriconazole administered at lower doses (10 and 40 mg/kg/day) had a moderate but significant effect in prolonging survival when compared with the control group. These results agree with those obtained by other authors who obtained a partial response with voriconazole at doses lower than 40 mg/kg/day in an experimental fusariosis in mice.¹³

Amphotericin B significantly prolonged the survival of infected mice in all groups with respect to the control group. Our results suggest that the efficacy of amphotericin B could be dependent on the serotype of *C. neoformans* or that it is at least strain-dependent. However, due to the small number of strains tested here, further studies with more strains are warranted to confirm this. No significant differences in survival were observed between mice treated with amphotericin B and voriconazole at 40 and 60 mg/kg.

All therapies reduced the fungal load versus controls in at least one organ at day 7 after infection for the three strains (Table 1). Amphotericin B significantly reduced the tissue burden with respect to the control group in brain and lungs ($P = 0.007$) of the animals infected with strains A and B but not in lungs of those inoculated with strain C ($P = 0.055$). Voriconazole at 60 mg/kg/day significantly reduced the fungal load with respect to the control group in brain and lungs for the three strains tested ($P = 0.008$). Voriconazole at lower doses (10 and 40 mg/kg/day) also significantly reduced the fungal loads with respect to the control group in brain and lungs for the three strains tested, except for lungs of mice infected with strain C. Voriconazole at 60 mg/kg significantly reduced fungal burden

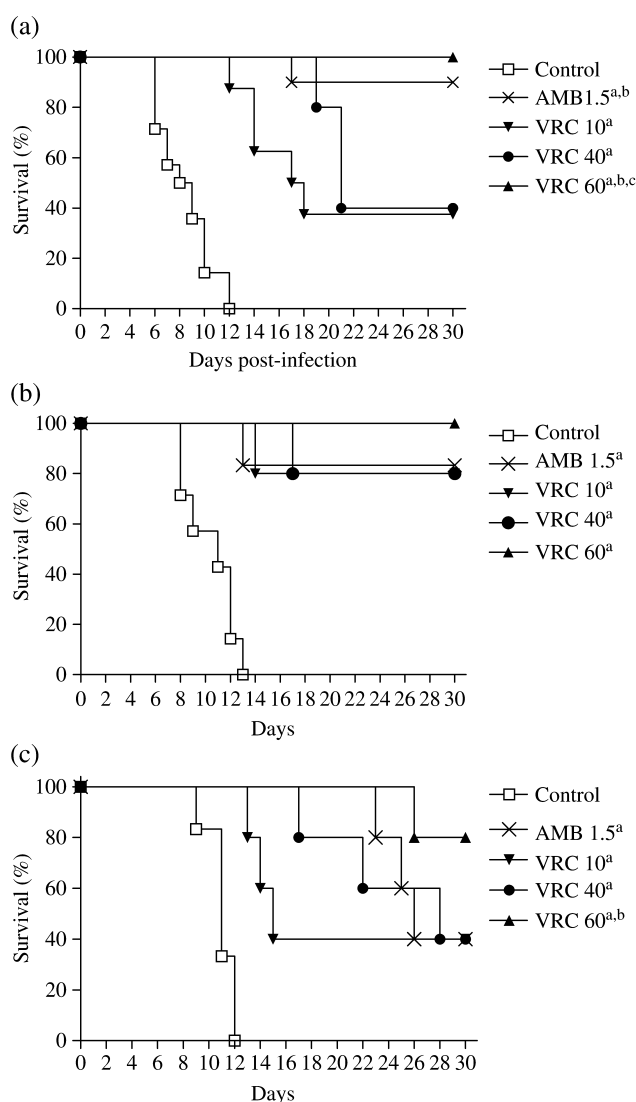


Figure 1. Cumulative mortality of mice treated with voriconazole (VRC) at 10, 40 or 60 mg/kg/day and amphotericin B (AMB) at 1.5 mg/kg/day for strains (a) A (FMR 8398), (b) B (FMR 8411) and (c) C (FMR 8409). ^a*P* value of <0.001 versus control. ^b*P* value of <0.05 versus 10 mg/kg/day VRC. ^c*P* value of <0.05 versus 40 mg/kg/day VRC.

in brain and lungs with respect to amphotericin B in mice infected with strain A.

On the seventh day, amphotericin B and voriconazole at high doses reduced the fungal load similarly, with the exception of those mentioned above. However, this tendency changed on day 12 post-infection, at which voriconazole at 60 mg/kg/day was the most effective treatment, significantly reducing fungal load with respect to amphotericin B in both brain and lungs of mice infected with strains A and B and in lungs of those infected with strain C. Moreover, only voriconazole at 60 mg/kg/day cleared fungal burden of both organs in practically all the animals infected with strain A.

Our results agree in part with Mavrogiorgos *et al.*¹⁴ who demonstrated, although only testing one strain of *C. neoformans* var. *grubii*, using a murine model of pulmonary cryptococcal infection, that voriconazole was able to reduce serum fungal

Table 1. Effects of the antifungal treatment on colony counts of the strains *C. neoformans* FMR 8398, FMR 8411 and FMR 8409 in brain and lungs of mice on days 7 and 12 post-infection

Treatments	Mean log cfu/g of tissue (95% CI)					
	strain A (FMR 8398)		strain B (FMR 8411)		strain C (FMR 8409)	
	brain	lung	brain	lung	brain	lung
Day 7						
control	4.0 (3.9–4.1)	3.9 (3.6–4.1)	4.7 (4.5–4.9)	4.8 (4.5–5.0)	4.8 (4.6–5.0)	4.7 (4.5–4.9)
AMB	3.1 (2.7–3.6) ^a	2.1 (0.9–3.3) ^{a,b}	2.9 (1.8–4.1) ^a	2.7 (2.0–3.3) ^a	4.0 (3.1–5.0) ^a	3.6 (2.1–5.0)
VRC 10	3.6 (3.5–3.7) ^a	3.4 (3.2–3.7) ^a	3.6 (3.0–4.1) ^a	3.1 (2.2–3.9) ^a	4.0 (3.3–4.7) ^a	4.1 (3.3–4.8)
VRC 40	3.6 (3.4–3.9) ^a	2.5 (1.7–3.2) ^{a,b}	2.7 (2.2–3.3) ^{a,b}	3.0 (2.6–3.5) ^a	3.7 (3.4–4.1) ^a	3.8 (3.4–4.3) ^a
VRC 60	1.9 (1.2–2.6) ^{a,b,c,d}	0.5 (–0.4 to 1.5) ^{a,b,c,d}	2.4 (2.2–2.7) ^{a,b}	2.3 (1.2–3.4) ^a	3.7 (3.5–3.8) ^a	3.3 (2.4–4.2) ^a
Day 12						
AMB	2.3 (1.4–3.2)	1.4 (0.8–2.0) ^b	3.0 (2.9–3.2)	3.1 (2.4–3.8)	3.6 (2.3–4.9)	3.8 (3.2–4.5)
VRC 10	3.1 (2.2–3.9)	2.8 (2.3–3.4)	2.6 (2.1–3.1) ^d	2.6 (1.9–3.2)	3.4 (3.0–3.8)	3.2 (3.0–3.5)
VRC 40	1.7 (1.4–2.3) ^b	1.7 (1.2–2.1) ^b	2.2 (1.9–2.4) ^d	2.8 (2.6–3.1)	2.9 (2.5–3.4)	2.9 (2.8–3.0) ^{b,d}
VRC 60	0.2 (0.3–0.7) ^{b,c,d}	0.0 (0.0–0.0) ^{b,c,d}	1.1 (0.4–1.7) ^{b,c,d}	1.9 (1.0–2.7) ^{c,d}	2.4 (1.5–3.2)	2.8 (2.4–3.2) ^{b,d}

CI, confidence interval; AMB, amphotericin B; VRC, voriconazole.

^aP value of <0.05 versus control.

^bP value of <0.05 versus VRC 10.

^cP value of <0.05 versus VRC 40.

^dP value of <0.05 versus AMB.

polysaccharide levels and prolong survival. However, in that study, fungal burden in lungs was not reduced. In spite of the differences between the experimental models used in both studies, it is clear that voriconazole is active against *C. neoformans* and that this drug has potential efficacy for the treatment of CNS cryptococcosis.

It is well known that voriconazole is quickly metabolized in mice. Therefore, in the present study and in order to avoid its rapid clearance, the animals that received voriconazole and the control group were given grapefruit juice instead of water. Grapefruit juice blocks the voriconazole metabolism and increases its serum concentration in mice to suitable levels for performing treatment studies.¹⁵ Autoinduction of voriconazole metabolism is not observed in humans, plasma steady-state concentrations remaining constant with time at standard dosing¹⁶ and showing significant transport across the blood–brain barrier.¹⁷ Although data are still scarce, voriconazole efficacy has also been demonstrated in humans. Lutsar *et al.*¹¹ demonstrated that a linear relationship existed between doses of voriconazole and CSF concentration in two patients with cryptococcal meningitis. They showed a partial and a stable response, respectively, to voriconazole treatment. In another clinical study, involving 18 patients with cryptococcal meningitis who were treated with voriconazole, a satisfactory and a stable response was obtained in 7 and 10 of them, respectively.¹⁰

Acknowledgements

We thank Marcia dos Santos Lazéra from the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, for providing the strains used in this study. 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

- de Hoog GS, Guarro J, Gené J *et al.* *Atlas of Clinical Fungi*. Second Edition. Utrecht, The Netherlands, and University Rovira i Virgili, Reus, Spain: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.
- Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7**: 8–24.
- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; **8**: 515–48.
- Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA *et al.* Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis* 2000; **30**: 710–8.
- Currie BP, Ghannoum M, Bessen L *et al.* Decreased fluconazole susceptibility of a relapse *Cryptococcus neoformans* isolate after fluconazole treatment. *Infect Dis Clin Pract* 1995; **4**: 318–9.
- Sar B, Monchy D, Vann M *et al.* Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 563–5.
- Sabatelli F, Patel R, Mann PA *et al.* *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2009–15.
- tan Dui N, Cleare W, Zaragoza O *et al.* Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2014–20.

9. Sabbatani S, Manfredi R, Pavón M *et al.* Voriconazole proves effective in long-term treatment of a cerebral cryptococcoma in a chronic nephropathic HIV-negative patient, after fluconazole failure. *Mycopathologia* 2004; **158**: 165–71.
10. Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ *et al.* Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 1122–31.
11. Lutsar I, Roffey S, Troke P. Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of guinea pigs and immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 728–32.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Second Edition: Approved Standard M27-A2*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
13. Graybill JR, Najvar LK, Gonzalez GM *et al.* Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1373–6.
14. Mavrogiorgios N, Zaragoza O, Casadevall A *et al.* Efficacy of voriconazole in experimental *Cryptococcus neoformans* infection. *Mycopathologia* 2006; **162**: 111–4.
15. Sugar AM, Liu X. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 601–4.
16. Roffey SJ, Cole S, Comby P *et al.* The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 731–41.
17. Levêque D, Nivoix Y, Jehl F *et al.* Clinical pharmacokinetics of voriconazole. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27**: 274–84.

4.8. Terapia combinada en un modelo de blastosquizomicosis en el ratón.

Combined therapies in a murine model of blastoschizomycosis.

Serena C, Rodríguez MM, Marine M, Pastor FJ, and Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007, Proofs.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

Combined Therapies in a Murine Model of Blastoschizomycosis[∇]

Carolina Serena, M. del Mar Rodríguez, Marçal Mariné, F. Javier Pastor, and Josep Guarro*

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

Received 6 February 2007/Returned for modification 23 March 2007/Accepted 6 April 2007

In a murine model of blastoschizomycosis, amphotericin B combined with micafungin, flucytosine or voriconazole did not improve the efficacy of fluconazole. However, such combinations can constitute therapeutic options for those cases where fluconazole fails.

Fn1 The yeast *Blastoschizomyces capitatus* (formerly known as *Geotrichum capitatum* and *Trichosporon capitatum*) causes severe systemic infections in immunocompromised patients, mainly in those with hematological malignancies (6, 12, 13) but also in immunocompetent patients (14, 21). Up to now, the use of a single drug to treat systemic blastoschizomycosis has not been completely satisfactory (1, 2, 3, 12, 16). Despite the administration of amphotericin B (AMB) or fluconazole (FLC), this infection is almost always fatal (2, 3). However, combined therapy has not yet been investigated. Previously we observed a low efficacy of all antifungals tested, with the exception of FLC (18). Here, we have evaluated the activity of AMB combined with micafungin (MFG), flucytosine (5FC), or voriconazole (VRC).

Two clinical strains of *B. capitatus*, IHEM 5666 from a blood culture of a patient with leukemia and IHEM 16105 from sputum of a patient with cystic fibrosis of the pancreas, were used. The isolates were stored at -80°C , and prior to testing they were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) at 35°C . The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on hemocytometer counts and by serial plating on SDA to confirm viability.

The in vitro antifungal susceptibilities of the strains were tested by a reference microdilution method (15). The interactions of the drugs were assessed by a checkerboard method (5, 11). For all the drugs and their combinations we used a MIC-0 end point criterion.

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

dures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee. Animals were immunodepressed by intraperitoneal administration of a single dose of 200 mg of cyclophosphamide per kg plus intravenous administration of 150 mg of 5-fluorouracil per kg on the day of infection (9). Mice were challenged with 2×10^6 CFU in 0.2 ml into the lateral tail vein. Groups of 15 mice were established for each strain and each treatment. Ten mice were used for survival and five for tissue burden studies, with the latter being identified before the study started. The different groups were treated with the following: FLC (Pfizer Inc., Madrid, Spain) at doses of 40 mg/kg given orally twice a day (80 mg/kg/day); AMB (Fungizona) at 1 mg/kg/day given intraperitoneally; VRC (Vfend) at 40 mg/kg/day given orally; 5-FC (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at 60 mg/kg/day dissolved in the sole source of drinking water (8, 10); MFG (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) at 5 mg/kg given subcutaneously twice a day (10 mg/kg/day); and the combinations AMB plus MFG, AMB plus VRC, and AMB plus 5-FC at the same doses described above. All treatments began 24 h after challenge, and the therapy lasted for 6 days. From 3 days prior to infection, the mice receiving VRC were given grapefruit juice in place of water (8, 19, 20). Mouse survival was evaluated daily for 30 days after challenge. One day after the treatment was finished, the liver, spleen, and kidneys were aseptically removed and were homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on SDA and incubated 48 h at 35°C . The numbers of CFU per gram of tissue were calculated.

TABLE 1. In vitro antifungal activities and interactions among antifungal drugs against two strains of *B. capitatus*

Strain ^a	MIC, $\mu\text{g/ml}$ (FICI ^b)							
	FLC	AMB	MFG	AMB-MFG	VRC	AMB-VRC	5-FC	AMB-5-FC
IHEM 16105	8	1	64	0.5/0.06 (0.501)	1	0.06/0.5 (0.560)	0.25	0.25–0.12 (0.750)
IHEM 5666	16	1	64	0.5/0.06 (0.501)	0.25	0.06/0.06 (0.300)	64	0.25/0.06 (0.251)

^a IHEM, Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute, Brussels, Belgium.

^b FICI, fractional inhibitory concentration index (≤ 0.5 , synergistic; > 0.5 and ≤ 4 , indifferent; > 4 , antagonistic) (11).

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone: 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

[∇] Published ahead of print on ●●●●●●●●.

TABLE 2. Survival of mice infected with *B. capitatus* strains IHEM 16105 and IHEM 5666 and treated with antifungal agents

Antifungal therapy (mg/kg/day)	MST, days (95% confidence interval) after infection with:	
	IHEM 16105	IHEM 5666
None	6.31 (6.05–6.57)	7.00 (6.38–7.62)
FLC (80)	25.70 (20.35–31.05) ^{a,c}	30.00 (30.00–30.00) ^{a,c}
AMB (1)	12.30 (6.80–17.80) ^a	12.20 (6.67–17.73) ^a
VRC (40)	15.78 (9.12–22.43) ^a	17.10 (10.51–23.69) ^a
5-FC (60)	17.70 (11.33–24.07) ^a	7.60 (7.08–8.12)
MFG (10)	7.59 (7.14–8.04)	6.60 (6.08–7.12)
AMB (1) + VRC (40)	11.30 (5.47–17.13)	27.60 (23.14–32.06) ^{a,b,c}
AMB (1) + 5-FC (60)	16.90 (10.26–23.54) ^a	27.70 (23.42–31.98) ^{a,b,c}
AMB (1) + MFG (10)	20.00 (13.76–26.24) ^{a,b}	20.80 (13.82–27.78) ^a

^a $P < 0.05$ versus control.^b $P < 0.05$ versus the respective monotherapy.^c $P < 0.05$ versus AMB, VRC, MFG, and 5-FC.

Mean survival time (MST) was 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.

T1-3 The in vitro results are shown in Table 1. Tables 2 and 3 show the effects of the different treatments on mouse survival and tissue burden. In general, monotherapies showed results similar to those obtained in a previous study (18), with no significant differences, which proved the reproducibility of the model. Once again, FLC at 80 mg/kg/day showed the highest efficacy. The combined treatments were unable to improve the efficacy of FLC in survival prolongation and tissue burden reduction. For strain IHEM 16105, all the treatments prolonged survival with respect to that of the control group, with the exceptions of MFG alone and AMB combined with VRC ($P = 0.4957$ and $P = 0.3897$, respectively). Only the combination of AMB with MFG prolonged the MST versus the respective monotherapies.

For strain IHEM 5666, all the treatments prolonged the MST with respect to that of the control group, with the exceptions of MFG and 5-FC given alone ($P = 0.5215$ and $P = 0.1259$, respectively). The combinations of AMB plus VRC and AMB plus 5-FC prolonged the MST with respect to the monotherapies.

For strain IHEM 16105, all the treatments reduced significantly the fungal load versus that in controls, with the exception of MFG (Table 3). The three combinations tested were also able to reduce significantly the fungal burden with respect to the monotherapies in the three organs studied, with the exception of the combination of AMB with VRC in spleen.

For strain IHEM 5666, MFG and 5-FC showed no efficacy in tissue burden, reduction and AMB and VRC reduced the fungal load in only two of the three organs tested. FLC was able to reduce significantly the fungal load only with respect to the other single drugs. The three combinations studied were able to reduce significantly the tissue burden versus their respective monotherapies in the three organs tested, but not with respect to FLC.

This is the first time that combined therapy was tested in experimental *B. capitatus* infections. In general, the combinations tested showed good results, and although they could not improve the efficacy of FLC, they were always more effective with respect to the control group and in almost all cases were better than their respective monotherapies. It is well known that azole-resistant isolates are increasing among clinically relevant yeasts (4, 7, 17), and in the case of *B. capitatus* infections, several cases of FLC failure have been documented (2, 3, 16). The combinations tested here can offer alternative therapies in infections caused by azole-resistant isolates, as has been suggested by Christakis et al. (3). Further studies are needed to ascertain the real clinical relevance of these combinations.

TABLE 3. Effects of the antifungal treatment on colony counts of *B. capitatus* in livers, spleens, and kidneys of mice

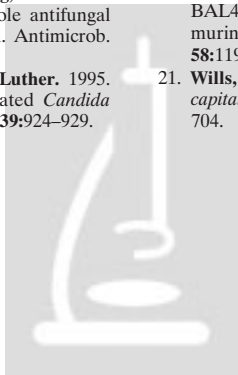
Strains	Treatment (mg/kg/day)	Mean log ₁₀ CFU/g of tissue (range)		
		Liver	Spleen	Kidney
IHEM 16105	None	7.56 (6.79–8.32)	7.74 (6.64–8.83)	7.93 (7.47–8.39)
	FLC (80)	1.37 (0.84–1.89) ^{a,c}	1.59 (1.22–1.97) ^{a,c}	3.72 (2.92–4.52) ^{a,c}
	AMB (1)	5.17 (3.28–7.06) ^a	6.02 (4.07–7.96) ^a	7.00 (6.80–7.20) ^a
	VRC (40)	4.33 (3.81–4.85) ^a	5.56 (4.97–6.15) ^a	6.98 (6.62–7.34) ^a
	5-FC (60)	4.28 (3.49–5.08) ^a	5.45 (4.93–5.98) ^a	7.29 (6.84–7.74) ^a
	MFG (10)	5.26 (2.79–7.73)	7.69 (4.76–10.62)	7.50 (6.73–8.27)
	AMB + VRC	3.63 (1.32–5.94) ^{a,b}	4.32 (3.20–5.44) ^a	5.39 (3.30–7.48) ^{a,b}
	AMB + 5-FC	2.78 (2.14–3.41) ^{a,b}	4.16 (3.33–4.98) ^{a,b}	4.94 (4.04–5.83) ^{a,b}
	AMB + MFG	3.65 (2.24–5.05) ^{a,b}	4.13 (2.81–5.45) ^{a,b}	6.13 (4.23–8.02) ^{a,b}
IHEM 5666	None	6.31 (5.36–7.27)	7.12 (6.72–7.69)	7.49 (6.65–8.33)
	FLC (80)	2.49 (1.15–3.83) ^{a,c}	2.05 (0.59–3.51) ^{a,c}	4.31 (3.14–5.49) ^{a,c}
	AMB (1)	4.47 (3.89–5.04) ^a	4.87 (4.39–5.35) ^a	7.39 (6.50–8.28)
	VRC (40)	5.63 (3.76–7.50)	4.75 (3.96–5.54) ^a	6.78 (6.43–7.13) ^a
	5-FC (60)	5.69 (4.76–6.63)	6.76 (5.62–7.89)	7.13 (6.52–7.74)
	MFG (10)	5.32 (2.61–8.04)	7.03 (4.31–9.74)	7.52 (6.66–8.38)
	AMB + VRC	3.03 (2.19–3.86) ^{a,b}	3.27 (3.05–3.48) ^{a,b}	5.40 (4.96–5.85) ^{a,b}
	AMB + 5-FC	3.90 (3.26–4.54) ^{a,b}	3.73 (3.22–4.24) ^{a,b}	5.26 (3.99–6.54) ^{a,b}
	AMB + MFG	2.17 (1.81–2.53) ^{a,b}	2.91 (2.41–3.41) ^{a,b}	3.87 (3.05–4.68) ^{a,b}

^a $P < 0.05$ versus control.^b $P < 0.05$ versus the respective monotherapy.^c $P < 0.05$ versus AMB, VRC, MFG, and 5-FC.

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. Bouza, E., and P. Muñoz. 2004. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. Clin. Microbiol. Infect. **10**:76–85.
2. Buchta, V., P. Žák, A. Kohout, and M. Otčenášek. 2001. Disseminated infection of *Blastoschizomyces capitatus* in a patient with acute myelocytic leukaemia. Mycoses **44**:505–512.
3. Christakis, G., S. Perlorentzou, M. Aslanidou, A. Megalakaki, and A. Velegraki. 2005. Fatal *Blastoschizomyces capitatus* sepsis in a neutropenic patient with acute myeloid leukemia: first documented case from Greece. Mycoses **48**:216–220.
4. Diekema, D. J., B. Petroelje, S. A. Messer, R. J. Hollis, and M. A. Pfaller. 2005. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. J. Clin. Microbiol. **43**:476–478.
5. Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering. 1991. Antimicrobial combinations, p. 432–492. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
6. Girmenia, C., L. Pagano, B. Martino, D. D'Antonio, R. Fanci, G. Specchia, L. Melillo, M. Buelli, G. Pizzarelli, M. Venditti, and P. Martino. 2005. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. J. Clin. Microbiol. **43**:1818–1828.
7. Giusiano, G., M. Mangiaterra, V. Garcia Saito, F. Rojas, V. Gomez, and M. C. Diaz. 2006. Fluconazole and itraconazole resistance of yeasts isolated from bloodstream and catheters of hospitalized pediatric patients. Chemotherapy **52**:254–259.
8. Graybill, J. R. 2000. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. Drug Resist. Update **3**:364–383.
9. Graybill, J. R., R. Bocanegra, L. K. Najvar, D. Loebenberg, and M. F. Luther. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. Antimicrob. Agents Chemother. **42**:2467–2473.
10. Graybill, J. R., L. K. Najvar, J. D. Holmberg, and M. F. Luther. 1995. Fluconazole, D0870, and flucytosine treatment of disseminated *Candida tropicalis* infections in mice. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:924–929.
11. Johnson, M. D., C. MacDougall, L. Ostrosky-Zeichner, J. R. Perfect, and J. H. Rex. 2004. Combination antifungal therapy. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:693–715.
12. Martino, R., M. Salavert, R. Parody, J. F. Tomas, R. Camara, L. Vazquez, I. Jarque, E. Pietro, J. L. Sastre, I. Gadea, J. Peman, and J. Sierra. 2004. *Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases. Clin. Infect. Dis. **38**:335–341.
13. Martino, P., M. Venditti, A. Micozzi, G. Morace, L. Polonelli, M. P. Mantovani, M. C. Petti, V. L. Burgio, C. Santini, P. Serra, and F. Mandelli. 1990. *Blastoschizomyces capitatus*: an emerging cause of invasive fungal disease in leukemia patients. Rev. Infect. Dis. **12**:570–582.
14. Mathews, M. S., and S. Sen. 1998. *Blastoschizomyces capitatus* infection after contamination of fluids for intravenous application. Mycoses **41**:427–428.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
16. Romano, A., S. Giordano, P. Di Carlo, L. Abbagnato, F. Sapuppo, G. Lazzaro, R. Tetamo, and L. Titone. 2005. Pulmonary infection caused by *Blastoschizomyces capitatus*. Infez. Med. **13**:187–191.
17. Sar, B., D. Monchy, M. Vann, C. Keo, J. L. Sarthou, and Y. Buisson. 2004. Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. J. Antimicrob. Chemother. **54**:563–565.
18. Serena, C., M. Mariné, R. Marimon, F. J. Pastor, and J. Guarro. 2007. Effect of antifungal treatment in a murine model of blastoschizomycosis. Int. J. Antimicrob. Agents **29**:79–83.
19. Sugar, A. M., and X. P. Liu. 2001. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:601–604.
20. Warn, P. A., A. Sharp, J. Mosquera, J. Spickermann, A. Schmitt-Hoffman, M. Heep, and D. W. Denning. 2006. Comparative in vivo activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. J. Antimicrob. Chemother. **58**:1198–1207.
21. Wills, T. S., A. Degryse, J. Lavina, and J. T. Sinnott. 2004. *Blastoschizomyces capitatus* pneumonia in an immunocompetent male. South. Med. J. **97**:702–704.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

4.9. Interacciones *in vitro* de la micafungina combinada con anfotericina B frente a cepas clínicas de *Candida* spp.

In vitro interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of *Candida* spp.

Serena C, Marine M, Pastor FJ, Quindós G, Carillo AJ, and Guarro J.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007, Enviado.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

In vitro synergistic interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of *Candida* spp.

Carolina Serena¹, Marçal Mariné¹, Guillermo Quindós², Alfonso J. Carrillo³, 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 Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España.

³Departamento de Microbiología, Asesoría Científica y de Investigación Aplicada, Barcelona, España.

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili. Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat

[Words Abstract= 57](#)

[Words text= 867](#)

ABSTRACT

In order to develop new approaches for the treatment of *Candida* infections, the in vitro activity of amphotericin B in combination with micafungin against 115 isolates of 7 species of *Candida* was evaluated. Overall, the percentages of synergistic interactions were 50% and 20% when the MIC-2 and MIC-0 endpoint criteria, respectively, were used. Antagonism was not observed.

Candida spp. are an important cause of nosocomial infections with high morbidity and mortality (14). The spectrum of invasive candidiasis is changing, and infections due to non-*C. albicans* species are rising (14). Amphotericin B (AMB) is the primary antifungal agent used to treat most invasive mycoses but its toxicity limits its use. Fluconazole (FLC) has also been recommended for the treatment of candidiasis, but its activity is variable against non-*C. albicans* species, especially *C. glabrata*, and nil against *C. krusei* (19, 20). Other drugs, such as voriconazole, have recently been questioned for the treatment of candidiasis (6). Echinocandins, a new class of antifungal agents with novel targets, constitute new therapeutic alternatives for candidiasis. Micafungin (MFG) has shown good in vitro and in vivo activity against non-*C. albicans* infections, including *C. glabrata* (5, 9, 10, 13), *C. krusei* (5), and azole-resistant *C. albicans* strains (8). However, MFG has shown high MICs (>8 µg/ml) against isolates of some species such as *C. parapsilosis* (1, 7). A combination of MFG with AMB could be of interest for improving clinical results and reducing antifungal doses. This combination has been synergistic in vitro against *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon asahii* and *Scedosporium* spp. (16, 17, 21) and showed efficacy for the treatment of murine disseminated infection by *Trichosporon asahii*, *C. glabrata* and *Aspergillus* spp. (3, 9, 13, 18). We considered it interesting to evaluate if this combination could also be beneficial for the treatment of infections by *Candida* spp., testing its activity against isolates representing seven of the commonest species.

We tested a total of 115 clinical isolates (20 of *C. albicans*, 20 of *C. dubliniensis*, 15 of *C. glabrata*, 20 of *C. krusei*, 10 of *C. lusitaniae*, 15 of *C. parapsilosis* and 15 of *C. tropicalis*). Drug interactions were assessed by a checkerboard microdilution method (4). The drugs were obtained as pure powders. AMB was diluted in dimethyl sulfoxide

and MFG in sterile distilled water. Antifungal agents were placed in rows or in columns in the trays, with concentrations ranging from 4 to 0.06 $\mu\text{g/ml}$ for AMB and from 16 to 0.03 $\mu\text{g/ml}$ for MFG. One of the limitations of the checkerboard method for some antifungal combinations is to decide which end point has to be used to evaluate interactions between the drugs (11). For AMB, the MIC is considered as the lowest drug concentration that shows 100% growth inhibition (MIC-0) (12). For the echinocandins, a MIC end point criterion of prominent reduction in growth (MIC-2 or $\geq 50\%$ inhibition) relative to control growth is used (15). When AMB is combined with MFG, it is difficult to decide which of the two mentioned end points is more predictive of possible clinical outcome. Therefore, in this study we compared the two endpoint criteria, both after 48 h of incubation. We used the fractional inhibitory concentration (FIC) index to quantify and classify drug interaction (4). Interaction was considered synergistic if the FIC index was ≤ 0.5 , indifferent if it was > 0.5 and ≤ 4 , and antagonistic if it was > 4 . Conservation of the strains and quality controls were detailed previously (16). Approximately 80% of the tests were repeated, and the results showed the same tendencies (data not shown). However, when the results did not coincide, the test was repeated and the mode of the three MIC values was considered.

Tables 1 and 2 show the in vitro results using MIC-0 or MIC-2 as endpoint for both drugs, respectively. In general, MIC-0 and MIC-2 of MFG were significantly different for all the species ($P < 0.05$) with the exception of *C. albicans* ($P = 0.09$), *C. glabrata* ($P = 0.12$) and *C. lusitaniae* ($P = 0.19$). The geometric mean MIC (MIC-2) of MFG was lower than 1.50 $\mu\text{g/ml}$ against all species tested with the exception of *C. parapsilosis*, which agrees with other authors that also obtained high MFG MICs for this species (1, 7). Differences between MIC-0 and MIC-2 were lower for AMB being significant only

for *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. dubliniensis* ($P < 0.0001$, $P = 0.0078$, and $P = 0.009$, respectively).

In general, higher percentages of synergistic interactions were obtained when MIC-2 endpoint was used. Using MIC-2, synergistic interactions were obtained for 50% (57/115) of the isolates, while using MIC-0 synergistic interactions were obtained for only 21% (24/115) of them. Although for numerous strains the interactions between both drugs were indifferent, notably the MICs of both antifungals were significantly lower for both endpoint criteria when they were combined than when they were alone. This combination could be potentially more useful in the case of those species with strains resistant to both antifungals such as *C. parapsilosis*. Although this species showed mainly very high MFG MICs, these were reduced significantly when the two drugs were combined ($P < 0.0001$) showing 40-60% of synergistic interactions. The efficacy of the combination of one echinocandin, caspofungin, with AMB has already been proved in a murine model of disseminated infection by *C. parapsilosis* (2).

In summary, we have demonstrated that the combination MFG plus AMB has some synergistic effect against *Candida* species although with important differences according to the two reading criteria used. Further studies with animal models are warranted to determine the efficacy of this combination and to determine which reading criteria is more predictive for clinical outcome.

Acknowledgements

We thank Cati Nuñez for her technical assistance. 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. **Andes, D., and N. Safdar.** 2005. Efficacy of micafungin for the treatment of candidemia. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **24**:662-664.
2. **Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, D. Giannini, and G. Scalise.** 2007. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.00880-06.
3. **Clemons, K. V., M. Espiritu, R. Parmar, and D. A. Stevens.** 2005. Comparative efficacies of conventional amphotericin B, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4867-4875.
4. **Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering.** 1991. Antimicrobial combinations, p.432-492. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
5. **Ernst, E. J., E. E. Roling, C. R. Petzold, D. J. Keele, and M. E. Klepser.** 2002. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3846–3853.
6. **Graybill, J. R.** 2005. Voriconazole for candidosis: an important addition? *Lancet* **366**:1413-1414.
7. **Laverdiere, M., D. Hoban, C. Restieri, and F. Habel.** 2002. In vitro activity of three new triazoles and one echinocandin against *Candida* bloodstream isolates from cancer patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:119-123.
8. **Maesaki, S., M. A. Hossain, Y. Miyazaki, K. Tomono, T. Tashiro, and S. Kohno.** 2000. Efficacy of FK 463, a (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitor, in disseminated

- azole-resistant *Candida albicans* infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1728-1730.
9. **Mariné, M., C. Serena, F. J. Pastor, and J. Guarro.** 2006. Combined antifungal therapy in a murine infection by *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:1295–1298.
10. **Mikamo, H., Y. Sato, and T. Tamaya.** 2000. In vitro antifungal activity of FK463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:485–487.
11. **Mukherjee, P. K., D. J. Sheehan, C. A. Hitchcock, M. A. Ghannoum.** 2005. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:163-194.
12. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
13. **Olson, J. A., J. P. Adler-Moore, P. J. Smith, and R. T. Proffitt.** 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.
14. **Patterson, T. F.** 2005. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* **366**: 1013-1025.
15. **Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema.** 2006. Global surveillance of in vitro activity of micafungin against *Candida*: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3533-3538.
16. **Serena, C., B. Fernandez-Torres, F. J. Pastor, L. Trilles, M. S. Lazera, N. Nolard, and J. Guarro.** 2005. In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs

against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:2994-2996.

17. **Serena, C., M. Marine, F. J. Pastor, N. Nolard, and J. Guarro.** 2005. In vitro interaction of micafungin with conventional and new antifungals against clinical isolates of *Trichosporon*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorula*. J. Antimicrob. Chemother. **55**:1020-1023.
18. **Serena, C., F. J. Pastor, F. Gilgado, E. Mayayo, and J. Guarro.** 2005. Efficacy of micafungin in combination in a murine model of disseminated trichosporonosis Antimicrob. Agents Chemother. **49**:497-502.
19. **Spellberg, B. J., S. G. Filler, and J. E. Edwards.** 2006. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. Clin. Infect. Dis. **42**:244-251.
20. **Swinne, D., M. Watelle, and N. Nolard.** 2005. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates. Rev. Iberoam. Micol. **22**: 24-28.
21. **Yustes, C., and J. Guarro.** 2005. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:3498-3500.

Table 1. In vitro activities of micafungin and amphotericin B, alone and in combination, against clinical isolates of *Candida* spp. using MIC-0 as endpoint

<i>Candida</i> species (number of isolates)	MIC-0 ($\mu\text{g/ml}$)	Drugs			% isolates showing the following interactions:		
		AMB	MFG	AMB/MFG	Synergism	Indifference	Antagonism
<i>C. krusei</i> (20)	GM Range	2.21 1-8	2.29 1-4	0.81/0.47 0.06-2/0.03-2	20	80	0
<i>C. albicans</i> (20)	GM Range	0.73 0.5-2	0.37 0.25-16	0.36/0.11 0.06-2/0.03-8	0	100	0
<i>C. parapsilosis</i> (15)	GM Range	2 2	14.49 8->16	0.67/1.15 0.25-1/0.03-8	40	60	0
<i>C. tropicalis</i> (15)	GM Range	1.66 1-4	1.44 0.5-32	0.49/0.12 0.06-1/0.03-1	47	53	0
<i>C. dubliniensis</i> (20)	GM Range	0.41 0.12-1	1.46 0.25->16	0.14/0.29 0.06-0.5/0.06-1	35	65	0
<i>C. glabrata</i> (15)	GM Range	0.75 0.25-1	0.27 0.12-0.5	0.31/0.11 0.06-1/0.03-0.5	0	100	0
<i>C. lusitaniae</i> (10)	GM Range	0.44 0.12-1	1.18 0.12-2	0.24/0.60 0.06-0.5/0.03-1	0	100	0

Table 2. In vitro activities of micafungin and amphotericin B, alone and in combination, against clinical isolates of *Candida* spp. using MIC-2 as endpoint

<i>Candida</i> species (number of isolates)	MIC-2 (µg/ml)	Drugs			% isolates showing the following interactions:		
		AMB	MFG	AMB/MFG	Synergism	Indifference	Antagonism
<i>C. krusei</i> (20)	GM Range	1.62 0.5-2	1.46 1-4	0.49/0.14 0.06-2/0.03-1	30	70	0
<i>C. albicans</i> (20)	GM Range	0.70 0.5-1	0.27 0.25-8	0.16/0.04 0.06-0.25/0.03-0.5	70	30	0
<i>C. parapsilosis</i> (15)	GM Range	0.74 0.5-2	9.28 8-16	0.22/0.16 0.12-0.25/0.03-4	60	40	0
<i>C. tropicalis</i> (15)	GM Range	0.87 0.25-4	0.47 0.25-1	0.17/0.06 0.06-0.25/0.03-0.5	53	47	0
<i>C. dubliniensis</i> (20)	GM Range	0.14 <0.06-0.5	0.32 0.06->16	0.08/0.07 0.06-0.25/0.03-0.5	50	50	0
<i>C. glabrata</i> (15)	GM Range	0.69 0.25-1	0.24 0.12-0.5	0.23/0.06 0.06-1/0.03-0.5	53	47	0
<i>C. lusitaniae</i> (10)	GM Range	0.35 0.06-1	0.86 0.12-2	0.19/0.31 0.06-0.25/0.03-1	20	80	0

7. DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

5.1. *Trichosporon asahii*

La tricosporonosis diseminada es una infección grave que afecta especialmente a pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos que sufren enfermedades hematológicas malignas (Itoh *et al.*, 1996; Tashiro *et al.*, 1995; Vasta *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1986). Un aspecto importante inherente a estas infecciones es que *Trichosporon* spp. es habitualmente confundido con *Candida* spp., lo cual puede inducir a fracaso terapéutico, ya que *Trichosporon* presenta generalmente una baja sensibilidad a la anfotericina B, que es uno de los antifúngicos utilizados como tratamiento empírico ante la sospecha de una infección sistémica por *Candida* spp. (Steinbach y Perfect, 2003). El tratamiento de la tricosporonosis sistémica con anfotericina B o fluconazol no disminuye la elevada mortalidad del proceso (Cawley *et al.*, 2000; Ebright *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2006).

Los estudios existentes acerca de la sensibilidad *in vitro* de *Trichosporon* spp. a los antifúngicos (Arikan *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 2001), incluían un escaso número de cepas y además la mayoría de ellos se referían a cepas identificadas como *Trichosporon beigelii*, lo cual no permitía establecer cuales de las especies actualmente incluidas en el género estaban realmente estudiadas. Por ello, decidimos realizar un estudio para evaluar la actividad *in vitro* de 8 antifúngicos, incluyendo cuatro antifúngicos de reciente introducción, frente a diez cepas de *Trichosporon asahii*. En el estudio se demostró la resistencia de algunas cepas a la anfotericina B y/o al fluconazol, así como la excelente actividad *in vitro* de los nuevos triazoles voriconazol, ravuconazol y albaconazol. Los resultados se publicaron en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48:2724-2726.

La buena actividad del voriconazol *in vitro* y la eficacia documentada del tratamiento en varios casos clínicos de infecciones producidas por *T. asahii* (Antachopoulos *et al.*, 2005; Fournier *et al.*, 2002), nos indujeron al estudio de la actividad de este fármaco en un modelo de tricosporonosis diseminada en el cobaya. Se eligió este animal como modelo dada la rápida metabolización del voriconazol en el ratón. Roffey *et al.*, (2003) demostraron que la inducción del citocromo P450 por el voriconazol (autoinducción del metabolismo) es más pronunciada en ratones y ratas, menos pronunciada en perros, y no se observa en cobayas, conejos y humanos. La ausencia significativa de autoinducción del metabolismo del voriconazol y la prolongación de su vida media en

plasma (5.5 horas) hace que el cobaya sea la especie más conveniente para estudiar la eficacia de este fármaco. La eficacia del voriconazol ya ha sido demostrada por diversos autores utilizando como modelo el cobaya (Capilla y Guarro, 2004; Chandrasekar *et al.*, 2000; Ghannoum *et al.*, 1999; Graybill, 2000; Kirkpatrick *et al.*, 2006; Sugar y Liu, 2000). En nuestro estudio se utilizaron dos cepas de *T. asahii* y se comparó la eficacia de distintas dosis de voriconazol con la de la anfotericina B para el tratamiento de los animales infectados. La ineficacia del tratamiento con la anfotericina B coincidió con los datos clínicos que demuestran una tasa de mortalidad del 78% en pacientes de tricosporonosis tratados con este antifúngico (Fournier *et al.*, 2002). El tratamiento con voriconazol dio lugar a unos resultados excelentes, con un 90 y un 100% de supervivencia de los animales infectados, respectivamente, con cada una de las dos cepas ensayadas, consiguiéndose además la esterilización de varios órganos. Los resultados se publicaron en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50:2240-2243.

El uso de terapias combinadas permite disminuir la dosis del antifúngico utilizado, acortar la duración de la terapia y ampliar el espectro de actividad del antifúngico (Roling *et al.*, 2002). El uso de la terapia combinada para el tratamiento experimental de la tricosporonosis no había sido extensamente investigada, existiendo algunos datos publicados sobre la eficacia de la combinación de la anfotericina B con el fluconazol en un modelo de ratones inmunosuprimidos e infectados con *T. beigeli* (Anaissie *et al.*, 1994; Kamberi *et al.*, 1998). Por ello se realizó el estudio de la actividad *in vitro* de las combinaciones de la micafungina con la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol y el ravuconazol frente a 10 cepas de *T. asahii*. La combinación de la micafungina con la anfotericina B resultó sinérgica frente a todas las cepas estudiadas de *T. asahii*. Este hecho pone de manifiesto la sensibilidad general, probablemente no cepa dependiente, de *T. asahii* a esta combinación, lo que sugiere su potencial como terapia para el tratamiento de tricosporonosis. Con las otras combinaciones antifúngicas que se estudiaron se observó entre un 20% y un 40% de interacciones sinérgicas. Los resultados obtenidos se publicaron en la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 55:1020-1023.

A raíz de la excelente actividad *in vitro* de la combinación de la micafungina con la anfotericina B, observada en nuestro anterior trabajo, decidimos estudiar la actividad de la combinación de esta equinocandina con la anfotericina B o con el fluconazol en un modelo de infección diseminada por *T. asahii* en el ratón inmunosuprimido. En el

estudio se comparó la actividad de las monoterapias con la de las combinaciones de los antifúngicos citados. La escasa eficacia del tratamiento con la anfotericina B o con el fluconazol en nuestro modelo experimental concuerda con los datos clínicos publicados (Fournier *et al.*, 2002). Aunque la micafungina es intrínsecamente inactiva sobre *Trichosporon* spp. (Denning, 2003), en nuestro estudio la combinación con anfotericina B mostró ser sinérgica dando lugar a una supervivencia del 80% de los animales y reduciendo la concentración del hongo en todos los tejidos estudiados. Así mismo la combinación de la micafungina con el fluconazol resultó también eficaz, aunque con resultados inferiores a los obtenidos con la combinación de micafungina y anfotericina B, obteniéndose una tasa de supervivencia del 60% y reduciendo la concentración del hongo únicamente en riñón. Con esta combinación no se obtuvo una acción sinérgica. Los resultados se publicaron en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49:497-502.

5.2. *Blastoschizomyces capitatus*

Blastoschizomyces capitatus es también una levadura emergente oportunista que afecta a pacientes inmunocomprometidos. La tasa estimada de mortalidad es del 50% en enfermos de leucemia aguda (Girmenia *et al.*, 2005), superando el 90% en pacientes con neutropenia profunda (Bouza y Muñoz, 2004). La terapia utilizada suele ser la administración de anfotericina B sola o combinada con la 5-fluorocitosina, y en algunos casos seguida con el fluconazol (Bouza y Muñoz, 2004; Girmenia *et al.*, 2005).

Debido a la toxicidad de la anfotericina B y de la 5-fluorocitosina y al incremento de cepas resistentes al fluconazol (D'Antonio *et al.*, 1996), nos propusimos estudiar la actividad de los antifúngicos tradicionales y del voriconazol en un modelo de infección diseminada por *B. capitatus* en el ratón inmunosuprimido. Para el estudio se eligieron dos cepas de *B. capitatus* con distinta sensibilidad *in vitro* al voriconazol y a la 5-fluorocitosina, con el fin de obtener resultados más concluyentes. Los estudios farmacocinéticos realizados con voriconazol en el ratón han demostrado que en este animal la autoinducción del metabolismo es responsable de una disminución en la exposición del fármaco y por lo tanto no es, en principio, un modelo adecuado para estudiar la eficacia de este fármaco (Andriole *et al.*, 1992; Roffey *et al.*, 2003; Stevens, 1996). Sugar y colaboradores (2000) demostraron que la administración de zumo de pomelo *ad libitum* en ratones tratados con voriconazol elevaba la concentración sérica

de dicho antifúngico a niveles presumiblemente terapéuticos. El mecanismo de acción por el cual el zumo de pomelo incrementa las concentraciones detectables de voriconazol en el suero del ratón es desconocido. No obstante, los componentes del zumo de pomelo actúan como inhibidores de la actividad enzimática del citocromo P450, un sistema multienzimático implicado en la metabolización del voriconazol (Sugar y Liu, 2000). Según Sugar y Liu, (2000), en el modelo experimental con ratones la administración del zumo de pomelo iniciada de tres a cinco días antes de empezar el tratamiento con voriconazol, da lugar a concentraciones detectables de voriconazol desde el primer día de tratamiento. La eficacia del voriconazol ya ha sido demostrada por varios autores utilizando como modelo el ratón, y administrándole zumo de pomelo *ad libitum* en lugar de agua (Sugar y Liu, 2000; Graybill *et al.*, 2003; Capilla *et al.*, 2003).

La administración de fluconazol a dosis elevadas demostró ser el tratamiento más efectivo de los ensayados, dando lugar a una tasa de supervivencia entre el 80 y el 90% y a una disminución significativa, respecto al control y a las otras terapias, de la concentración del hongo en riñón, bazo y hígado. Nuestros datos concuerdan con los obtenidos en un reciente estudio clínico donde se observó la eficacia del fluconazol en el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por *B. capitatus* (Girmeria *et al.*, 2005). Así mismo, en nuestro trabajo, la anfotericina B mostró una buena eficacia *in vivo*, aunque inferior a la del fluconazol, frente a *B. capitatus*, puesta de manifiesto especialmente por la disminución de la concentración fúngica en órganos. La 5-fluorocitosina y el voriconazol demostraron una eficacia variable frente a la infección causada por cada una de las cepas, obteniéndose una correlación entre los resultados de la sensibilidad *in vitro* e *in vivo*, traducida por una eficacia significativamente mejor con respecto al grupo control, cuando los valores de la CMI de estos antifúngicos eran bajos para la cepa infectante. Los resultados de este estudio se publicaron en la revista *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 29:79-83.

Las consideraciones ya citadas acerca de la toxicidad de la anfotericina B y de la 5-fluorocitosina sugieren la posibilidad de uso de una terapia combinada que permita reducir la dosis de los antifúngicos. Dada la inexistencia de datos publicados acerca de la eficacia de los tratamientos combinados en la infección experimental por *B. capitatus*, decidimos estudiar la eficacia de la anfotericina B combinada con la micafungina, la 5-fluorocitosina y el voriconazol utilizando el mismo modelo animal que usamos en el estudio anterior. Se trata del primer estudio publicado acerca de la

terapia combinada en un modelo experimental de infección por *B. capitatus*. Se obtuvieron buenos resultados, consiguiendo en varios casos mejorar los obtenidos con las respectivas monoterapias. Sin embargo, ninguna combinación consiguió mejorar el tratamiento con fluconazol a dosis elevadas. Los resultados han sido aceptados para su publicación en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

5.3. *Cryptococcus* spp.

La criptococosis es una importante causa de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en infectados por el VIH (de Hoog *et al.*, 2000; Groll y Walsh, 2001; Mitchell y Perfect, 1995). El tratamiento de elección, incluyendo la enfermedad del sistema nervioso central, se basa en la administración prolongada de la anfotericina B en monoterapia o asociada a la 5-fluorocitosina, el fluconazol, y del itraconazol en pacientes con intolerancia al fluconazol. La toxicidad de la anfotericina B y la 5-fluorocitosina y el incremento de cepas resistentes al fluconazol (Currie *et al.*, 1995; Sar *et al.*, 2004) plantean el uso de nuevas estrategias terapéuticas.

Cryptococcus neoformans es causa de criptococosis en pacientes inmunocomprometidos, mientras que *C. gattii* afecta preferentemente a inmunocompetentes (Capilla *et al.*, 2006; Casadevall y Perfect, 1998; Mitchell y Perfect, 1995). Otras especies del género, como *C. laurentii* y *C. albidus* dan lugar a infecciones humanas con escasa frecuencia (Jonhson *et al.*, 1998; Kordossis *et al.*, 1998).

En el momento de iniciar nuestra línea de investigación sobre *Cryptococcus* spp., los estudios publicados acerca de las interacciones *in vitro* entre la anfotericina B y la 5-fluorocitosina con otros antifúngicos o entre ellos, se referían únicamente a cepas pertenecientes a *C. neoformans* (Barchiesi *et al.*, 1999, 2000, 2001; Franzot y Casadevall, 1997; Nguyen *et al.*, 1995,1997; Schwarz *et al.*, 2003). Se conocía muy poco sobre las interacciones entre las equinocandinas y la anfotericina B o los azoles frente a estos hongos. Por este motivo, decidimos evaluar la actividad *in vitro* de las combinaciones de la micafungina con la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol o el ravuconazol frente a las cuatro especies de *Cryptococcus* de mayor importancia clínica. La combinación de la micafungina con la anfotericina B fue la que dio lugar al porcentaje más elevado de sinergismos. Las CMI de la micafungina frente

a *Cryptococcus* spp. fueron muy elevadas, pero en combinación con otros antifúngicos, especialmente con la anfotericina B, los valores disminuyeron hasta 10 diluciones, obteniéndose en muchos casos valores de CMI inferiores a los niveles plasmáticos alcanzados con este antifúngico en el hombre (Denning, 2003) y en la infección experimental en el conejo (Groll *et al.*, 2001). Los resultados se publicaron en la revista *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2005; 49:2994-2996.

En el estudio anterior se demostró la excelente actividad *in vitro* del itraconazol, el voriconazol y el ravuconazol, sobre *C. neoformans* y *C. gattii*. En el caso del voriconazol, nuestros resultados coincidían con los obtenidos por otros autores frente a *C. neoformans* (Sabatelli *et al.*, 2006; Trilles *et al.*, 2004). Los estudios sobre la farmacocinética del voriconazol demuestran su transporte al espacio subaracnoideo, obteniéndose una relación lineal entre las concentraciones en el LCR y las dosis administradas (Levêque *et al.*, 2006; Lutsar *et al.*, 2003). Los escasos estudios clínicos existentes ponen de manifiesto la eficacia del voriconazol en el tratamiento de la criptococosis (Lutsar *et al.*, 2003; Perfect *et al.*, 2003; Sabbatani *et al.*, 2004), existiendo un único estudio experimental realizado con una única cepa en el cual se demuestra la eficacia del voriconazol sobre *C. neoformans* (Mavrogiorgos *et al.*, 2006). Ante los datos existentes citados se planteó el estudio experimental de la actividad del voriconazol en la infección intracraneal por *C. neoformans* en el ratón inmunocompetente. En el estudio se emplearon dos cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo AD) y una de *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A). El tratamiento con voriconazol dio lugar a un 100% de supervivencia de los ratones infectados con las dos cepas pertenecientes al serotipo AD y de un 80% de los infectados con la cepa del serotipo A. En los estudios de recuperación fúngica se demostró la reducción de la concentración del hongo en el cerebro y pulmones de los animales tratados, obteniendo en algunos casos la esterilización de estos órganos. Los resultados han sido aceptados para su publicación en la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Nuestro estudio constituye la segunda aportación al tratamiento experimental con voriconazol de la infección por *Cryptococcus*. Anteriormente, Mavrogiorgos *et al.*, (2006) habían descrito un modelo de infección pulmonar en el ratón, con una única cepa de *C. neoformans* var. *grubii*, y administrando el voriconazol por vía oral sin la sustitución del agua de bebida de los animales por zumo de pomelo. A diferencia de lo hallado en nuestro estudio, Mavrogiorgos *et al.*, (2006) observaron la prolongación de la supervivencia de los animales tratados con voriconazol, pero no la reducción de la concentración del hongo

en tejido pulmonar, probablemente por la rápida metabolización del antifúngico. Los autores demostraron la disminución de la concentración sérica de glucuronoxilomanano, componente principal de la cápsula de *C. neoformans*, valorando este dato como prueba de la actividad del voriconazol. A pesar de las diferencias entre los modelos experimentales utilizados, tanto en el estudio de Mavrogiorgos *et al.* (2006) como en el que realizamos nosotros, se evidenció la eficacia del tratamiento con voriconazol.

5.4. *Candida* spp.

Las especies de *Candida* son hongos patógenos oportunistas causantes de la mayoría de infecciones nosocomiales fúngicas en todo el mundo (Spellberg *et al.*, 2006). Más de 17 especies de *Candida* han sido descritas como causantes de candidiasis invasiva en humanos (Hazen, 1995; Pfaller y Diekema, 2004). Más del 90% de las infecciones invasivas producidas por *Candida* spp., son atribuidas a cinco especies, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Aunque *C. albicans* sigue siendo la especie más prevalente en la producción de candidiasis invasivas (66% de todas las especies de *Candida*), recientemente se ha observado una disminución de su incidencia junto al aumento de la correspondiente a *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Pfaller y Diekema, 2007). *C. glabrata* es la segunda especie más frecuentemente aislada en candidiasis invasiva en Estados Unidos, y la cuarta en España por detrás de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* y seguida de *C. krusei* (Pfaller y Diekema, 2007). Los factores de riesgo más frecuentes en la infección diseminada por *C. glabrata* son el uso de antibióticos de amplio espectro, la implantación de catéteres intravasculares, la administración de nutrición parenteral, y la estancia en unidad de cuidados intensivos. *C. parapsilosis* posee una gran habilidad en la formación de biofilms en catéteres y otros dispositivos (Branchini *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 2004). También causa infecciones en niños y recién nacidos (Levy *et al.*, 1998; Lupetti *et al.*, 2002). *C. tropicalis* es un patógeno fúngico importante en pacientes con neutropenia y con enfermedades hematológicas malignas (Abi-Said *et al.*, 1997; Kontoyiannis *et al.*, 2001). Por último, *C. krusei* es un importante patógeno en pacientes con enfermedades hematológicas malignas y en receptores de trasplante de médula osea (Abi-Said *et al.*, 1997; Marr *et al.*, 2000). Durante décadas, sólo una clase de antifúngicos, los polienos, estaban disponibles para el tratamiento de las candidiasis. No obstante, con la aparición de los nuevos triazoles, las formulaciones

lipídicas de la anfotericina B y las equinocandinas, recientemente recomendados para el tratamiento de candidiasis existe un abanico más amplio de antifúngicos a utilizar, existiendo la posibilidad de empleo de asociaciones de antifúngicos que presenten blancos de acción de acción diferentes.

Estudios *in vitro* e *in vivo* previos, realizados por nosotros o por otros integrantes de nuestra Unidad, habían puesto de manifiesto la interacción sinérgica entre la micafungina y la anfotericina B frente a varias especies de levaduras, incluida *C. glabrata*, y a hongos filamentosos (Marine *et al.*, 2006; Serena *et al.*, 2005 a y b; Yustes y Guarro, 2005). Por ello decidimos realizar el estudio de la actividad *in vitro* de esta combinación frente a 115 cepas pertenecientes a siete especies de *Candida* de importancia clínica, utilizando la técnica del tablero de ajedrez y siguiendo el método de microdilución recomendado por el CLSI para levaduras (M27-A2). Se compararon los resultados obtenidos utilizando como puntos de corte la CMI-0 y la CMI-2, la primera recomendada para la anfotericina B y la segunda para las equinocandinas, observándose importantes diferencias dependiendo del criterio de lectura utilizado (MIC-0 o MIC-2). El mayor número de interacciones sinérgicas se obtuvo utilizando como punto de corte la MIC-2 abarcando a un 70% de las cepas de *C. albicans* estudiadas y a un 50-60% de las correspondientes a *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en diversos estudios experimentales en los que la combinación de un equinocandina con la anfotericina B se ha comportado de modo sinérgico frente a *Candida* spp. (Hossain *et al.*, 2003; Mariné *et al.*, 2006; Olson *et al.*, 2005). Los resultados se han enviado a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007.

5.5. *Sporobolomyces salmonicolor* y *Rhodotorula glutinis*

Ambas especies pertenecen a géneros de levaduras de la división Basidiomycota y son causantes de infrecuentes infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos (Anatoliotaki *et al.*, 2003; Dorey *et al.*, 2002; Hsueh *et al.*, 2003; Plazas *et al.*, 1994; Sheu *et al.*, 1994). A pesar de su rareza, la gravedad de estas infecciones y la ausencia de un tratamiento específico para las mismas, justifican el estudio de la sensibilidad *in vitro* de estas especies, aspecto sobre el cual existen muy pocos estudios publicados (Espinell-Ingroff *et al.*, 1999; Quindós *et al.*, 2004; Zaas *et al.*, 2003).

Simultáneamente con el estudio de la sensibilidad *in vitro* de *Trichosporon asahii* a 8 antifúngicos, incluyendo cuatro antifúngicos nuevos, se realizó el correspondiente a diez cepas de *Rhodotorula glutinis* y diez cepas de *Sporobolomyces salmonicolor*. Las CMI de la anfotericina B para *R. glutinis* fueron siempre inferiores a 0.5 µg/ml. Estos resultados concuerdan con la eficacia clínica de este antifúngico en las infecciones causadas por este hongo (Anatoliotaki *et al.*, 2003; Zaas *et al.*, 2003). La anfotericina B, el ravuconazol y el albaconazol fueron los únicos antifúngicos que mostraron buena actividad *in vitro* sobre esta especie. En el caso de *S. salmonicolor*, los triazoles fueron los antifúngicos que mostraron mejores resultados *in vitro*.

El estudio se completó con la evaluación de la actividad *in vitro* de las combinaciones de la micafungina con la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol y el ravuconazol sobre las mismas cepas de *Rhodotorula glutinis* y *Sporobolomyces salmonicolor*, aspecto sobre el que no existían datos publicados anteriormente. El alto porcentaje de interacciones sinérgicas (60-80%) de todas las combinaciones estudiadas, con la excepción de la de la micafungina con el fluconazol, abre expectativas a la posibilidad de tratamientos alternativos a la anfotericina B en las infecciones producidas por *R. glutinis*. En el caso de *S. salmonicolor* los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de la micafungina con el itraconazol con un 60% de interacciones sinérgicas. Las otras combinaciones estudiadas mostraron un 20-40% de interacciones sinérgicas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

6. CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

1. Hemos estudiado la actividad *in vitro* de 8 antifúngicos frente a diez cepas de *Trichosporon asahii*.

- Las diferentes cepas de *T. asahii* han mostrado ser resistentes *in vitro* a los antifúngicos usualmente utilizados en los tratamientos de las infecciones diseminadas por levaduras (la anfotericina B y el fluconazol). Los nuevos triazoles, voriconazol, ravuconazol y albaconazol, han demostrado tener una excelente actividad *in vitro* frente a *T. asahii*.

2. Hemos desarrollado un modelo repetible de infección diseminada por *T. asahii* en ratones inmunocomprometidos en el que se ha estudiado la eficacia de monoterapias y de terapias combinadas.

- Las combinaciones de micafungina con fluconazol, y especialmente con anfotericina B han mostrado una excelente eficacia en el tratamiento experimental de la infección diseminada producida por *T. asahii* en el ratón.

3. Se ha evaluado la actividad *in vitro* de la micafungina combinada con 5 antifúngicos, convencionales y de reciente desarrollo, frente a diez cepas de *T. asahii*.

- La combinación de la micafungina con la anfotericina B mostró una buena actividad *in vitro*, con un 100% de interacciones sinérgicas frente a *T. asahii*.

4. Se desarrolló un modelo repetible de infección sistémica por *T. asahii* en el cobaya en el que se estudió la eficacia del tratamiento con voriconazol.

- La elevada eficacia del voriconazol en el tratamiento del modelo experimental sugiere su posible utilidad en la terapia de las infecciones humanas producidas por *T. asahii*

5. Hemos desarrollado un modelo repetible de infección diseminada por *Blastoschizomyces capitatus* en el ratón inmunocomprometido, en el que hemos

estudiado la eficacia de los antifúngicos utilizados habitualmente en el tratamiento de las infecciones por levaduras y de posibles alternativas.

- Fluconazol a dosis elevadas ha demostrado ser el tratamiento más efectivo de los ensayados frente a la infección experimental causada por *B. capitatus*.
- En el mismo modelo, la terapia experimental con combinaciones de antifúngicos no consiguió mejorar el tratamiento anterior.

6. Se ha evaluado la actividad *in vitro* de la micafungina combinada con 5 antifúngicos, convencionales y de reciente introducción, frente a 40 cepas de las cuatro especies de *Cryptococcus* de mayor relevancia clínica.

- La combinación de la micafungina con la anfotericina B mostró el mayor porcentaje de interacciones sinérgicas.

7. Hemos desarrollado un modelo repetible de criptococosis cerebral en el ratón inmunocompetente, en el que se ha estudiado la eficacia del tratamiento con voriconazol.

- La excelente eficacia del tratamiento con voriconazol en el modelo experimental, sugiere la potencial utilidad de este antifúngico en el tratamiento de la infección humana.

8. Se ha evaluado la actividad *in vitro* de la micafungina combinada con la anfotericina B frente a 115 cepas pertenecientes a las siete especies de *Candida* de mayor importancia clínica.

- La combinación de la micafungina con la anfotericina B ha mostrado interacción sinérgica frente al 50% de cepas estudiadas cuando el criterio de lectura utilizado fue la CMI-2 y frente al 20% de cepas estudiadas cuando fue utilizada la CMI-0.

- La disparidad de resultados obtenida en función del criterio de lectura de la CMI, evidencia la necesidad de definir los puntos de corte adecuados para la lectura de las pruebas de sensibilidad *in vitro* frente a combinaciones de antifúngicos cuando se utiliza la técnica del damero.

9. Hemos estudiado la actividad *in vitro* de 8 antifúngicos y de las combinaciones de la micafungina con 5 de ellos frente a diferentes cepas de *Rhodotorula glutinis* y *Sporobolomyces salmonicolor*.

- Únicamente la anfotericina B, el ravuconazol y el albaconazol mostraron actividad *in vitro* frente a *R. glutinis*.
- Los triazoles itraconazol, voriconazol, ravuconazol y albaconazol y la terbinafina presentaron buena actividad *in vitro* frente a *S. salmonicolor*.
- Todas las combinaciones de antifúngicos estudiadas con excepción de la combinación de la micafungina con el fluconazol mostraron un alto porcentaje de interacciones sinérgicas frente a *R. glutinis*.
- La combinación de la micafungina con el itraconazol dio lugar al mayor porcentaje de interacciones sinérgicas frente a *S. salmonicolor*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

7. BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ACTIVIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS
Carolina Serena Perelló
ISBN: 978-84-691-0361-6/DL: T.2180-2007

Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinczowski H, Vartivarian S. 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin. Infect. Dis. **24**:1122-1128.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. Wiley J and Sons, Inc., New York.

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.

Alliot C, Desablens B, Garidi R, Tabuteau S. 2000. Opportunistic infection with *Rhodotorula* in cancer patients treated by chemotherapy: two case reports. Clin. Oncol. **12**:115-117.

Anaissie EJ, Hachem R, Karyotakis NC, Gokaslan A, Dignani MC, Stephens LC, Tin-U CK. 1994. Comparative efficacies of amphotericin B, triazoles, and combination of both as experimental therapy for murine trichosporonosis. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:2541-2544.

Anatoliotaki M, Mantadakis E, Galanakis E, Samonis G. 2003. *Rhodotorula* species fungemia: a threat to the immunocompromised host. Clin. Lab. **49**: 49-55.

Andriole VT, Minitier P, George D, Kordick D, Patterson TF. 1992. Animal models: their usefulness for studies of fungal pathogenesis and drug efficacy in aspergillosis. Clin. Infect. Dis. **14**:134-138.

Antachopoulos C, Papakonstantinou E, Dotis J, Bibashi E, Tamiolaki M, Kolioukas D, Roilides E. 2005. Fungemia due to *Trichosporon asahii* in a neutropenic child refractory to amphotericin B: clearance with voriconazole. J. Pediatr. Hematol. Oncol. **27**:283-285.

Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. 2002. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:245–247.

Averbuch D, Boekhout T, Falk R, Engelhard D, Shapiro M, Block C, Polacheck I. 2002. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. *Med. Mycol.* **40**:260-263.

Barchiesi F, Gallo D, Caselli F, Di Francesco LF, Arzeni D, Giacometti A, Scalise G. 1999. In-vitro interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:65-70.

Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani F, Giannini D, Arzeni D, Di Cesare S, Di Francesco LF, Fortuna M, Giacometti A, Carle F, Mazzei T, Scalise G. 2000. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:245–247.

Barchiesi F, Schimizzi AM, Najvar LK, Bocanegra R, Caselli F, Di Cesare S, Giannini D, Di Francesco LF, Giacometti A, Carle F, Scalise G, Graybill JR. 2001. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1355–1359.

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.

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.

Belone AF, Madeira S, Rosa PS, Opromolla DV. 2002. Experimental reproduction of the Jorge Lobo's disease in Balb/c mice inoculated with *Lacazia loboi* obtained from a previously infected mouse. *Mycopathologia* **155**:191-194.

Bergman AG, Kauffman CA. 1984. Dermatitis due to *Sporobolomyces* infection. *Arch. Derm.* **120**:1059-1060.

Bouza E, Muñoz P. 2004. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. Clin. Microbiol. Infect. **10**:76-85.

Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. 1994. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J. Clin. Microbiol. **32**:452-456.

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.

Capilla J, Guarro J. 2004. Correlation between in vitro susceptibility of *Scedosporium apiospermum* to voriconazole and in vivo outcome of scedosporiosis in guinea pigs. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:4009-4011.

Capilla J, Maffei CM, Clemons KV, Sobel RA, Stevens DA. 2006. Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. Med. Mycol. **44**:601-610.

Capilla J, Ortoneda M, Pastor FJ, Guarro J. 2001. In vitro antifungal activities of the new triazole UR-9825 against clinically important filamentous fungi. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:2635-2637.

Capilla J, Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Guarro J. 2003. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3976-3978.

Capilla J, Yustes C, Mayayo E, Fernández B, Ortoneda M, Pastor FJ, Guarro J. 2003. Efficacy of albaconazole (UR-9825) in treatment of disseminated *Scedosporium prolificans* infection in rabbits. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:1948-1951.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The fungi. 2nd ed. Academic Press, London.

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, Perfect JR. 1998. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC:ASM Press.

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

Cawley MJ, Braxton GR, Haith Jr LR, Reilly KJ, Guilday RE, Patton ML. 2000. *Trichosporon beigelii* infection: experience in a regional burn center. *Burns* **26**:483-486.

Chandrasekar PH, Cutright J, Manavathu E. 2000. Efficacy of voriconazole against invasive pulmonary aspergillosis in a guinea pig model. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:673-676.

Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K. 2000. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **31**:499-508.

Cheng M, Chiou CC, Liu Y, Wang H, Hsieh K. 2001. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1608-1611.

Cimerman M, Gunde-Cimerman N, Zalar P, Perkovic T. 1999. Femur osteomyelitis due to a mixed fungal infection in a previous healthy man. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1532-1535.

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.

Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, Webb RM, Currier M, Flowers RH, Fridkin SK, Hajjeh RA. 2004. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4468-4472.

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.

Currie BP, Ghannoum M, Bessen L, Casadevall A. 1995. Decreased fluconazole susceptibility of a relapse *Cryptococcus neoformans* isolate after fluconazole treatment. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **4**:318-319.

D'Antonio D, Mazzoni A, Lacone A, Violante B, Capuani MA, Schioppa F, Romano F. 1996. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Blastoschizomyces capitatus* causing nosocomial infections in cancer patients. *J Clin Microbiol* **34**:753-755.

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. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**:1142-1151.

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.

Dhindsa MK, Naidu J, Singh SM. 1998. A case of subcutaneous infection in a patient with discoid lupus erythematosus caused by a *Scytalidium* synanamorph of *Nattrassia mangiferae*, and its treatment. *Med. Mycol.* **36**:425-427.

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.

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.

Dorey MW, Brownstein S, Kertes PJ, Gilberg SM, Toye B. 2002. *Rhodotorula glutinis* endophthalmitis. *Can. J. Ophthalmol.* **37**:416-418.

Ebright JR, Fairfax MR, Vazquez JA. 2001. *Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia. *Clin. Infect. Dis.* **33**:28-30.

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

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

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. In vitro activities of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **36**:198-202.

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

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

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

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 M, Messer SA, Knap CC, Killian S, Norris HA, Ghannoum MA. 1999. Multicenter comparison of the sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37**:591-595.

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

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

Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME. 2002. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3846–3853.

Falk R, Wolf DG, Shapiro H, Polacheck I. 2003. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* isolates are susceptible to voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **41**:911.

Fournier S, Pavageau W, Feuillhade M, Deplus S, Zagdanski AM, Verola O, Dombret H, Molina JM. 2002. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:892-896.

Franzot SP, Casadevall A. 1997. Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:331–336.

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.

Fuchs J, Milbradt R, Pecher SA. 1990. Lobomycosis (keloidal blastomycosis): case reports and overview. *Cutis* **46**:227-234.

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.

Ghannoum MA, Okogbule-Wonodi I, Bhat N, Sanati H. 1999. Antifungal activity of voriconazole (UK-109,496), fluconazole and amphotericin B against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic guinea pig model. *J. Chemother.* **11**:34-39.

Girmenia C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, Melillo L, Buelli M, Pizzarelli G, Venditti M, Martino P; GIMEMA Infection Program. 2005. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1818-1828.

Girmenia C, Pizarelli G, D'Antonio D, Cristini F, Martino P. 2003. In vitro susceptibility testing of *Geotrichum capitatum*: comparison of the E-test, disk diffusion, and sensititre colorimetric methods with the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3985-3988.

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.

González GM, Tijerina R, Najvar L, Rinaldi M, Yeh IT, Graybill JR. 2002. Experimental murine model of disseminated *Pseudallescheria* infection. *Med. Mycol.* **40**:243-248

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. 2005. Voriconazole for candidosis: an important addition?. *Lancet* **366**:1413-1414.

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.

Greig JR, Khan MA, Hopkinson NS, Marshall BG, Wilson PO, Arman SU. 2001. Pulmonary infection with *Scedosporium prolificans* in an immunocompetent individual. *J. Infect.* **43**:15-17.

Groll AH, Mickiene D, Petraitis V, Petraitiene R, Ibrahim KH, Piscitelli SC, Bekersky I, Walsh TJ. 2001. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution

of the antifungal echinocandin lipopeptide micafungin (FK463) in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3322-7.

Groll AH, Walsh TJ. 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**: 8-24.

Gueho E, Smith MT, de Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-Van der Vegte WH. 1992. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**:289-316.

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

Hossain MA, Reyes GH, Long LA, Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2003. Efficacy of caspofungin combined with amphotericin B against azole-resistant *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1427-1429.

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.

Hsueh PR, Teng LJ, Ho SW, Luh KT. 2003. Catheter-related sepsis due to *Rhodotorula glutinis*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:857-859.

Huttova M, Kralinsky K, Horn J, Marinova I, Iligova K, Fric J, Spanik S, Filka J, Uher J, Kurak J, Krcmery V Jr. 1998. Prospective study of nosocomial fungal meningitis in children--report of 10 cases. *Scand. J. Infect. Dis.* **30**:485-487.

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.

Itoh T, Hosokawa H, Kohdera U, Toyazaki N, Asada Y. 1996. Disseminated infection with *Trichosporon asahii*. *Mycoses* **39**:195-199.

Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. 1998. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. *Mycoses* **41**:277-280.

Kamberi P, Atsuro H, Takayoshi T, Masaru N. 1998. Efficacy of amphotericin B and azoles alone and in combination against disseminated trichosporonosis in neutropenic mice. *Chemotherapy (Basel)* **44**:55–62.

Karim M, Alam M, Sarah A, Ahmed R, Sheikh H. 1997. Chronic invasive aspergillosis in apparently immunocompetent hosts. *Clin. Infect. Dis.* **24**:723-733.

Kauffman C, Hajjeh R, Chapman W. 2000. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. *Clin. Infect. Dis.* **30**:684–687.

Kerridge D, Vanden-Bossche H. 1990. Drug discovery: a biochemist approach. En: *Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases.* Ed: Ryley JF. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag.

Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Kiratisin P, Mundy LM, Bailey TC. 2006. Evaluation of *Cryptococcus laurentii* meningitis in a patient with HIV infection: a case report and review of the literature. *Hawai Med. J.* **65**:260-263.

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

Kirkpatrick WR, Perea S, Coco BJ, Patterson TF. 2006. Efficacy of caspofungin alone and in combination with voriconazole in a guinea pig model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2564-2568.

Kobayashi G, Spitzer ED. 1989. Testing of organisms for susceptibility to triazoles: It is justified?. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**:387-389.

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.

Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, Legakis NJ. 1998. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med. Mycol.* **36**:335-339.

Kwong-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.

Larone DH. 1995. *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Lavy D, Morin O, Venet G, Maugars Y, Prost A, Berthelot JM. 2001. *Pseudallescheria boydii* knee arthritis in a young immunocompetent adult two years after a compound patellar fracture. *Joint Bone Spine* **68**:517-520.

Lee YA, Kim HJ, Lee TW, Kim MJ, Lee MH, Lee JH, Ihm CG. 2004. First report of *Cryptococcus albidus*-induced disseminated cryptococcosis in a renal transplant recipient. *Korean J. Intern. Med.* **19**:53-57.

Levêque D, Nivoix Y, Jehl F, Herbrecht R. 2006. Clinical pharmacokinetics of voriconazole. *Int. J. Antimicrob. Chemother.* **27**:274-284.

Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, Tucci V, Sood SK. 1998. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1086-1088.

Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S. 2002. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect. Dis.* **40**:2363-2369.

Lutsar I, Roffey S, Troke P. 2003. Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of guinea pigs and immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* **37**:728-732.

Lyon GM, Zurita S, Casquero J, Holgado W, Guevara J, Brandt ME, Douglas S, Shutt K, Warnock DW, Hajjeh RA. 2003. Population-based surveillance and a case-

control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. *Clin. Infect. Dis.* **36**:34-39.

Manfredi R, Fulgaro C, Sabbatini S, Legnani G, Fasulo G. 2006. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. *AIDS Patient Care STDS.* **20**:227-232.

Mariné M, Serena C, Pastor FJ, Guarro J. 2006. Combined antifungal therapy in a murine infection by *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:1295–1298.

Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. 2000. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J. Infect. Dis.* **181**:309-316.

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.

Mavrogiorgos N, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk D. 2006. Efficacy of voriconazole in experimental *Cryptococcus neoformans* infection. *Mycopathologia* **162**:111-114.

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. Infect. Dis.* **26**:1362-1366.

McGinnis MR. 1996. Mycetoma. *Dermatol. Clin.* **14**:97-104.

McGinnis MR, Rinaldi MG. 1991. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. En: *Antibiotic in Laboratory Medicine*. 3rd ed. Eds: Lorian V. Baltimore, Williams and Wilkins Co. MD, USA.

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.

Misra VC, Randhawa HS. 1976. *Sporobolomyces salmonicolor* var. *fischerii*, a new yeast. *Arch Microbiol.* **108**:141-143.

Mitchell TG, Perfect JR. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:515-548.

Morris JT, Beckius M, McAllister CK. 1991. *Sporobolomyces* infection in an AIDS patient. *J. Infect. Dis.* **164**:623-624.

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.

Narayan S, Batta K, Colloby P, Tan CY. 2000. Cutaneous *Cryptococcus* infection due to *Cryptococcus albidus* associated with Sezary syndrome. *Br. J. Dermatol.* **143**:632-634.

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

Nguyen MH, Barchiesi F, McGough DA, Yu VL, Rinaldi MG. 1995. In vitro evaluation of combination of fluconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1691–1695.

Nguyen MH, Najvar LK, Yu CY, Graybill JR. 1997. Combination therapy with fluconazole and flucytosine in the murine model of the cryptococcal meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1120–1123.

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.

Padhye AA, Kaplan W, Neuman MA, Case P, Radcliffe GN. 1984. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Sabouraudia* **22**:493-500.

Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, Larsen RA, Pankey GA, Lancaster DJ, Henderson H, Kauffman CA, Haas DW, Saccente M, Hamill RJ, Holloway MS, Warren RM, Dismukes WE. 2001. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin. Infect. Dis.* **33**:690-699.

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

Peachey PR, Gubbins PO, Martín RE. 1998. The association between cryptococcal variety and immunocompetent and immunocompromised hosts. *Pharmacology* **18**:255-264.

Pelzer K, Tietz HJ, Sterry W, Haas N. 2000. Isolation of both *Sporothrix schenckii* and *Nocardia asteroides* from a mycetoma of the forefoot. *Br. J. Dermatol.* **143**:1311-1315.

Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, Greenberg RN, DuPont B, Torre-Cisneros J, Just-Nubling G, Schlamm HT, Lutsar I, Espinel-Ingroff A, Johnson E. 2003. Voriconazole treatment for less common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1122–1131.

Petrocheilou-Paschou V, Prifti H, Kostis E, Papadimitriou C, Dimopoulos MA, Stamatelopoulos S. 2001. *Rhodotorula* septicemia: case report and minireview. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:100-102.

Pfaller MA, Diekema DJ. 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3607-3612.

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

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. 2006. 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, Rinaldi MG. 1992. In vitro testing of susceptibility of fluconazole. En: *The antifungal agents. Fluconazole*. Eds: Powderly WB, Vant Wout JW. Marius Press. Lancashire, UK.

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.

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

Pinna A, Carta F, Zanetti S, Sanna S, Sechi LA. 2001. Endogenous *Rhodotorula minuta* and *Candida albicans* endophthalmitis in an injecting drug user. *Br. J. Ophthalmol.* **85**:759.

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

Plazas J, Portilla J, Boix V, Pérez-Mateo M. 1994. *Sporobolomyces salmonicolor* lymphadenitis in AIDS patient. Pathogen or passenger? *AIDS* **8**:387-388.

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.

Quindós G, Ruesga MT, Martín-Mazuelos E, Salesa R, Alonso-Vargas R, Carrillo-Muñoz AJ, Brena S, San Millan R, Ponton J. 2004. In-vitro activity of 5-fluorocytosine against 1,021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. *Rev. Iberoam. Micol.* **21**:63-69.

Rantala A, Niihikoski J, Lehtonen OP. 1995. Yeasts in blood cultures: impact of early therapy. *Scand. J. Infect. Dis.* **21**:557-561.

Revankar SG, Graybill JR. 2003. Antifungal therapy. En: *Clinical Mycology*. Eds: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Elsevier Science, USA.

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 MD, Warnock DW. 1997. Fungal infection. Diagnosis and management. 2nd edn. Blackwell Science Ltd. United Kingdom.

Rippon JW. 1988. Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2nd edn. WB Saunders company, Philadelphia, USA.

Rodrigues GS, Ubatuba RR, Guazzelli LS, Oliveira FM, Severo LC. 2006. Infección nosocomial por *Trichosporon asahii*: revisión clínica de 22 casos. Rev. Iberoam. Micol. **23**:85-89.

Roffey SJ, Cole S, Comby P, Gibson D, Jezequel SG, Nedderman ANR, 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.

Roling EE, Klepser ME, Wasson A, Lewis RE, Ernst EJ, Pfaller MA. 2002. 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. **43**:13–17.

Rozenbaum R, Goncalves AJ. 1994. Clinical epidemiologic study of 171 cases of cryptococcosis. Clin. Infect. Dis. **18**:369-380.

Rubio M, Gil J, Benito R, Ramírez I, Navarro M. 2001. Micosis más frecuentes en nuestro medio. En: *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Eds: Pemán J, Martín E, Rubio M. Rev. Iberoam. Micol. Bilbao, País Vasco, España.

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

Sabbatani S, Manfredi R, Pavón M, Consales A, Chiodo F. 2004. Voriconazole proves effective in long-term treatment of a cerebral cryptococcoma in a chronic nephropathic HIV-negative patient, after fluconazole failure. Mycopathologia **158**:165-171.

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

Schwarz P, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. 2003. In vitro interaction of flucytosine with conventional and new antifungals against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3361–3364.

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, Fernandez-Torres B, Pastor FJ, Trilles L, Lazera MS, Nolard N, Guarro J. 2005a. In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2994-2996.

Serena C, Mariné M, Pastor FJ, Nolard N, Guarro J. 2005b. In vitro interaction of micafungin with conventional and new antifungals against clinical isolates of *Trichosporon*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorula*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:1020-1023.

Serena C, Pastor J, Gilgado F, Mayayo E, Guarro J. 2005c. Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:497-502.

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.

Shankar EM, Kumarasamy N, Bella D, Renuka S, Kownhar H, Suniti S, Rajan R, Rao UA. 2006. Pneumonia and plural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. *Can. Respir. J.* **13**:275-278.

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

Sherwood-Pyke MA, Gray J. 1985. Silurian fungal remains: probable records of the class ascomycota. *Lethaia* **18**:1-20.

Sheu MJ, Wang CC, Wang CC, Shi WJ, Chu ML. 1994. *Rhodotorula septicemia*: report of a case. *J. Formos. Med. Assoc.* **93**:645-647.

Shumann GL. 1991. Plant diseases: their biology and social impact. American Phytopathological Society, Sant Paul, MN.

Simon G, Simon G, Erdos M, Marodi L. 2005. Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a nine-year-old boy with X-linked hyper-immunoglobulin M syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**:935-937.

Sorrell TC. 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.* **39**:155-168.

Speed B, Dunt D. 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis* **21**:28-34.

Spellberg B, Edwards JE. 2001. Type 1 / Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* **32**:76-91.

Spellberg B, Filler SG, Edwards JE. 2006. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **42**:244-251.

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

Subramanyam VR, Rath CC, Mishra M, Chhotrai GP. 1993. Subcutaneous infection due to *Curvularia* species. *Mycoses* **36**:449-450.

Sugar AM, Liu XP. 2000. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med. Mycol.* **38**:209-210.

Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. 1998. Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Steinbach WJ, Perfect JR. 2003. Newer antifungal therapy for emerging fungal pathogens. *Int. J. Infect. Dis.* **7**: 525.

Stevens DA. 1996. Animals models in the evaluation of antifungal drugs. *J. Mycol. Med.* **6**:7-10.

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

Tashiro T, Nagai H, Nagaoka H, Goto Y, Kamberi P, Nasu M. 1995. *Trichosporon beigelii* pneumonia in patients with hematologic malignancies. *Chest* **108**:190–195.

Taylor JW, Spatafora J, O'Donnell K, Lutzoni F, James T, Hibbett DS, Geiser D, Bruns TD, Blackwell M. 2004. The Fungi. En: *Assembling the tree of life*. Eds: Cracraft J and Donoghue MJ. 1st ed. Oxford University Press, pp. 171 - 194.

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.

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.

Trilles L, Fernandez-Torres B, Lazera MDS, Wanke B, Guarro J. 2004. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4815–4817.

Bibliografía

Van Der Coer JM, Marres HA, Wielinga EW, Wong-Alcalá LS. 1992. Rhinosporidiosis in Europe. *J. Laryngol. Otol.* **106**:440-443.

Vasta S, Menozzi M, Scime R, Indovina A, Speciale A, Liberti G, Spano C, Majolino I. 1993. Central catheter infection by *Trichosporon beigelii* after autologous blood stem cell transplantation. A case report and review of the literature. *Haematologica* **78**:64–67.

Vlchkova-Lashkoska M, Kamberova S, Starova A, Goleva-Mishevska L, Tsatsa-Biljanovska N, Janevska V, Petrovska M. 2004. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in a human immunodeficiency virus-negative subject. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **18**:99-100.

Walsh TJ, Melcher GP, Rinaldi MG, Lecciones J, McGough DA, Kelly P, Lee J, Callender D, Rubin M, Pizzo PA. 1990. *Trichosporon beigelii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1616-1622.

Walsh TJ, Newman KR, Moody M, Wharton RC, Wade JC. 1986. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. *Medicine (Baltimore)* **65**:268–279.

Wolf DG, Falk R, Hacham M, Theelen B, Boekhout T, Scorzetti G, Shapiro M, Block C, Salkin IF, Polacheck I. 2001. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patient in three intensive care units. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4420-4425.

Yustes C, Guarro J. 2005. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3498-3500.

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