



## **PATOGENIA EXPERIMENTAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS OPORTUNISTAS EMERGENTES Y EVALUACIÓN DE LA TERAPIA ANTIFÚNGICA**

**Katihuska Paredes Aguilar**

**Dipòsit Legal: T 959-2014**

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

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

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

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

**Patogenia experimental y caracterización molecular de  
hongos oportunistas emergentes y evaluación de la  
terapia antifúngica**

Katihuska Paredes Aguilar

Tesis doctoral

2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PATOGENIA EXPERIMENTAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS OPORTUNISTAS EMERGENTES Y EVALUACIÓN DE LA TERAPIA ANTIFÚNGICA

Katihuska Paredes Aguilar

Dipòsit Legal: T 959-2014



Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Josep Guarro Artigas, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de Salud de la Universidad Rovira i Virgili y Javier Capilla, profesor agregado de la Facultad de Medicina y Ciencias de Salud de la Universidad Rovira i Virgili

Hacen constar que:

La Tesis Doctoral titulada “PATOGENIA EXPERIMENTAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS OPORTUNISTAS EMERGENTES Y EVALUACIÓN DE DE LA TERAPIA ANTIFÚNGICA”, presentada por Katihuska Paredes Aguilar, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al título de Doctor

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

Reus, 17 de Febrero de 2014

Dr. Josep Guarro Artigas

Dr. Javier Capilla

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PATOGENIA EXPERIMENTAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS OPORTUNISTAS EMERGENTES Y EVALUACIÓN DE LA TERAPIA ANTIFÚNGICA

Katihuska Paredes Aguilar

Dipòsit Legal: T 959-2014

*Para Sergio, Viviana y Daniela*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PATOGENIA EXPERIMENTAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS OPORTUNISTAS EMERGENTES Y EVALUACIÓN DE LA TERAPIA ANTIFÚNGICA

Katihuska Paredes Aguilar

Dipòsit Legal: T 959-2014

## **Agradecimientos**

Al Dr. Josep Guarro, jifi, gracias por darme la oportunidad de trabajar con ustedes, por haber creído en mí, por ser ejemplo de trabajo, por ser mi guía, mi empujón, por la paciencia, los consejos y por todos los momentos compartidos.

Al Dr. Luis Zaror, por sus enseñanzas, entusiasmo y apoyo desde que comencé a trabajar en Microbiología.

A los Drs. Javier Pastor y Javier Capilla gracias por la dedicación, paciencia y el tiempo invertido en todos los trabajos generados, por las conversaciones llenas de anécdotas y la amistad.

Al Dr. Josep Cano, por su amistad y preocupación, gracias. Los Drs. Alberto Stchigel y Emilio Mayayo, por las tertulias filosóficas, científicas llenas de risas y ocurrencias que hacen el trabajo ameno y divertido. A las Dras. Dania García y Loida López por ser una chispa de alegría.

A los doctores Josepa Gené, Maria José Figueras, Roxana Beaz, e Isabel Pujol, por haberme ayudado durante estos años. Muchísimas gracias.

A mis queridos amigos y compañeros de laboratorio Arturo Levican, Valentina Salas, Marta Sanchis, Adela Martin, Keith da Cunha, gracias por las risas, la complicidad, el apoyo incondicional, el cariño y la amistad, han sido mi familia en España.

A Montse Pallas e Immaculada Abello del personal administrativo; Amparo Aguilar, Esperança Chernichero y Juan València de la Unitat d' experimentacio animal; Núria Pilas y Carme Sanmartí, personal técnico del laboratorio, que hacen posible nuestro trabajo diario.

A mis amigos de Chile, Karen, Edgardo, Nico, Moni, las Ales, Caro, Francisco, Luis, Sandra y Gastón entre otros, que siempre han estado presentes con su apoyo a pesar del tiempo y la distancia.

A mis padres y mi hermana, gracias por apoyar mis sueños incondicionalmente, son mi inspiración, los amo.





| Índice  | página |
|---|--------|
| <b>1. Introducción</b>                          | 1      |
| <b>1.1. El reino de los hongos</b>              | 3      |
| <b>1.2. La infección fúngica</b>                | 5      |
| <b>1.3. Tipos de micosis</b>                    | 5      |
| <b>1.3.1. Micosis superficiales</b>             | 5      |
| <b>1.3.2. Micosis cutáneas</b>                  | 6      |
| <b>1.3.3. Micosis subcutáneas</b>               | 6      |
| <b>1.3.4. Micosis profundas</b>                 | 6      |
| <b>1.3.5. Micosis sistémicas</b>                | 7      |
| <b>1.3.5.1. Micosis oportunistas</b>            | 7      |
| <b>1.3.5.1.1. <i>Candida</i></b>                | 8      |
| <b>1.3.5.1.2. <i>Curvularia (Bipolaris)</i></b> | 9      |
| <b>1.3.5.1.3. <i>Scopulariopsis</i></b>         | 10     |
| <b>1.4. Compuestos antifúngicos</b>             | 11     |
| <b>1.4.1. Polienos</b>                          | 12     |
| <b>1.4.1.1. Anfotericina B</b>                  | 12     |
| <b>1.4.2. Azoles</b>                            | 13     |
| <b>1.4.2.1. Fluconazol</b>                      | 14     |
| <b>1.4.2.2. Itraconazol</b>                     | 14     |
| <b>1.4.2.3. Voriconazol</b>                     | 14     |
| <b>1.4.2.4. Posaconazol</b>                     | 15     |
| <b>1.4.3. Equinocandinas</b>                    | 15     |
| <b>1.4.3.1. Caspofungina</b>                    | 16     |
| <b>1.4.3.2. Anidulafungina</b>                  | 16     |
| <b>1.4.3.3. Micafungina</b>                     | 16     |
| <b>1.4.4. Flucitosina</b>                       | 16     |
| <b>1.4.5. Otros compuestos antifúngicos</b>     | 18     |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.5. Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i></b>                                  | <b>18</b> |
| <b>1.6. Modelos animales para la determinación de la eficacia<br/>de los antifúngicos</b>              | <b>19</b> |
| <b>1.7. Importancia de las técnicas moleculares en el diagnóstico<br/>de las micosis</b>               | <b>20</b> |
| <b>2. Objeto e interés del trabajo</b>   | <b>23</b> |
| <b>3. Materiales y métodos</b>   | <b>29</b> |
| <b>3.1. Origen y conservación de los aislados</b>  | <b>31</b> |
| <b>3.2. Estudios taxonómicos</b>   | <b>31</b> |
| <b>3.2.1. Cepas</b>  | <b>31</b> |
| <b>3.2.2. Caracterización fenotípica de los aislados</b>   | <b>31</b> |
| <b>3.2.2.1. Morfología</b>   | <b>31</b> |
| <b>3.2.2.2. Estudios fisiológicos</b>  | <b>32</b> |
| <b>3.2.3. Caracterización molecular de los aislados</b>  | <b>33</b> |
| <b>3.2.3.1. Extracción de ADN</b>  | <b>33</b> |
| <b>3.2.3.2. Amplificación del domonio D1/D2 y de la región ITS</b>                                     | <b>33</b> |
| <b>3.2.3.3. Comprobación y purificación del producto amplificado</b>                                   | <b>33</b> |
| <b>3.2.3.4. Secuenciación de los productos de PCR</b>  | <b>35</b> |
| <b>3.2.3.5. Obtención de las secuencias de consenso e identificación<br/>molecular de los aislados</b> | <b>35</b> |
| <b>3.2.3.6. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético</b>                                     | <b>35</b> |
| <b>3.2.3.7. Depósito y obtención de secuencias a partir de<br/>bases de datos internacionales</b>      | <b>35</b> |
| <b>3.3. Estudios <i>in vitro</i></b>   | <b>36</b> |
| <b>3.3.1. Cepas</b>  | <b>36</b> |
| <b>3.3.2. Agentes antifúngicos</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria</b>                                     | <b>37</b> |
| <b>3.3.4. Curvas de mortalidad</b>   | <b>39</b> |

|  |    |
|--|----|
| <b>3.4. Estudios sobre la eficacia de los antifúngicos en modelos murinos</b>  | 40 |
| <b>3.4.1. Cepas</b>  | 40 |
| <b>3.4.2. Animales de experimentación</b>  | 40 |
| <b>3.4.3. Inmunosupresión</b>  | 41 |
| <b>3.4.4. Infección</b>  | 41 |
| <b>3.4.5. Fármacos, dosis y vías de administración</b>   | 42 |
| <b>3.4.6. Recuperación fúngica a partir de órganos</b>   | 43 |
| <b>3.4.7. Histopatología</b>   | 44 |
| <b>3.4.8. Análisis estadístico</b>   | 45 |
| <b>4. Resultados</b>   | 47 |
| <b>4.1. Identificación molecular de cepas clínicas de especies de</b><br><b><i>Candida no albicans</i></b>   | 49 |
| <b>4.2. Molecular identification and antifungal susceptibility testing</b><br><b>of clinical isolates of the <i>Candida rugosa</i> complex and proposal</b><br><b>of the new species <i>Candida neorugosa</i>.</b><br>Paredes K, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Lawhon SD,<br>Zhang S, Watkins JP, Guarro J.<br>Journal of Clinical Microbiology. 2012, 50:2397-2403. | 55 |
| <b>4.3. Therapies against murine <i>Candida guilliermondii</i> infection,</b><br><b>relationship between <i>in vitro</i> antifungal pharmacodynamics</b><br><b>and outcome.</b><br>Paredes K, Pastor J, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill<br>AW, Guarro J.<br>Aceptado en Revista Iberoamericana de Micología   | 65 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>4.4. Virulence of <i>Curvularia</i> in a murine model</b>  |     |
| Paredes K, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW,<br>Guarro J.                              |     |
| <i>Mycoses</i> . 2013, 56:512-515   | 73  |
| <b>4.5. Experimental treatment of <i>Curvularia</i> infection</b>                                   |     |
| Paredes K, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW,<br>Guarro J.                              |     |
| Enviado a <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i>                                     | 79  |
| <b>4.6. Virulence of <i>Scopulariopsis</i> and experimental treatment<br/>of invasive infection</b> |     |
| Paredes K, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Guarro J.  |     |
| En preparación  | 91  |
| <b>5. Discusión</b>   | 107 |
| <b>5.1. Identificación y taxonomía del complejo <i>Candida rugosa</i></b>                           | 109 |
| <b>5.2. Candidiasis invasora</b>  | 111 |
| <b>5.3. Infecciones por hongos dematiáceos</b>  | 112 |
| <b>5.3.1. <i>Curvularia</i></b>   | 113 |
| <b>5.3.2. <i>Scopulariopsis</i></b>   | 115 |
| <b>6. Conclusiones</b>  | 117 |
| <b>7. Bibliografía</b>  | 123 |

## **1. INTRODUCCIÓN**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PATOGENIA EXPERIMENTAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS OPORTUNISTAS EMERGENTES Y EVALUACIÓN DE LA TERAPIA ANTIFÚNGICA

Katihuska Paredes Aguilar

Dipòsit Legal: T 959-2014

## **1. Introducción**

### **1.1. El reino de los hongos**

El Reino Fungi constituye uno de los mayores linajes de seres vivos, superando en número a las plantas (Blackwell, 2011). Hasta la fecha se han descrito más de 100.000 especies, aunque se estima que el número real debe aproximarse a los 3.5–5.1 millones (O'Brien *et al.*, 2005). El Reino Fungi es un grupo heterogéneo y polifilético dividido en dos subreinos: el subreino Dykaria, que agrupa los filos Ascomycota y Basidiomycota; y el llamado subreino de los «Hongos Basales» en el cual se incluyen el resto de especies fúngicas (Hibbett *et al.*, 2007). Sin embargo, los niveles taxonómicos se encuentran en un estado de constante cambio debido al uso de la biología molecular, hecho que ha revolucionado la taxonomía fúngica produciendo numerosos cambios, modificando nuestros conocimientos sobre las relaciones filogenéticas y evolutivas entre los hongos.

Los hongos son organismos eucarióticos, uni- o pluricelulares. Estructuralmente su pared celular se caracteriza por presentar quitina además de proteínas, lípidos y otros polisacáridos tales como glucanos y mananos (Pontón, 2008). Son microorganismos heterótrofos, quimiorganótrofos, que obtienen los nutrientes por secreción de exoenzimas que degradan la materia orgánica en sustancias asimilables para su posterior absorción, metabolización y acumulación en forma de glucógeno (Pontón *et al.*, 2002). Representan un rol vital en el equilibrio del ecosistema estableciendo numerosas relaciones simbióticas con otros organismos en la Naturaleza. Como saprobios, obtienen nutrientes a partir de materia orgánica muerta actuando como grandes descomponedores. Establecen además, relaciones mutualistas con otros organismos como algas y plantas, formando asociaciones beneficiosas para ambos como es el caso de los líquenes y micorrizas, respectivamente. También pueden actuar como organismos parásitos de animales y plantas, donde sólo uno de los organismos obtiene beneficio mientras el otro es perjudicado, produciendo grandes pérdidas económicas, mientras que en humanos representan un importante problema sanitario al producir infecciones, alergias y toxicosis. Sin embargo es indudable el papel beneficioso que los hongos tienen y han tenido



en diferentes culturas a lo largo de la Historia debido a sus aplicaciones en la industria alimentaria interviniendo en los procesos de fermentación y en la industria farmacéutica, mediante la producción de antibióticos, antifúngicos, pigmentos, vitaminas y enzimas entre otros.

Morfológicamente se presentan bajo dos formas principales: levaduriforme y filamentosa. Las levaduras se han definido como hongos unicelulares, que se reproducen asexualmente por gemación o fisión binaria y sexualmente mediante ascosporas o basidiosporas. Producen colonias lisas formadas por agregados de células individuales. En algunos casos, las células hijas no se separan de la célula madre, formándose cadenas cortas denominadas pseudohifas que dan lugar a un pseudomicelio. Las formas filamentosas corresponden a organismos pluricelulares en los que las células se disponen unidas formando filamentos, llamados hifas, que pueden ser hialinas (sin pigmento) o dematiáceas (pigmentadas); y estar septadas o ser cenocíticas. Estas hifas, crecen y se ramifican formando una estructura visible denominada micelio, existiendo simultáneamente un micelio vegetativo que penetra el sustrato para la obtención de nutrientes y un micelio aéreo usualmente productor de las estructuras reproductoras. La reproducción de los hongos puede ser de tipo asexual (anamorfo o mitospórico) y/o sexual (teleomorfo o meiospórico) tras la fusión de los núcleos de dos hifas compatibles. En cualquier caso, ambos propágulos presentan capacidad para desarrollar una nueva colonia. Sin embargo, debido a esta característica es común que un mismo hongo tenga dos nombres, al haberse descubierto y nombrado en distintos estados. No obstante, en muchos de ellos sólo se conoce la fase de reproducción asexual, ya sea porque no se han reproducido las condiciones óptimas para su desarrollo o porque ésta se ha perdido durante la evolución (de Hoog *et al.*, 2011).

A su vez, algunas especies fúngicas muestran dimorfismo, es decir, pueden presentar morfología levaduriforme y filamentosa en función de las características del medio en el que se desarrollan (temperatura, concentración de CO<sub>2</sub>, pH, etc.). Estos hongos se denominan dimórficos y entre las especies más comunes cabe destacar por su relevancia en clínica humana

*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*.

## **1.2. La infección fúngica**

Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza desde ecosistemas acuáticos hasta regiones áridas por lo que el ser humano se encuentra constantemente expuesto a propágulos de origen fúngico que adquiere principalmente por inhalación. Como resultado, se puede producir la eliminación del microorganismo o el desarrollo de una enfermedad en huéspedes susceptibles. Sólo una pequeña proporción de hongos tienen capacidad de desarrollar infecciones graves en el ser humano, los cuales se caracterizan por poseer factores de virulencia que les permiten colonizar, proliferar, invadir y destruir los tejidos del hospedador evadiendo las defensas mecánicas, celulares y humorales que la especie humana ha desarrollado a lo largo de la evolución. A pesar de esto, la mayoría de las infecciones fúngicas graves se desarrollan en personas que presentan algún fallo en los mecanismos de defensa, situación que facilita el establecimiento de la infección por parte de microorganismos referidos como “oportunistas” (Pirofski & Casadevall, 2002).

## **1.3. Tipos de micosis**

Las infecciones micóticas se pueden clasificar de acuerdo a los tejidos y órganos afectados. De acuerdo a este criterio, tradicionalmente, las micosis se han clasificado en superficiales, cutáneas, subcutáneas, profundas y sistémicas.

### **1.3.1. Micosis superficiales**

Son infecciones que se limitan al estrato córneo de la piel y el pelo, sin respuesta inmunitaria evidente ya que los agentes no penetran más allá del tejido inerte y por tanto no estimulan una respuesta inmunitaria detectable. Entre este tipo de infecciones se encuentran la piedra blanca (causada por *Trichosporon* spp.); piedra negra (*Piedraia hortae*); tiña negra (*Hortaea werneckii*); y la pitiriasis versicolor (*Malassezia* spp.).

### 1.3.2. Micosis cutáneas

Afectan capas más profundas de la epidermis además de sus anexos, pelos y uñas. Son las denominadas dermatomicosis, dentro de las cuales existen las ocasionadas por un grupo de hongos queratinofílicos, denominados dermatofitos, que incluyen a *Epidermophyton floccosum* y especies de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*. Sin embargo, la etiología de las dermatomicosis no se limita a este grupo de hongos, *Candida* spp., *Scopulariopsis brevicaulis* y *Neoscytalidium dimidiatum* pueden producir también infecciones cutáneas.

### 1.3.3. Micosis subcutáneas

Corresponden a infecciones que involucran la dermis y el tejido subcutáneo. Se desarrollan principalmente a partir de inoculación traumática, especialmente en extremidades, siendo comunes en trabajadores rurales de regiones tropicales o subtropicales. Las principales infecciones subcutáneas incluyen la esporotricosis (*Sporothrix* spp.); el eumicetoma (*Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea*, *Scedosporium boydii*, *Leptosphaeria senegalensis* y *Scedosporium apiospermum*); y la cromoblastomicosis (*Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora carrionii* y *Rhinocladiella aquaspersa*). Aunque menos comunes, otras infecciones que pueden desarrollarse subcutáneamente incluyen las mucormicosis (*Rhizopus oryzae*, *Mucor circinelloides*), la lobomicosis (*Lacazia loboi*), la candidiasis y la feohifomicosis (*Alternaria alternata*, *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Exophiala* spp., y *Pleurostomophora richarsidae*) (Pang *et al.*, 2004; La Hoz *et al.*, 2012).

### 1.3.4. Micosis profundas

Corresponden a aquellas infecciones que invaden un órgano o tejido interno ocasionando una infección localizada capaz o no de diseminarse por vía linfática y/o hemática. La infección se adquiere principalmente por inhalación de las esporas, iniciándose una infección pulmonar que según el estado inmunológico del paciente puede derivar en una infección sistémica. Aunque tradicionalmente se considera que las especies implicadas son *Blastomyces*

*dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Cryptococcus* spp., otros géneros como *Aspergillus*, *Scedosporium*, etc., son también agentes causales de este tipo de micosis (Rubio *et al.*, 2007).

### **1.3.5. Micosis sistémicas**

Corresponden a aquellas micosis que afectan a dos o más órganos no adyacentes. En pacientes inmunocompetentes se producen principalmente por hongos dimórficos (*Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis*). Endémicos de América, África y sudeste Asiático (de Hoog *et al.*, 2011) producen infección después de ser adquiridas por inhalación o inoculación traumática de elementos fúngicos. Sin embargo, las micosis sistémicas son más comunes en personas inmunocomprometidas, donde los agentes implicados corresponden en su mayoría a hongos oportunistas produciendo las denominadas micosis oportunistas.

#### **1.3.5.1. Micosis oportunistas**

Son infecciones producidas por microorganismos tradicionalmente considerados “no patógenos” o “poco virulentos”. Habitualmente tras el contacto, estos microorganismos son eliminados por el sistema inmune, pero cuando hay una alteración en la respuesta del huésped, o un desequilibrio en la microbiota, puede desarrollarse un cuadro clínico que, debido a las características del huésped, suele ser grave. En su mayoría, estas infecciones son producidas por especies de los géneros *Aspergillus* y *Candida*. Sin embargo, el incremento de la población con trastornos inmunitarios o metabólicos ha favorecido paralelamente un aumento en la frecuencia de infecciones oportunistas, la gravedad de las mismas y el número de especies implicadas. El uso de tratamientos inmunosupresores, procedimientos invasivos, terapias antibióticas y corticosteroides durante prolongados períodos de tiempo, si bien han supuesto un aumento en la calidad de vida de los pacientes, suponen un riesgo para la adquisición de enfermedades infecciosas por hongos oportunistas (Pappas *et al.*, 2009). La condición clínica de dichos pacientes hace que la etiología de estas infecciones sea de una extrema variabilidad y que

especies consideradas tradicionalmente saprofitas o comensales puedan dar lugar a procesos infecciosos graves.

Si bien la candidiasis, la aspergilosis, las mucormicosis y la criptococosis son las micosis oportunistas más frecuentes, otros hongos oportunistas menos comunes han aumentado su incidencia en las últimas décadas incluyendo levaduras distintas a *Candida albicans*, y hongos filamentosos hialinos como *Fusarium* u hongos dematiáceos, los cuales producen las denominadas feohifomicosis, que incluyen actualmente alrededor de 150 especies (Revankar & Sutton, 2010).

#### 1.3.5.1.1. *Candida*

*Candida* spp., es un comensal habitual de la epidermis y superficies mucosas oral digestiva y genital. Es capaz de producir un amplio espectro de enfermedades, desde infecciones mucocutáneas hasta enfermedades diseminadas. Constituye una de las principales causas de enfermedad sistémica con una tasa de mortalidad de hasta el 47% (Pappas *et al.*, 2009). Los principales factores de riesgo incluyen la neutropenia, el uso de antibióticos de amplio espectro, la implantación de prótesis y catéteres venosos centrales, la nutrición parenteral, el trasplante renal en pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos o los tratamientos con agentes inmunosupresores como glucocorticosteroides, quimioterapéuticos e inmunomoduladores (Pappas *et al.*, 2009).

Si bien se han descrito alrededor de 17 especies de *Candida* como agentes causales de candidiasis invasiva (CI), más del 90% de las infecciones son atribuidas a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, y *C. krusei*; siendo *C. albicans* la especie mayormente implicada (Pfaller & Diekema, 2007). Sin embargo, la incidencia de CI por especies distintas a *C. albicans* ha aumentado en las últimas décadas, representando en muchos casos la mitad o más de los aislamientos totales de *Candida* (Pemán *et al.*, 2011). Si bien muchas de estas especies exhiben una menor virulencia con respecto a *C. albicans* (Arendrup *et al.*, 2009), algunas presentan una sensibilidad menor a los antifúngicos, como es el caso de *C. guilliermondii* (Pfaller & Diekema, 2004; Pfaller *et al.*, 2006; Diekema *et al.*, 2009; Pfaller *et*

*al.*, 2011b). Esta especie, considerada actualmente un patógeno emergente, está ampliamente distribuida en la naturaleza y es responsable de una amplia gama de infecciones tales como onicomicosis, endocarditis, artritis, osteomielitis, periodontitis y enfermedad diseminada, representando entre 1 y 3% de los casos atribuidos a *Candida* y con una mayor prevalencia en América Latina (Pfaller *et al.*, 2006; 2010b). Entre los factores predisponentes asociados a la infección por *C. guilliermondii*, destacan la presencia de procesos hematológicos malignos (Savini *et al.*, 2011) y la exposición a antibióticos en pacientes neutropénicos que favorecen la colonización (Pfaller & Diekema, 2007). Si bien actualmente, frente a la sospecha de candidiasis diseminada, el tratamiento empírico recomendado consiste en la administración de caspofungina o micafungina; anfotericina B liposomal y anidulafungina se presentan como alternativas, mientras que el fluconazol está recomendado sólo cuando la sensibilidad está confirmada (Ullman *et al.*, 2012). No obstante, se han descrito casos de fallo terapéutico frente a anfotericina B (Dick *et al.*, 1985) y azoles (Tietz *et al.*, 1998; Macêdo *et al.*, 2010; Savini *et al.*, 2010).

Estudios *in vitro* han demostrado una menor susceptibilidad a fluconazol (Pfaller *et al.*, 2006), comparado a otras especies como *C. albicans*, mientras que itraconazol, voriconazol, posaconazol, anfotericina B y flucitosina parecen ser más efectivas. En el mismo sentido, las equinocandinas demuestran escasa actividad frente a *C. guilliermondii*, donde se observa que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para caspofungina, anidulafungina y micafungina suelen ser de 2 a 100 veces superiores que para otras especies de *Candida* (Diekema *et al.*, 2009).

#### **1.3.5.1.2. *Curvularia (Bipolaris)***

Las especies del género *Curvularia* corresponden a hongos dematiáceos, de distribución mundial, saprófitos del suelo y restos vegetales (Manamgoda *et al.*, 2012; de Hoog *et al.*, 2011). La ubicación taxonómica de este género ha sufrido importantes cambios. Según recientes estudios filogenéticos, algunas especies incluidas en el género *Bipolaris*, caracterizadas por tener conidios rectos, pequeños y septados, han sido reagrupadas dentro del género *Curvularia*.

Si bien *Curvularia* es conocido por ser un importante patógeno de plantas, algunas especies han sido descritas como agentes etiológicos de feohifomicosis en humanos (Manamgoda *et al.*, 2012), siendo las especies clínicas más relevantes *C. australiensis*, *C. spicifera*, *C. hawaiiensis*, *C. lunata* y *C. geniculata*. Los cuadros clínicos que presentan las infecciones por *Curvularia* incluyen la sinusitis alérgica crónica (Fryen *et al.*, 1999; Buzina *et al.*, 2003; Castelnuovo *et al.*, 2004; Taguchi *et al.*, 2007), enfermedad broncopulmonar alérgica (Dyer *et al.*, 2008; Chowdhary *et al.*, 2011), infecciones cutáneas (Moore *et al.*, 2001; Bilu *et al.*, 2004), queratomycosis (Saha & Das, 2005; Durkin *et al.*, 2008; Bashir *et al.*, 2009), peritonitis (Bava *et al.*, 2003; Pimentel *et al.*, 2005), infecciones del sistema nervioso central (Filizzola *et al.*, 2003; Revankar *et al.*, 2004; Viola & Sutton, 2010) e infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos y anecdóticamente en inmunocompetentes (Revankar *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2008). A pesar de ser poco comunes, el número de infecciones debido a estos hongos ha aumentado en los últimos años (el Khizzi *et al.*, 2010; da Cunha *et al.*, 2012) sin que se haya establecido un tratamiento de elección. Estudios realizados *in vitro* han demostrado una menor sensibilidad de *Curvularia* frente a fluconazol y flucitosina. Mientras que la anfotericina B, el posaconazol, el itraconazol, el voriconazol y las equinocandinas han mostrado buena actividad frente a estos hongos (da Cunha *et al.*, 2012). Sin embargo hay escasa experiencia clínica en el tratamiento de estas infecciones y no existen modelos *in vivo* que evalúen la eficacia de dichos fármacos.

#### **1.3.5.1.3. *Scopulariopsis***

Las especies del género *Scopulariopsis*, corresponden a un grupo de hongos ascomicetos que incluyen especies hialinas y dematiáceas. Tienen una amplia distribución geográfica como saprófitos del suelo, encontrándose comúnmente en papel, madera, materia orgánica en descomposición, estiércol y restos animales (de Hoog *et al.*, 2011). Sin embargo, algunas especies como *S. acremonium*, *S. brevicaulis*, *S. brumptii*, *S. candida* y las formas teleomórficas *Microascus cirrosus* y *Microascus cinereus* han sido reconocidas como agentes causales de infecciones en humanos (Iwen *et al.*, 2012), especialmente onicomycosis (Bonifaz *et*

*al.*, 2007; Issakainen *et al.*, 2007), queratomicosis (Ragge *et al.*, 1990; Malecha, 2004; Bunya *et al.*, 2007) y otras infecciones localizadas (Hart *et al.*, 2001; Issakainen *et al.*, 2010). Si bien las infecciones invasivas son raras (Miossec *et al.*, 2011; Iwen *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012) pueden producirse en pacientes inmunodeprimidos y raramente en inmunocompetentes y están asociadas a una elevada mortalidad. Estudios *in vitro* revelan una limitada actividad de los antifúngicos actualmente disponibles frente a estos hongos (Aguilar *et al.*, 1999; Cuenca-Estrella *et al.*, 2006, Carrillo-Muñoz *et al.*, 2008; Sandoval-Denis *et al.*, 2013).

#### **1.4. Compuestos antifúngicos**

Los antifúngicos o antimicóticos incluyen sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción, capaces de alterar el metabolismo y las estructuras de la célula fúngica impidiendo su crecimiento o alterando su viabilidad (Odds *et al.*, 2003). Los compuestos antifúngicos disponibles son derivados de productos naturales, de la actividad metabólica de algunos microorganismos o de síntesis química, presentando entre ellos diferencias en su eficacia, espectro de acción y tolerabilidad. Sin embargo, las altas tasas de morbilidad, mortalidad y los elevados costes sanitarios asociados al tratamiento de las infecciones fúngicas han impulsado el desarrollo de nuevos antifúngicos y estrategias terapéuticas.

Las primeras sustancias utilizadas fueron metales pesados, como el yoduro potásico. Durante la década de los 50' aparecieron de los primeros fármacos antifúngicos como la griseofulvina, la nistatina, la anfotericina B y la flucitosina. Posteriormente se desarrollaron los primeros azoles. En la década de los 90' se incorporaron los triazoles, las alilaminas y se desarrollaron formulaciones lipídicas de polienos que permiten administrar dosis elevadas con una menor toxicidad. Ya en las últimas décadas aparecieron nuevos azoles y se introdujo el grupo de las equinocandinas. (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999; Allevato *et al.*, 2007).



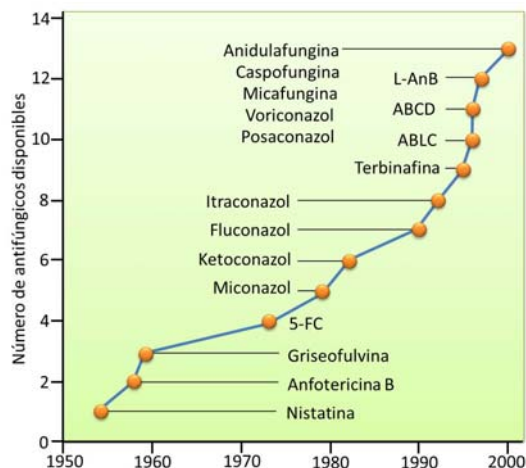


Figura 1. Evolución del desarrollo de los antifúngicos desde 1950 hasta el año 2000 (adaptado de Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010).

### 1.4.1. Polienos

Sintetizados por especies de *Streptomyces*, su mecanismo de acción se basa en su unión al ergosterol, el principal esteroide de la membrana fúngica. Como consecuencia, se generan canales que alteran su permeabilidad, produciendo la pérdida de cationes, proteínas, glúcidos y metabolitos, con la consiguiente muerte celular. Se caracterizan por su baja biodisponibilidad digestiva, lo que impide la administración oral; tienen una baja solubilidad en agua y una alta nefrotoxicidad (Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009). Las sustancias más representativas son la nistatina y la anfotericina B (Baginski *et al.*, 1997; Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010).

#### 1.4.1.1. Anfotericina B

Aislada por primera vez en 1955 a partir de *Streptomyces nodosus* en Venezuela (Oura *et al.*, 1955), y comercializada como anfotericina B desoxicolato (Fungizona®). Debido a su efectividad frente a un amplio espectro de hongos patógenos y parásitos, se convirtió en el tratamiento de elección frente a infecciones fúngicas diseminadas y leishmaniasis visceral, debido esencialmente a la falta de alternativas terapéuticas. Aunque actualmente continúa siendo uno de los principales tratamientos en caso de infección fúngica diseminada, su aplicación está limitada por su alta nefrotoxicidad, además de la necesidad de hospitalización

para su administración (Wingard *et al.*, 1999; Kleinberg *et al.*, 2006). A pesar de ser un antifúngico con actividad sobre un gran número de especies fúngicas, se ha detectado la aparición de resistencias, especialmente en hongos filamentosos (Sokol-Anderson *et al.*, 1986; Blum *et al.*, 2008; Espinel-Ingroff, 2008). Para reducir la toxicidad se han desarrollado nuevas formulaciones lipídicas de anfotericina B (Abelcet®, Amphocil® y Ambisome®), ofreciendo la posibilidad de administrar dosis mucho más elevadas minimizando los efectos adversos y de toxicidad. El uso de formulaciones lipídicas en el tratamiento de las infecciones diseminadas se ha asociado a una disminución de la mortalidad (Barrett *et al.*, 2003).

#### **1.4.2. Azoles**

Constituyen una de las familias de antifúngicos más exitosas con más derivados en uso clínico, además de una gran diversidad de espectros de actividad, potencia y toxicidad. Sin embargo muchos de ellos sólo son de uso tópico, debido a su toxicidad o biodisponibilidad. Los antifúngicos disponibles para uso clínico, en caso de enfermedad invasiva: fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol; constituyen el avance más importante de los últimos años para el tratamiento de las micosis sistémicas oportunistas.

El primer azol, el benzimidazol, fue descrito en 1944, y los primeros azoles usados en clínica fueron el miconazol, el clotrimazol y el econazol, a principios de los 70'. Posteriormente aparecieron otros azoles como el ketoconazol, el primer azol activo por vía oral, seguido por otros como fluconazol, itraconazol, isoconazol, flutrimazol, omoconazol, sertaconazol, flutrimazol, lanconazol, terconazol, voriconazol, isavuconazol, ravuconazol, albaconazol y posaconazol (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999). Estas moléculas sintéticas, actúan inhibiendo la actividad del citocromo fúngico P450, también denominado lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa (en levaduras) o CYP51 (en filamentosos), que cataliza la eliminación del grupo 14-metilo del lanosterol, impidiendo la posterior síntesis de ergosterol, alterando así su permeabilidad e induciendo la acumulación de compuestos no desmetilados que inhiben el crecimiento de los hongos (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010).

En función de su estructura, estas moléculas sintéticas se dividen en imidazoles: clotrimazol, miconazol, ketoconazol; y triazoles: fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol y posaconazol. Si bien la introducción de los azoles ha representado un importante avance para el tratamiento de infecciones fúngicas, la continua exposición, ha favorecido la aparición de organismos resistentes. Los mecanismos de resistencia mejor conocidos son aquellos presentes en *Candida* spp., y *Aspergillus* spp., entre los que se han descrito la activación de sistemas de bombeo en la membrana que disminuyen la concentración de antifúngico intracelular, modificaciones en la enzima diana por mutaciones en los genes codificantes (*ERG11*, *Cyp51A*), y el desarrollo de vías de derivación para la síntesis del ergosterol, que invalidan los efectos de los azoles sobre la membrana (gen *ERG3*) (Pemán *et al.*, 2009; Pfaller, 2012).

#### **1.4.2.1. Fluconazol**

Soluble en agua, se encuentra disponible por vía intravenosa y oral. Tiene actividad frente a levaduras, pero carece de acción frente a hongos filamentosos. Algunas especies de *Candida* no *albicans* como, *C. glabrata* y *C. krusei*, muestran resistencia intrínseca (Allevato *et al.*, 2007; Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Pfaller *et al.*, 2010b).

#### **1.4.2.2. Itraconazol**

Esta molécula insoluble en agua presenta una absorción irregular por vía oral. Sin embargo, tiene un mayor espectro de actividad, siendo activo frente a levaduras, *Aspergillus* y otros hongos filamentosos (Allevato *et al.*, 2007; Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Zaragoza & Pemán, 2012).

#### **1.4.2.3. Voriconazol**

Primer triazol aprobado para el tratamiento de la aspergilosis invasiva, infecciones por *Candida* resistentes a fluconazol y tratamiento de infecciones por *Fusarium* y *Scedosporium*. Disponible en formulación intravenosa y oral. Se une a proteínas plasmáticas en un menor

porcentaje que el itraconazol (45-60%) y atraviesa la barrera hematoencefálica (McGinnis *et al.*, 1998; Espinel-Ingroff, 2001; Allevato *et al.*, 2007; Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Zaragoza & Pemán, 2012).

#### **1.4.2.4. Posaconazol**

Triazol de amplio espectro de uso exclusivo por vía oral, tiene una importante actividad frente a una gran variedad de hongos, entre ellos levaduras, hongos filamentosos, incluyendo Mucorales e incluso protozoos. Ha demostrado ser eficaz en infecciones diseminadas, incluso aquellas refractarias a otros antifúngicos (Urbina *et al.*, 1998; Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999; Allevato *et al.*, 2007; Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Paniz *et al.*, 2011).

#### **1.4.3. Equinocandinas**

Estos lipopéptidos corresponden a una nueva clase de antifúngicos que actúan mediante la inhibición no competitiva de la (1→3)-β-glucano sintetasa, que permite la síntesis de β-1,3-D-glucano, esencial en la estructura de la pared de la célula fúngica. La inactivación de la enzima resulta en la formación de paredes celulares defectuosas produciendo inestabilidad osmótica y la ruptura de la célula en el caso de las levaduras o la formación de hifas aberrantes en hongos filamentosos. No se absorben por vía oral, existiendo sólo formulaciones parenterales. A diferencia de los azoles y los polienos, no afectan a las células de mamíferos ya que el 1,3 β-D glucano no está presente en las células animales lo que explica su baja toxicidad (Pontón, 2008), asociándose a un mejor pronóstico (Ortega *et al.*, 2008). Parecen, sin embargo, no ser activas frente a *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Scedosporium* ni a especies del orden Mucorales.

Se ha reportado resistencia a las equinocandinas, siendo el mecanismo más estudiado la mutación del gen *FKS* que codifica para la enzima 1,3-β-D-glucano sintetasa (Pemán *et al.*, 2009; Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Pfaller, 2012).

#### **1.4.3.1. Caspofungina**

La primera equinocandina comercializada, es sintetizada a partir de *Glarea lozoyensis*. Diversos estudios han corroborado su eficacia frente a *Candida*, siendo tan efectiva como anfotericina B liposomal (Walsh *et al.*, 2004); y *Aspergillus* spp., incluso en casos refractarios a azoles y polienos (Allevato *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2008; Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Zaragoza & Pemán, 2012).

#### **1.4.3.2. Anidulafungina**

Obtenida a partir de *Aspergillus nidulans*, presenta la ventaja de degradarse en el plasma por proteasas, eludiendo las interacciones con fármacos de metabolización hepática y la posible toxicidad. Muestra gran actividad frente a *Aspergillus* spp., y *Candida* spp., (Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Zaragoza & Pemán, 2012).

#### **1.4.3.3. Micafungina**

Derivada del hongo *Coleophoma empetri*, es efectiva frente a *Candida* spp., demostrando en ensayos clínicos, ser tan eficaz como anfotericina B liposomal (Kuse *et al.*, 2007; Queiroz-Telles *et al.*, 2008). Por su parte estudios *in vitro* han reportado actividad frente a *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis* (Nakai *et al.*, 2003; Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009; Zaragoza & Pemán, 2012).

#### **1.4.4. Flucitosina**

La 5-fluorocitosina o flucitosina, corresponde a una pirimidina fluorada, que actúa inhibiendo la síntesis de ADN y ARN en la célula fúngica impidiendo así el crecimiento y reproducción de los hongos. La flucitosina entra en la membrana fúngica gracias a la enzima, citosina permeasa, que no está presente en la célula de mamíferos. Al penetrar en la célula fúngica es fosforilada e incorporada al ARN, convirtiéndose en un dexosinucleotido, que inhibe la síntesis de proteínas de la célula. Por otra parte, puede inhibir la enzima que permite el paso de uridina a timidina (timidilato sintetasa), afectando la síntesis de ADN. Su espectro se reduce

a levaduras y es inactivo frente a hongos filamentosos. Pueden aparecer efectos secundarios a su administración describiéndose toxicidad hepática, eosinofilia y exantema. Sin embargo, presenta sinergismo con polienos como la anfotericina B y drogas azólicas como ketoconazol y fluconazol, por lo que su combinación permite reducir la dosis de éstos disminuyendo así los efectos tóxicos. Aunque este fármaco es muy nocivo para la célula micótica, tiene el inconveniente de generar rápidamente resistencia secundaria; mutando determinadas enzimas, como la citosina permeasa, cuya mutación impide la entrada del antifúngico; o la uridina monofosfato pirofosforilasa que forma parte de la vía de modificaciones que sufre el fármaco en la célula (Allevato *et al.*, 2007; Pemán *et al.*, 2009; Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009).

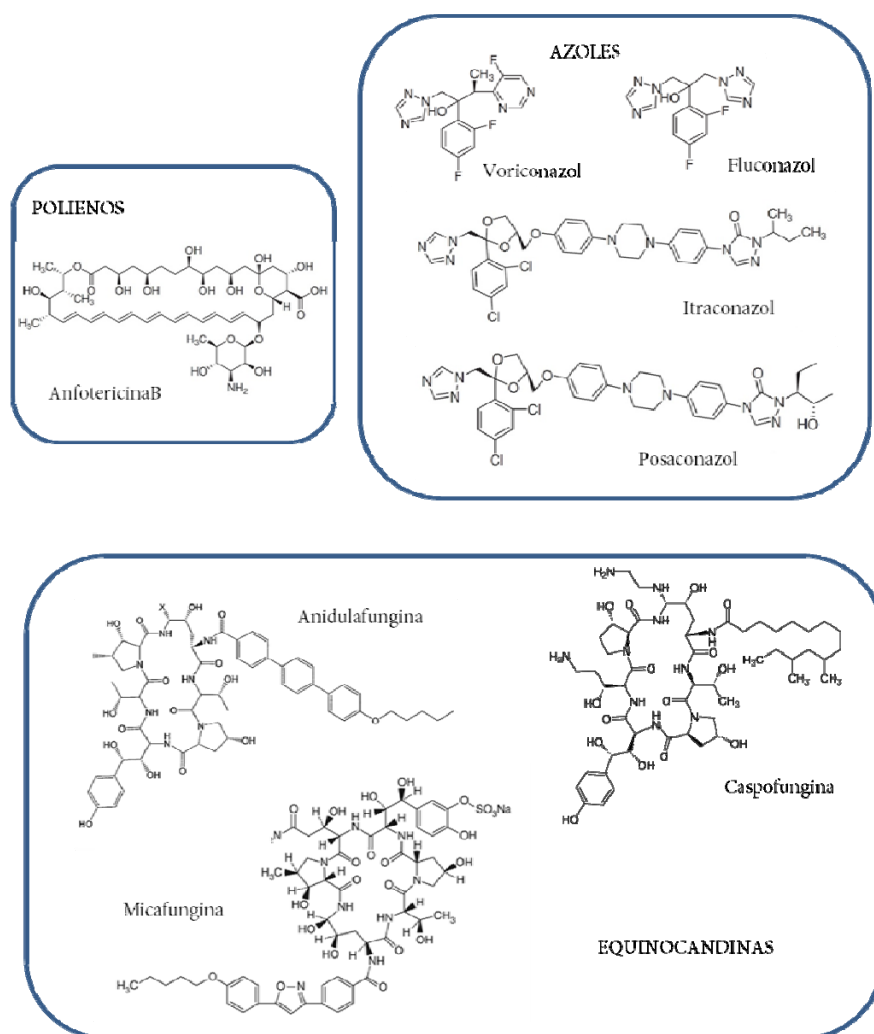


Figura 2. Estructura química de los principales antifúngicos utilizados en clínica.

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

La griseofulvina interrumpe el huso mitótico e interfiere con los microtúbulos deteniendo el crecimiento de la célula en la fase de mitosis. Es activa frente a *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp., y *Epidermophyton* spp., siendo indicada en las tiñas de cuero cabelludo, cuerpo y uñas. Sin embargo, comparado con otros antifúngicos como el itraconazol y la terbinafina, es menos eficaz, además de presentar una mayor toxicidad y efectos secundarios (Allevato *et al.*, 2007).

Las alilaminas bloquean la ruta biosintética del ergosterol al inhibir la oxidación del escualeno a 2,3-escualeno epóxido por alteración de la enzima escualeno epoxidasa. La acumulación de escualeno citoplasmático, que es tóxico, más la reducción de ergosterol, que hace permeable a la célula, tienen un efecto fungicida y puesto que no interactúan con el citocromo P-450, no afectan la síntesis de prostaglandinas ni hormonas esteroideas, lo que constituye una ventaja sobre los azoles. Se han sintetizado diferentes sustancias activas siendo las más conocidas la naftifina y la terbinafina, activa frente a dermatofitosis, candidiasis cutánea y pitiriasis versicolor (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1998; Allevato *et al.*, 2007).

#### **1.5. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro***

El aumento de las infecciones fúngicas invasivas, la aparición de nuevos antifúngicos y el reconocimiento de la resistencia antifúngica como un problema de importancia clínica, han derivado en la necesidad de desarrollar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos que sean reproducibles y predictivos de éxito terapéutico. Actualmente dos instituciones, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) han desarrollado métodos estandarizados para evaluar la sensibilidad antifúngica de levaduras como *Candida*, *Cryptococcus* y hongos filamentosos por microdilución en caldo (CLSI, 2008a, b; Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008a, b). A su vez el CLSI ha estandarizado un método simple y económico de disco difusión en agar para levaduras (CLSI, 2008c) y hongos filamentosos (CLSI, 2009). Mediante estas técnicas se obtiene la CMI que corresponde a la mínima concentración de antifúngico capaz de inhibir el crecimiento del

hongo. Si bien, ambos métodos poseen diferencias, diversos estudios han demostrado una gran correlación en los resultados de CMI obtenidos con ambas técnicas de microdilución, aunque con ligeras variaciones en el caso de las equinocandinas y azoles frente a *Candida* spp. (Pfaller *et al.*, 2010a, 2011c) y *Aspergillus* spp., respectivamente (Pfaller *et al.*, 2011a). Ambos métodos han demostrado proveer resultados clínicamente útiles y ser capaces de discriminar entre cepas sensibles y resistentes (Johnson, 2008; Lass-Flörl *et al.*, 2010; Pfaller, 2012).

Se han desarrollado a su vez, diversos métodos comerciales para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, entre los cuales podemos mencionar el Sensititre YeastOne, Vitek y el Etest, los cuales presentan modificaciones de los métodos anteriormente descritos, mostrando distintas características de facilidad de uso, estandarización y rapidez de resultados (Johnson, 2008; Lass-Flörl *et al.*, 2010; Pfaller, 2012).

Los ensayos *in vitro* han demostrado su importancia para determinar el potencial valor terapéutico de un nuevo agente antifúngico (Espinel-Ingroff, 1994) siendo esenciales para la elección del fármaco y la vigilancia de la aparición de resistencias, proveyendo una gran ayuda para optimizar la eficacia de la terapia antifúngica (Johnson, 2008; Lass-Flörl *et al.*, 2010; Pfaller, 2012). Una de las mayores utilidades es el establecimiento de puntos de corte clínico, basados en el análisis de la distribución de las CMI y su relación con la eficacia en clínica humana. No obstante, debido a la baja incidencia de infecciones fúngicas oportunistas y la escasez de datos *in vitro* disponibles para muchas especies de hongos oportunistas no ha sido posible determinar puntos de corte clínicos con precisión.

## **1.6. Modelos animales para la determinación de la eficacia de los antifúngicos**

Si bien los estudios *in vitro* pueden aportar información acerca de los patrones de resistencia y sensibilidad de las cepas a ensayar, es necesario establecer si existe una correlación con la práctica clínica. En el caso de especies menos comunes, la escasa experiencia clínica impide el establecimiento de un tratamiento de elección. Ante tal limitación, los modelos



animales son herramientas invaluableles para realizar estudios sobre la patogénesis de las infecciones fúngicas y la evaluación de la eficacia terapéutica. La mayor ventaja del trabajo experimental en animales es la posibilidad de controlar diferentes variables en un número de ensayos suficientes para obtener datos estadísticamente válidos (Capilla *et al.*, 2007). Los datos obtenidos a partir de los estudios realizados en modelos animales han demostrado ser predictores útiles de posteriores resultados clínicos en humanos, en términos de eficacia, cinética y toxicidad (Guarro, 2011). Para ello el modelo animal de infección debe reproducir el cuadro clínico con la mayor fidelidad posible. En este sentido, diversos modelos *in vivo* han sido desarrollados, mayoritariamente en roedores y particularmente en ratones, debido a su relativa similitud anatómica e inmunológica a los humanos, menor costo, facilidad de manejo, la disponibilidad de cepas genéticamente definidas para análisis y modelos de infección reproducibles (Clemons & Stevens, 2005; Capilla, *et al.*, 2007).

### **1.7. Importancia de las técnicas moleculares en el diagnóstico de las micosis**

El número de especies fúngicas causantes de infecciones oportunistas ha crecido continuamente en los últimos años y en consecuencia el grado de dificultad en su identificación mediante técnicas convencionales, sobre todo en el caso de especies crípticas. Un claro ejemplo lo constituye el caso de dos especies recientemente descritas, *Candida bracarensis* (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005) y *Candida nivariensis* (Correia *et al.*, 2006) que forman parte del complejo *C. glabrata* y que debido a su gran similitud fenotípica son difíciles de identificar usando métodos convencionales. Su incorrecta identificación puede condicionar el tratamiento de los pacientes debido a la menor susceptibilidad de *C. nivariensis* al fluconazol.

Entre los sistemas comerciales disponibles, destaca el CHROMagar Candida, un medio selectivo y diferencial que permite la detección directa de las especies de *Candida* de mayor relevancia clínica, tales como *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* a partir de la placa de aislamiento (Odds & Bernaerts, 1994). Otros métodos como los sistemas API (Analytical Profile Index) y VITEK constan de paneles que contienen diferentes sustratos deshidratados para pruebas bioquímicas y/o enzimáticas. Más recientemente se han desarrollado sistemas de

identificación como MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry), el cual se basa en la detección de moléculas, especialmente proteínas. Ésta técnica ha demostrado ser rápida y fiable para la identificación de organismos, especialmente los de crecimiento lento, difíciles de diferenciar mediante métodos fenotípicos convencionales.

A pesar del desarrollo de estos sistemas, no todas las especies fúngicas pueden ser identificadas debido a bases de datos limitadas sólo a aquellas especies más comunes o a la ausencia de una adecuada referencia, situación que requiere el uso de pruebas complementarias (Marklein *et al.*, 2009; Iriart *et al.*, 2012).

La secuenciación de diferentes regiones del ADN ribosomal, ha mostrado ser una herramienta efectiva. Diversos estudios señalan su gran capacidad para definir a nivel de especie una amplia variedad de hongos en un tiempo reducido, cuya identificación convencional no sería posible (Unda *et al.*, 2011; Pfaller *et al.*, 2012). Debido a las claras ventajas que presenta esta última técnica, todos los aislados utilizados en la presente tesis fueron identificados mediante métodos convencionales complementados con técnicas de secuenciación.



## **2. OBJETO E INTERÉS**



## 2. Objeto e interés del trabajo

Las micosis invasoras producidas por hongos oportunistas presentan una alta morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, a pesar del tratamiento quirúrgico y la terapia antifúngica disponible. Aunque en su mayoría estas infecciones son producidas por especies de *Candida* y *Aspergillus*, se ha observado un aumento importante en la incidencia de otras especies cuyo diagnóstico y tratamiento están muy poco estudiados. La identificación de muchas de estas especies mediante técnicas convencionales es poco fiable debido a que la taxonomía de algunas especies de *Candida* es especialmente compleja por su similitud fenotípica y a las limitadas bases de datos asociadas a muchos de los métodos automatizados que se utilizan en los laboratorios clínicos. Ello nos permitió plantear los siguientes objetivos

- Identificar molecularmente las cepas de levaduras utilizadas en los diferentes estudios.
- Correlacionar la identificación fenotípica versus molecular de cepas de origen clínico pertenecientes a *Candida no albicans*.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman el complejo *C. rugosa*.
- Detectar, mediante un estudio polifásico, la existencia de posibles especies crípticas dentro del complejo *C. rugosa*.

Las especies del género *Candida* constituyen la primera causa de infección nosocomial oportunista causada por hongos, siendo *C. albicans* la especie mayormente implicada. Sin embargo, se ha reportado el aumento de la incidencia de especies no albicans, como es el caso de *C. guilliermondii*, caracterizada por una menor sensibilidad frente a fluconazol y las equinocandinas, estas últimas recomendadas en primera instancia para tratamiento de las candidiasis sistémica. Debido a la limitada información disponible, otros de los objetivos de esta tesis serían:

- Evaluar mediante los métodos de microdilución y curvas de mortalidad, la actividad *in vitro* de la anidulafungina, el fluconazol y la anfotericina B, frente a aislados de *C. guilliermondii*.
- Evaluar la eficacia de anidulafungina, fluconazol, anfotericina B desoxicolato y anfotericina B liposomal en el tratamiento de la infección diseminada por *C. guilliermondii* en ratones neutropénicos.

Asimismo, conviene destacar también la importancia de las micosis invasoras por hongos filamentosos emergentes. Entre ellos algunos géneros de hongos pigmentados como *Curvularia*, uno de los principales agentes de sinusitis fúngica alérgica, han sido descritos como agentes causales de infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes. Estudios *in vitro* han demostrado que dichos hongos presentan una menor sensibilidad a anfotericina B, pero responden bien a posaconazol y al voriconazol. La frecuencia de infecciones por *Curvularia* ha aumentado en los últimos años, asociada a una elevada mortalidad. En este contexto, nuestros objetivos han sido:

- Desarrollar un modelo de sinusitis en rata, con cada una de las dos especies de *Curvularia* más comunes en clínica, *C. spicifera* y *C. hawaiiensis*, para evaluar y comparar la virulencia de estas especies, así como poder ensayar potenciales tratamientos.
- Desarrollar un modelo de infección diseminada para cada una de las especies de *Curvularia* anteriormente citadas en ratón neutropénico que permita evaluar y comparar la virulencia de dichas especies.
- Utilizando el modelo previamente desarrollado, evaluar la eficacia *in vivo* de posaconazol, voriconazol y anfotericina B.

El hongo *Scopulariopsis*, a pesar de su limitada incidencia clínica, destaca por su menor sensibilidad a anfotericina B, la flucitosina, la terbinafina, los azoles y la caspofungina, reportándose una alta mortalidad en los casos de infección por dicho hongo en pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes. Actualmente no existe un consenso sobre el tratamiento antifúngico más adecuado frente a las especies de dicho género, por ello nuestro objetivo ha sido:

- Desarrollar un modelo experimental de infección diseminada para dos de las especies más relevantes en clínica i.e., *S. brevicaulis* y *S. brumptii*, en ratón neutropénico para evaluar y comparar la virulencia de estas especies.
- Utilizando el modelo desarrollado, evaluar la eficacia *in vivo* de posaconazol, voriconazol y anfotericina B liposomal.





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Origen y conservación de los aislados**

Las cepas fúngicas incluidas en la presente Tesis Doctoral fueron facilitadas por el Fungus Testing Laboratory del Department of Pathology de la University of Texas Health Science Center (UTHSC), San Antonio, Texas, Estados Unidos. Los aislados se encuentran conservados en la colección de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus (FMR) en tubos de agar inclinado cubiertos con vaselina, en tacos de agar de 5 mm<sup>3</sup> sumergidos en agua destilada estéril y liofilizados. Para realizar el trabajo experimental, las cepas fueron sembradas en placas de agar patata dextrosa (APD) (Pronadisa, Madrid, España), agar avena o patata-zanahoria, e incubadas a la temperatura y durante el tiempo adecuados para cada especie.

#### **3.2. Estudios taxonómicos**

##### **3.2.1. Cepas**

Se analizaron un total 46 cepas de *Candida* spp. (Tabla 6). La conservación de los aislados se realizó según la metodología descrita en el apartado 3.1. Las cepas de interés fueron depositadas en la Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) de Utrecht.

##### **3.2.2. Caracterización fenotípica de los aislados**

Consistió principalmente en el estudio morfológico y fisiológico de los aislados pertenecientes al complejo *C. rugosa* siguiendo los métodos y criterios descritos por Yarrow (1998).

###### **3.2.2.1. Morfología**

La caracterización macroscópica de las colonias del complejo *C. rugosa*, se realizó en APD a las 48 h de incubación, se determinó el diámetro, color, textura, superficie y bordes de las mismas. Se determinó el rango de crecimiento en agar Sabouraud (Bio-Rad, Marnes-

LaCoquette, France) a 30 °C, 37 °C y 45 °C. y además se evaluaron sus características morfológicas en medio líquido compuesto de extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD).

Para la descripción microscópica de las levaduras se realizó un montaje directo realizando preparaciones con azul de lactofenol (Panreac, España) a partir del cultivo de las cepas en caldo YPD. Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio de campo claro (Olympus CH2) describiendo la morfología celular, tipo de agrupación y tamaño. Las microfotografías fueron obtenidas con un microscopio Zeiss Axio-Imager M1, usando objetivos de campo claro, contraste de fase y contraste diferencial Nomarski. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital acoplada (Olympus DP10) y procesadas utilizando el programa Analysis (Soft Imaging System GMBH, Alemania).

#### **3.2.2.2. Estudios fisiológicos**

Las pruebas fisiológicas para la caracterización de levaduras fueron realizadas según Yarrow (1998). Se determinó la asimilación de las siguientes fuentes de carbono: glucosa, D-xilosa, melibiosa, L-arabinosa, D-ribosa, L-sorbose, galactosa, salicina, rafinosa, sacarosa, D-manitol, trehalosa, glicerol, 2-ceto-D-gluconato, ribitol, xilitol, inositol, sorbitol,  $\alpha$ -metil-D-glucosido, N-acetil-D-glucosamina, celobiosa, lactosa, maltosa, melecitosa y ácido cítrico utilizando el medio base de nitrógeno (Becton Dickinson Co., Maryland, E.E.U.U.). El medio de cultivo para los controles negativos únicamente contenía medio base. Se evaluó además la hidrólisis de la urea y de la esculina y se realizaron ensayos de tolerancia a diferentes concentraciones de cicloheximida (0.1% y 0.01%).

Los inóculos fueron preparados a partir de cepas del complejo *C. rugosa* sembradas en placas de PDA durante 48 h, suspendiendo 3-4 colonias en solución salina estéril. Las suspensiones fueron ajustadas con un patrón McFarland nº 2 (bioMérieux, Inc. Durham, EEUU). Se evaluó a su vez la formación de tubo germinativo, clamidosporas y ascosporas. Adicionalmente las levaduras fueron sembradas en Chromagar Candida (Chromagar Company, Paris, Francia) y API ID 20C (bioMérieux SA, Lyon, Francia), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **3.2.3. Caracterización molecular de los aislados**

#### **3.2.3.1. Extracción de ADN**

El ADN se extrajo directamente a partir de las colonias de un cultivo puro, sembradas durante 24 h a 28 °C en PDA, mediante el kit PrepMan Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA., EE UU). Siguiendo las indicaciones del fabricante se suspendió una colonia en 100 µL de reactivo PrepMan Ultra para su posterior homogenización mediante agitación. Tras 10 minutos a 100 °C, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 2 minutos y posteriormente fueron centrifugadas durante 7 minutos a 13.000 r.p.m. El ADN quedaba así en el sobrenadante que fue colectado y guardado en tubos para su cuantificación y valoración de la pureza mediante el espectofotómetro GeneQuantPro (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra).

#### **3.2.3.2. Amplificación del dominio D1/D2 y de la región ITS**

Para la amplificación mediante PCR del gen 5.8S del ARN ribosomal y sus espaciadores intergénicos (región ITS) se utilizaron los cebadores ITS5/ITS4 y los cebadores NL1/NL4 para los dominios D1/D2 del gen 28S del ARN ribosomal (Tabla 1), siguiendo los protocolos descritos por Cano *et al.* (2004) y Gilgado *et al.* (2005) respectivamente. La amplificación se realizó en un volumen final de 40 µl que contenía de 20 a 60 ng de ADN genómico, tampón 10X PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl), 10 µM de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, dNTP 0.2 µM de cada nucleótido (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), y 5 U ADN ampliTaQ polimerasa (Roche, Estados Unidos) y agua miliq estéril hasta completar el volumen indicado.

El programa de amplificación consistió en una predesnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación (a 53 °C y 51 °C por 1 min respectivamente) y extensión a 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 7 min.

Tabla 1. Cebadores y secuencias de los mismos utilizados en el estudio molecular.

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

### 3.2.3.3. Comprobación y purificación del producto amplificado

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (agarose MP; Boehringer-Mannheim, Alemania). Para la verificar el tamaño de los amplificados se añadió, en el primer y último pocillo de cada gel, un marcador de peso molecular, 100 pb Ladder (Invitrogen, Groningen, Países Bajos). Posteriormente, el producto de PCR fue purificado con el kit comercial Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (General Electric Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. En un tubo, se dispensaban 500 µL de *Capture buffer* tipo 3, más 100 µL de producto de PCR, esta mezcla se colocaba en una columna GFX Microspin™ y se centrifugaba por 30 s a 13000 rpm. Posteriormente se descartaba el sobrenadante y se añadían 500 µl de *Wash buffer* tipo 1, se centrifugaba 30 s a 13000 rpm, se descartaba el tubo de recolección y se traspasaba la columna GFX Microspin™ a otro tubo. Se añadían 50 µl de *Elution buffer* tipo 4, sobre la superficie de la columna, dejando a temperatura ambiente por 1 min y a continuación se centrifugaba durante 1 min a 13000 rpm. El filtrado recuperado, se almacenaba a -20 °C hasta su utilización.

#### **3.2.3.4. Secuenciación de los productos de PCR**

Se utilizaron los mismos cebadores empleados para la amplificación (Tabla 1). La secuenciación fue realizada por Macrogen Europe Inc., (Amsterdam, Países Bajos) con el analizador 3730XL DNA (Applied Biosystems).

#### **3.2.3.5. Obtención de la secuencia consenso e identificación molecular de los aislados**

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

#### **3.2.3.6. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético**

Las secuencias generadas se alinearon utilizando el programa de alineamiento múltiple ClustalX, version 1.81 (Thompson *et al.*, 1997). Los alineamientos se corrigieron manualmente mediante el procesador de textos Microsoft Word 2010.

Para el análisis filogenético se utilizó el programa MEGA 5.0 (Tamura K, *et al.* 2011) mediante el método de *Maximum Likelihood* (ML) y el modelo de sustitución *General-Time-Reversible* (GTR); para determinar el soporte de las ramas generadas se utilizó el test de bootstrap con 1000 repeticiones.

#### **3.2.3.7. Depósito y obtención de secuencias a partir de bases de datos internacionales**

Las secuencias generadas en la presente tesis se depositaron en el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) ([www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html](http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html)). Otras secuencias empleadas fueron obtenidas desde la base de datos GenBank del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



### 3.3. Estudios *in vitro*

#### 3.3.1 Cepas

Fueron ensayadas un total de 28 cepas de diferentes orígenes, correspondientes a 5 especies de *Candida* tal como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas incluidas en los estudios *in vitro*.

| <b>Especie</b>                | <b>Aislado</b> | <b>Origen</b>         |
|-------------------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Candida rugosa</i>         | UTHSC 01-2568  | Dedo del pie          |
|                               | UTHSC 05-1919  | Tobillo               |
|                               | UTHSC 06-3729  | Oído                  |
|                               | UTHSC 06-3931  | Heces                 |
|                               | UTHSC 06-3976  | Esputo                |
|                               | UTHSC 09-1289  | Delfín                |
|                               | UTHSC 09-1402  | Hemocultivo           |
| <i>Candida mesorugosa</i>     | UTHSC R-3412   | Desconocido           |
|                               | UTHSC 05-205   | Hemocultivo           |
|                               | UTHSC 05-646   | Drenaje Jackson-Pratt |
| <i>Candida pararugosa</i>     | UTHSC 03-344   | Lavado broncoalveolar |
|                               | UTHSC 03-1143  | Hemocultivo           |
|                               | UTHSC 04-1051  | Hemocultivo           |
|                               | UTHSC 05-1693  | Lavado broncoalveolar |
|                               | UTHSC 06-538   | Hemocultivo           |
|                               | UTHSC 07-2797  | Hemocultivo           |
|                               | UTHSC 07-3133  | Hemocultivo           |
|                               | UTHSC 08-442   | Orina                 |
|                               | UTHSC 09-2953  | Vaginal               |
|                               | UTHSC 10-2648  | Hemocultivo           |
| <i>Candida pseudorugosa</i>   | UTHSC 06-3641  | Orina                 |
|                               | UTHSC 08-707   | Rodilla               |
| <i>Candida neorugosa</i>      | UTHSC 10-2054  | Pierna                |
|                               | UTHSC 10-121   | Pata de caballo       |
| <i>Candida guilliermondii</i> | UTHSC 11-142   | Desconocido           |
|                               | UTHSC 10-499   | Desconocido           |
|                               | UTHSC 11-685   | Desconocido           |
|                               | UTHSC 10-3207  | Desconocido           |

UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, E.E.U.U.

### 3.3.2. Agentes antifúngicos

Los antifúngicos utilizados en los estudios *in vitro* fueron: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, micafungina, caspofungina y anidulafungina (Tabla 3) los cuales fueron obtenidos en forma de polvo con una pureza entre el 80 y el 100%.

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

| Antifúngicos                | Procedencia                                      | Pureza | Disolvente |
|-----------------------------|--|--------|------------|
| Anfotericina B <sup>b</sup> | Sigma-Aldrich Co. St. Louis. E.E.U.U.            | 80%    | DMSO       |
| Fluconazol                  | Pfizer Inc., Madrid, España                      | 82.4%  | Agua       |
| Itraconazol                 | Janssen Pharmaceutical, Madrid, España           | 100%   | DMSO       |
| Voriconazol <sup>a</sup>    | Pfizer Inc., Madrid, España                      | 100%   | DMSO       |
| Posaconazol <sup>a</sup>    | Schering-Plough Res. Inst., Kenilworth, E.E.U.U. | 98%    | DMSO       |
| Micafungina <sup>c</sup>    | Astellas Pharma Inc, Tokio, Japón                | 100%   | Agua       |
| Caspofungina <sup>b</sup>   | Merck & Co., Rahway, E.E.U.U.                    | 100%   | Agua       |
| Anidulafungina <sup>c</sup> | Pfizer Inc., Madrid, España                      | 82.4%  | DMSO       |

DMSO, Dimetilsulfóxido (CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>); a conservación a temperatura ambiente; b conservación a 4°C; c conservación a -20°C.

### 3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La sensibilidad antifúngica de las levaduras fue determinada siguiendo la metodología descrita en el documento M27-A3 por el CLSI (CLSI, 2008a).

#### Preparación de los agentes antifúngicos

Se preparó una solución inicial de antifúngico 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar. Según la solubilidad del compuesto se empleó DMSO o agua destilada estéril tal y como se detalla en la tabla 3. A partir de la solución madre se preparó un banco de diluciones dobles seriadas siguiendo el esquema de la figura 3.

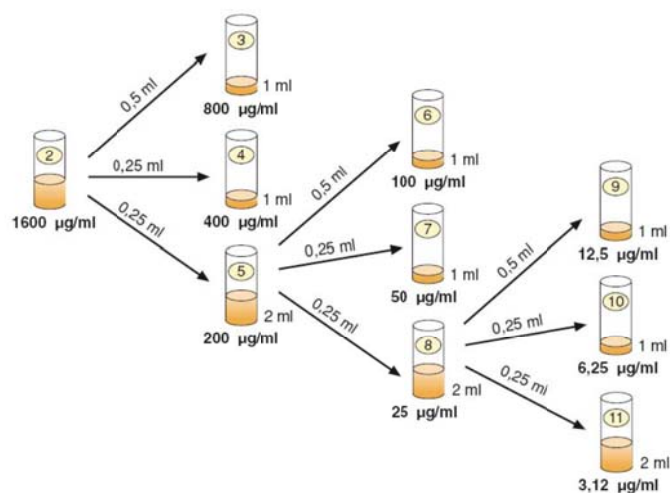


Figura 3. Esquema para la realización de diluciones dobles seriadas de antifúngicos solubles en DMSO (Cantón *et al.*, 2007)

Posteriormente se realizaron diluciones 1:50 en medio RPMI obteniéndose las concentraciones finales a ensayar. Las diluciones seriadas de antifúngico fueron dispensadas en las filas de microplacas de 96 pocillos de fondo cóncavo. De este modo en cada fila se obtuvo una serie decreciente de concentraciones de antifúngico. Así, la primera columna contenía la máxima concentración a ensayar del compuesto y la columna 10 la más baja, tal como se indica en la figura 4. Las columnas número 11 y 12 se completaron con RPMI con un 2% de DMSO o de agua (según el solvente utilizado para cada compuesto) que sirvieron como control negativo (control de esterilidad del medio) y control positivo (control de crecimiento del hongo). Los rangos de concentraciones de antifúngicos utilizados fueron de 0.03 a 16 µg/ml en el caso de anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol y equinocandinas; y de 0.125 a 64 µg/ml para fluconazol. Una vez preparadas las placas fueron cubiertas con una lámina adhesiva para evitar la evaporación y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 6 meses.

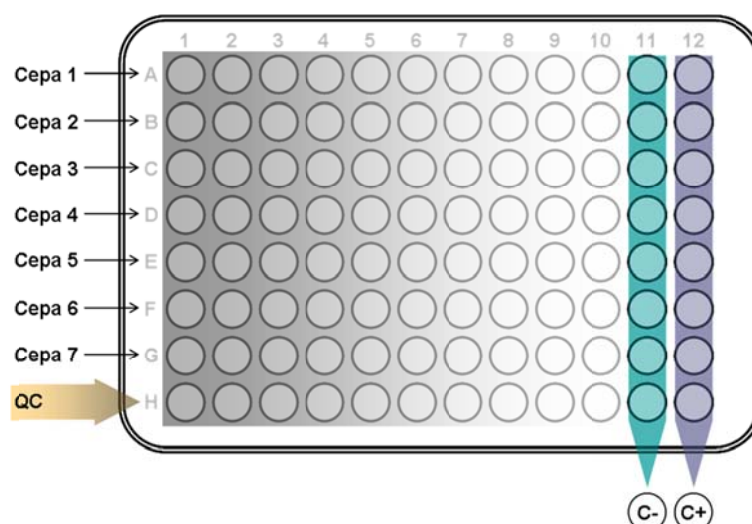


Figura 4. Esquema de la distribución de diluciones dobles seriadas de un antifúngico ensayado en un rango de 0.003 a 16  $\mu\text{g/ml}$ .

### Preparación de inóculos

Los inóculos fueron preparados suspendiendo dos o tres colonias en un tubo con solución salina estéril (NaCl 0.85%). La suspensión fue ajustada mediante recuento en cámara de Neubauer a una concentración de  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  UFC/ml. Luego se realizó una dilución 1:1000 en medio RPMI obteniendo inóculos de trabajo de  $1 \times 10^3$ - $5 \times 10^3$  UFC/ml. Tras la descongelación a temperatura ambiente de las microplacas, se dispensaron 100  $\mu\text{l}$  del inóculo de trabajo en los pocillos correspondientes a cada fila, a razón de una cepa por fila. Esta distribución permitió el ensayo simultáneo de 8 cepas por microplaca. Como controles se incluyeron las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258.

### 3.3.4. Curvas de mortalidad

El método empleado ha sido desarrollado de acuerdo a protocolos descritos previamente (Klepser *et al.*, 1998; Pfaller *et al.*, 2004; Cantón *et al.*, 2006). Se determinaron las curvas de mortalidad de 4 cepas de *C. guilliermondii* frente a anfotericina B, anidulafungina y fluconazol. Para ello se prepararon concentraciones de 0.03, 0.12, 0.5, 1, 2, 8 y 32  $\mu\text{g/mL}$  de cada fármaco en RPMI 1640, mientras que para los controles de crecimiento se utilizó RPMI 1640 sin antifúngico. Posteriormente cada tubo fue inoculado con 1 mL de una suspensión de levaduras

previamente ajustada a una concentración de  $5 \times 10^6$  UFC/mL y se procedió a su incubación a 35°C. Transcurridas 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h se extrajeron 100 µL de cada tubo, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 30 µL en APD para determinar las UFC/mL.

### 3.4. Estudios sobre la eficacia de los antifúngicos en modelos murinos

#### 3.4.1. Cepas

Los estudios *in vivo* incluyeron un total de 12 cepas, correspondientes a 5 especies de hongos oportunistas de interés clínico.

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

| Especie                           | Aislado       | Origen                |
|-----------------------------------|---------------|-----------------------|
| <i>Candida guilliermondii</i>     | UTHSC 11-142  | Desconocido           |
|                                   | UTHSC 10-499  | Desconocido           |
|                                   | UTHSC 11-685  | Desconocido           |
|                                   | UTHSC 10-3207 | Desconocido           |
| <i>Curvularia spicifera</i>       | UTHSC 06-4551 | Seno frontal          |
|                                   | UTHSC 09-3102 | Seno maxilar          |
| <i>Curvularia hawaiiensis</i>     | UTHSC 07-3226 | Pulmón                |
|                                   | UTHSC 10-2694 | Seno frontal          |
| <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> | UTHSC 10-2899 | Líquido sinovial      |
|                                   | UTHSC 08-2981 | Aorta                 |
| <i>Scopulariopsis brumptii</i>    | UTHSC 09-2391 | Espuito               |
|                                   | UTHSC 09-482  | Lavado broncoalveolar |

UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, E.E.U.U.

#### 3.4.2. Animales de experimentación

Con la excepción del desarrollo de un modelo experimental de sinusitis en el que se utilizaron ratas macho OFA de 200 g, en todos los estudios *in vivo* se emplearon ratones macho OF-1 de 30 g de peso (Charles River, Criffa S.A., Barcelona). Todos los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universitat Rovira i Virgili. Los animales fueron

mantenidos en condiciones estándar con libre acceso a comida y agua, siendo supervisados diariamente. El bienestar de los animales fue monitorizado mediante la supervisión de la apariencia del pelaje (liso y brillante, descuidado o piloerección), peso, cambios posturales, movilidad, comportamiento no provocado (vocalizaciones) y respuesta a estímulos.

### **3.4.3. Inmunosupresión**

Las ratas y ratones que por el diseño experimental requerían ser inmunosuprimidos recibieron el día previo a la infección, una dosis única de 200 mg/kg de ciclofosfamida (Genoxal® Baxter, Halle/Westfalen, Alemania) por vía intraperitoneal, y 150 mg/kg de 5-fluorouracilo (Ferrer Farma, Barcelona, España) administrado intravenosamente.

### **3.4.4. Infección**

Para la preparación de los inóculos de levaduras, se siguió el procedimiento descrito para los estudios *in vitro* en el apartado 3.3.3.1, ajustando la concentración al inóculo deseado. En el caso de los hongos filamentosos, los aislados de *Curvularia* fueron sembrados en agar avena y los aislados de *Scopulariopsis* en agar patata-zanahoria. Los cultivos fueron incubados a 25 °C durante 5-10 días hasta su adecuada esporulación. Los inóculos fueron preparados inundando las colonias fúngicas con 3-5 mL de solución salina fisiológica y raspando suavemente la superficie a fin de obtener una suspensión de conidios. Dicha suspensión fue posteriormente filtrada a través de una gasa estéril para eliminar posibles restos de micelio y agar. Los inóculos se ajustaron mediante recuento en cámara de Neubauer y la viabilidad fue verificada mediante la siembra de diluciones en APD, agar avena o patata-zanahoria según correspondiera.

Las infecciones diseminadas, en ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos, se realizaron mediante la administración intravenosa de una suspensión de conidios o levaduras a través de la vena caudal lateral.

Para el desarrollo del modelo de sinusitis en ratones, éstos fueron previamente anestesiados mediante inhalación de sevoflurano (Sevorane, Madrid, España). Se establecieron

grupos de 5 ratones inmunocompetentes que fueron inoculados mediante instilación en las fosas nasales con una suspensión conidial de  $2 \times 10^4$  UFC en 20  $\mu$ L de suero fisiológico.

Para el desarrollo del modelo en ratas se formaron grupos de 2 a 5 animales inmunocompetentes o inmunocomprometidos. Para establecer la infección los animales fueron anestesiados mediante una dosis única de Zoletil 100 (Virbac, Carros, Francia) de 30 mg/kg por vía intramuscular e inoculados con  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  ó  $3 \times 10^5$  UFC en 20  $\mu$ L de suero fisiológico. Se ensayaron 3 métodos de infección: i) inoculación por instilación nasal, ii) instilación nasal tras practicar previamente lesiones en la mucosa intranasal y iii) sondaje. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado o triplicado.

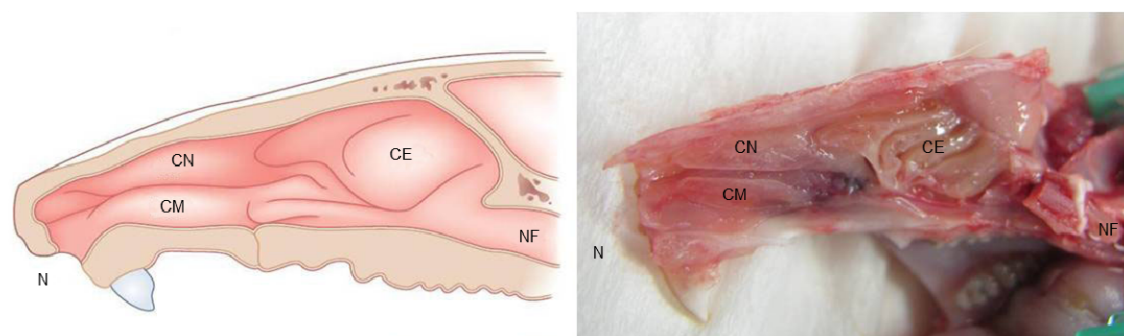


Figura 5. Representación (A) e imagen anatómica (B) de la vía aérea superior de una rata. N, nariz; CM, cornete maxilar; CN, cornete nasal; CE, cornete etmoidal; NF, nasofaringe.

### 3.4.5. Fármacos, dosis y vías de administración

Los antifúngicos utilizados, las vías de administración y las dosis empleadas en cada caso, se detallan en la Tabla 5. Los tratamientos se iniciaron 24 h después de la infección y continuaron diariamente durante 6-7 días según el estudio. Adicionalmente se administró diariamente a los animales ceftazidima (Normon S. A., Madrid, España), en una dosis de 5 mg/kg/día para prevenir infecciones bacterianas.

Tabla 5. Antifúngicos ensayados *in vivo*.

| Antifúngico                    | Origen   | Dosis<br>(mg/Kg/día) | Vía de<br>administración<br>[volumen] | Disolvente                   |
|--------------------------------|--|----------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| Anfotericina B<br>desoxicolato | Anfotericina B<br>deoxicolato. Farmacia<br>Xalabader, Barcelona,<br>España | 0.8                  | Intravenosa<br>[0.2 mL]               | solución<br>dextrosada al 5% |
| Anfotericina B<br>liposomal    | Ambisome® Gilead<br>Sciences S. L., Madrid,<br>España                      | 10                   | Intravenosa<br>[0.2 ml]               | solución<br>dextrosada al 5% |
| Fluconazol                     | Diflucan® Pfizer S. A.,<br>Madrid, España                                  | 50                   | Oral<br>[0.1 ml]                      | Agua                         |
| Posaconazol                    | Noxafil® Shering-<br>Plough, S. A. Madrid,<br>España                       | 40                   | Oral<br>[0.1 ml]                      | Agua                         |
| Voriconazol                    | Vfend® Pfizer S. A.,<br>Madrid, España                                     | 25, 60               | Oral<br>[0.1 ml]                      | Agua                         |
| Anidulafungina                 | Ecalta® Pfizer Ltda.,<br>Kent, Reino Unido                                 | 10                   | Intraperitoneal<br>[0.1 ml]           | Agua bidestilada             |

### 3.4.6. Recuperación fúngica a partir de órganos

Para cada estudio se estableció, según evaluaciones previas, el día para realizar la eutanasia de los grupos de carga fúngica, mediante la inhalación de CO<sub>2</sub>. Una vez sacrificados, se extrajeron los órganos diana para cada tipo de infección *i.e.*, riñón, bazo, hígado, pulmón y/o cerebro utilizando material quirúrgico estéril. Los órganos, fueron pesados y homogeneizados mecánicamente en 2 mL de suero fisiológico estéril con un homogenizador de tejidos OMNI TH-02 (OMNI Int., Kennesaw, GA. E.E.U.U.), se realizaron diluciones seriadas de los homogenizados que fueron sembrados en placas de APD en el caso de *Candida*, agar dicloran rosa bengala para *Curvularia* y agar patata-zanahoria en el caso de *Scopulariopsis*. Las placas fueron incubadas a 25-35 °C durante 3-4 días según la especie en estudio para realizar el



recuento de las UFC. La carga fúngica de los órganos se expresó en UFC/g de tejido según la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{UFC/mL} \times (\text{peso del órgano} + 2 \text{ mL}^*)}{\text{peso del órgano}}$$

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

### 3.4.7. Histopatología

En el modelo de sinusitis desarrollado en ratas y ratones, los animales fueron examinados diariamente durante 15 días, luego se procedió a su sacrificio mediante la inhalación de CO<sub>2</sub>. Posteriormente fueron decapitados, se retiraron la piel y los músculos faciales. Se separaron las mandíbulas de las cabezas siendo sumergidas en formol al 10%. Una vez fijadas las muestras, éstas fueron descalcificadas en 0.25 mol/L de ácido nítrico durante 24 h. Luego se extrajo la sección anterior de la nariz y el cerebro, dejando sólo la porción correspondiente a los senos nasales para el parafinado, corte y tinción.

En el caso de los modelos de infección diseminada, una porción de los órganos extraídos, tanto en controles como en tratados, fue fijada en formol al 10% para su estudio posterior.

Las muestras obtenidas, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico. Primero en alcohol al 70% durante 4 h, luego en alcohol al 96% por 2 h y finalmente en alcohol absoluto durante 3 h. Una vez deshidratadas, las muestras fueron sumergidas en xilol durante 2-3 h para eliminar el alcohol y posteriormente se procedió a su inclusión en parafina líquida. Para un resultado óptimo, las muestras se dejaron 8 h en parafina (50-55 °C) y luego a punto de fusión (60 °C) durante 4 h. Los bloque obtenidos, una vez fríos fueron cortados en láminas de 2 µm grosor. Antes de teñir, las muestras fueron desparafinadas con xilol durante 10 min y rehidratadas por inmersión en alcohol absoluto y luego en alcohol al 96% y al 70% durante 5 min en ambos casos.

La valoración de las alteraciones histológicas y la presencia de células fúngicas se realizó mediante observación microscópica de las muestras teñidas con hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) y nitrato de metenamina argéntica de Grocott (GMS).

#### **3.4.8. Análisis estadístico**

Se utilizó el programa estadístico GraphPadPrism versión 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California EEUU). Los resultados obtenidos en los estudios de supervivencia fueron analizados y comparados utilizando el método de Kaplan Meier y Logrank test. El análisis y comparación de la carga fúngica en órganos fue realizada con el Test U de Mann-Whitney.



#### **4. RESULTADOS**



#### **4.1. Identificación molecular de cepas clínicas de especies de *Candida* no *albicans***



#### 4.1. Identificación molecular de especies de *Candida no albicans*

En los últimos años diversos estudios han reportado el aumento en la diversidad de de especies de *Candida no albicans* involucradas en infecciones oportunistas, siendo la adecuada identificación de estos aislados de crucial importancia para el establecimiento de la terapia, debido a las diferencias de sensibilidad antifúngica que existen en algunos casos.

La identificación mediante técnicas fenotípicas requiere tiempo y experiencia por parte del personal de laboratorio, a lo cual se suma el hecho de la incapacidad de estos métodos para discernir entre especies estrechamente relacionadas. En este sentido, la identificación molecular se presenta como una opción rápida y fidedigna.

En nuestro estudio, la amplificación y secuenciación del dominio D1/D2 y la región ITS mostraron una concordancia con la identificación fenotípica de sólo 19 (42.2%) de las 45 cepas ensayadas (Tabla 6). Sin embargo se observaron distintos porcentajes de acuerdo entre ambos tipos de identificaciones en las diferentes especies implicadas: *C. lusitaniae* (100%), *C. guilliermondii* (80%), *C. kefyr* (75%), *C. rugosa* (29.1%). Mientras que en el caso de aquellas levaduras identificadas fenotípicamente como *C. famata* y *C. inconspicua* no se observaron coincidencias entre la identificación fenotípica y la molecular. Las importantes diferencias observadas, especialmente en aquellos aislados identificados previamente como *C. rugosa*, motivaron un estudio mas profundo de esta especie.

Tabla 6. Identificación fenotípica versus identificación molecular

| <b>Identificación fenotípica</b> | <b>Nº referencia UTHSC</b> | <b>Identificación molecular</b> |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Candida lusitaniae</i>        | 11-306                     | <i>Candida lusitaniae</i>       |
|                                  | 11-447                     | <i>Candida lusitaniae</i>       |
|                                  | 11-519                     | <i>Candida lusitaniae</i>       |
|                                  | 11-537                     | <i>Candida lusitaniae</i>       |
|                                  | 11-586                     | <i>Candida lusitaniae</i>       |



Resultados

---

|                               |         |                               |
|-------------------------------|---------|-------------------------------|
| <i>Candida guilliermondii</i> | 10-1499 | <i>Candida guilliermondii</i> |
|                               | 10-3207 | <i>Candida guilliermondii</i> |
|                               | 11-142  | <i>Candida guilliermondii</i> |
|                               | 11-685  | <i>Candida guilliermondii</i> |
|                               | 11-253  | <i>Candida fermentati</i>     |
| <i>Candida kefyr</i>          | 10-3042 | <i>Candida kefyr</i>          |
|                               | 10-3442 | <i>Candida kefyr</i>          |
|                               | 10-406  | <i>Candida kefyr</i>          |
|                               | 10-2770 | <i>Candida sphaerica</i>      |
| <i>Candida famata</i>         | 10-2906 | <i>Candida palmioleophila</i> |
|                               | 11-570  | <i>Candida palmioleophila</i> |
|                               | 11-134  | <i>Candida dubliniensis</i>   |
|                               | 10-2153 | <i>Candida intermedia</i>     |
| <i>Candida inconspicua</i>    | 06-4005 | <i>Candida krusei</i>         |
|                               | 07-1194 | <i>Candida krusei</i>         |
|                               | 08-364  | <i>Candida krusei</i>         |
| <i>Candida rugosa</i>         | 01-2568 | <i>Candida rugosa</i>         |
|                               | 05-1919 | <i>Candida rugosa</i>         |
|                               | 06-3729 | <i>Candida rugosa</i>         |
|                               | 06-3976 | <i>Candida rugosa</i>         |
|                               | 06-3931 | <i>Candida rugosa</i>         |
|                               | 09-1289 | <i>Candida rugosa</i>         |
|                               | 09-1402 | <i>Candida rugosa</i>         |
|                               | 03-344  | <i>Candida pararugosa</i>     |
|                               | 03-1143 | <i>Candida pararugosa</i>     |
|                               | 04-1051 | <i>Candida pararugosa</i>     |

---

---

|                       |         |                             |
|-----------------------|---------|-----------------------------|
|                       | 05-1693 | <i>Candida pararugosa</i>   |
|                       | 06-538  | <i>Candida pararugosa</i>   |
|                       | 07-2797 | <i>Candida pararugosa</i>   |
|                       | 07-3133 | <i>Candida pararugosa</i>   |
|                       | 08-442  | <i>Candida pararugosa</i>   |
|                       | 09-2953 | <i>Candida pararugosa</i>   |
| <i>Candida rugosa</i> | 10-2648 | <i>Candida pararugosa</i>   |
|                       | 05-205  | <i>Candida mesorugosa</i>   |
|                       | 05-646  | <i>Candida mesorugosa</i>   |
|                       | R-3412  | <i>Candida mesorugosa</i>   |
|                       | 06-3641 | <i>Candida pseudorugosa</i> |
|                       | 08-707  | <i>Candida pseudorugosa</i> |
|                       | 10-121  | <i>Candida neorugosa</i>    |
|                       | 10-2054 | <i>Candida neorugosa</i>    |

---

UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, E.E.U.U.



**4.2. Molecular identification and antifungal susceptibility of clinical isolates of the  
*Candida rugosa* complex and proposal of the new species *Candida neorugosa***

Paredes K, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Lawhon SD, Zhang S, Watkins JP,

Guarro J.

J. Clin. Microbiol. 2012, 50:2397-2403



# Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Testing of Clinical Isolates of the *Candida rugosa* Species Complex and Proposal of the New Species *Candida neorugosa*

Katihuska Paredes,<sup>a</sup> Deanna A. Sutton,<sup>b</sup> Josep Cano,<sup>a</sup> Annette W. Fothergill,<sup>b</sup> Sara D. Lawhon,<sup>c</sup> Sean Zhang,<sup>d</sup> Jeffrey P. Watkins,<sup>e</sup> and Josep Guarro<sup>a</sup>

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain<sup>a</sup>; Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA<sup>b</sup>; Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas, USA<sup>c</sup>; Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA<sup>d</sup>; and Department of Large Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas, USA<sup>e</sup>

***Candida rugosa* is a poorly known fungal species occasionally involved in human infections. A molecular analysis of the sequences of the D1/D2 domains and the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal genes of 24 clinical isolates phenotypically identified as *C. rugosa* demonstrated that only 10 (41.6%) isolates belonged to that species. The other isolates were identified as *Candida pararugosa* (41.6%) and *Candida pseudorugosa* (8.3%). The remaining two isolates, from human and equine infections, respectively, were clearly different from the others and represent a new species proposed here as *Candida neorugosa*. The closest species by D1/D2 sequences was the type strain of *C. rugosa*, with only 92.3% similarity. *C. neorugosa* can also be differentiated from all other species of the *C. rugosa* complex by phenotypic features. The eight antifungal drugs tested showed high *in vitro* activity against the 24 isolates included in the study.**

The incidence of *Candida* infection has increased in recent years, representing an important cause of morbidity and mortality. Although candidiasis is caused mainly by *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* (15), infections caused by rarer species have increased in recent years (7, 18). Among these less common species, *Candida rugosa* has been recognized as an emerging fungal pathogen capable of causing invasive infection in immunocompromised patients (12), mostly related to the use of catheters but also by other modes of nosocomial acquisition (6, 8, 12). This species represents only 0.2% of the *Candida* isolates in the global ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program (18) but shows a high prevalence in Latin America (18) and India (19). The fungus has decreased susceptibility to fluconazole (FLC) (17, 18), amphotericin B (AMB) (7), and the echinocandins (7). Considering its increasing pathogenic role and the potential development of resistance to antifungals, the reliable identification of *C. rugosa* is an important issue. However, the biochemical systems currently used for yeast identification in clinical laboratories commonly fail to identify the less frequent *Candida* spp. (23). Some genetic heterogeneity in *C. rugosa* has been reported (2, 13, 21), and the novel species *Candida pseudorugosa*, closely related to *C. rugosa*, has been recently proposed (11).

We have analyzed the D1/D2 domains and the intergenic transcribed spacer (ITS) sequences of the rRNA genes of a set of clinical isolates phenotypically identified as *C. rugosa* in order to assess the genetic heterogeneity of the species.

## MATERIALS AND METHODS

**Fungal isolates.** A total of 24 clinical isolates, received as *C. rugosa* by the Fungus Testing Laboratory in the Department of Pathology at the University of Texas Health Science Center (UTHSC) at San Antonio, TX, for identification and/or antifungal susceptibility determination, were included in the study. In addition, several ITS and D1/D2 sequences from type or reference strains, retrieved from GenBank, were also included in the phylogenetic analyses (Table 1).

**DNA extraction, amplification, and sequencing.** The fungal isolates were grown on potato dextrose agar (PDA) (Pronadisa, Madrid, Spain) at 28°C for 24 h, and DNA was extracted using a PrepMan Ultra sample preparation reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's protocol. The DNA was quantified using GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England). The D1/D2 domains of the 24 isolates and the ITS regions of two isolates from the different clades obtained in the D1/D2 phylogenetic analysis were amplified with the primer pairs NL1/NL4 and ITS5/ITS4, respectively, following the protocols described by Cano et al. (4) and Gilgado et al. (10). The PCR products were purified and sequenced with the same primers used for amplification at Macrogen Europe Inc. (Amsterdam, The Netherlands) with a 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems). The program SeqMan (Lasergene, Madison, WI) was used to obtain consensus sequences.

**Alignment and phylogenetic analysis.** The sequences were aligned using the ClustalX (version 1.8) computer program (22) with default parameters, followed by manual adjustments with a text editor. The phylogenetic analysis was performed with the software program MEGA 5.0 (20), using Maximum Likelihood (ML) with General-Time-Reversible (GTR) as a substitution model. Gaps were treated as pairwise deletion. Support for internal branches was assessed by a search of 1,000 bootstrapped sets of data.

**Phenotypic studies.** Morphological, biochemical, and physiological characterization of a representative number of isolates of the different clades obtained in the molecular study was performed using methods and protocols previously described (24). The tests included growth on Sabouraud chloramphenicol agar (Bio-Rad, Marnes-LaCoquette, France) at 30°C, 37°C, and 45°C; growth in liquid culture medium; germ tube tests;

Received 14 March 2012 Returned for modification 11 April 2012

Accepted 20 April 2012

Published ahead of print 2 May 2012

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

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

doi:10.1128/JCM.00688-12

TABLE 1 Isolates and sequences of *C. rugosa* species complex included in the study

| Species                      | Isolate <sup>a</sup>       | Origin                               | GenBank accession no. |                       |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                              |                            |                                      | ITS                   | D1/D2                 |
| <i>C. rugosa</i>             | CBS 613 <sup>T</sup>       | Feces of man                         | AY500374 <sup>b</sup> | GU246244 <sup>b</sup> |
| <i>C. pseudorugosa</i>       | CBS 10433 <sup>T</sup>     | Sputum, Tianjin, China               | DQ234792 <sup>b</sup> | DQ234791 <sup>b</sup> |
| <i>C. catenulata</i>         | NRRL Y-1508 <sup>T</sup>   | Feces of man, Puerto Rico            | AY493436 <sup>b</sup> | CCU45714 <sup>b</sup> |
| <i>Clavispora lusitaniae</i> | CBS 4413 <sup>T</sup>      | Cecum of pig, Portugal               | EU568907 <sup>b</sup> | AY190538 <sup>b</sup> |
| <i>C. pararugosa</i>         | NRRL Y-17089 <sup>T</sup>  | Feces of man                         | AF421856 <sup>b</sup> | CPU62306 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | LYSM3                      | Soil from forest, Thailand           |                       | AB498988 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | EB2                        | Water in mangrove forest, Thailand   |                       | AB436404 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | EF1                        | Water in mangrove forest, Thailand   |                       | AB436406 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | STC4                       | Blood, Kuala Lumpur, Malaysia        |                       | HQ412590 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | STC1                       | Blood, Kuala Lumpur, Malaysia        |                       | HQ412589 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | L154                       | Feces of man, Brazil                 |                       | FJ768915 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | L2683B                     | Blood, Brazil                        |                       | FJ768918 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | L387A                      | Rectal swab, Brazil                  |                       | FJ768920 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | L412D                      | Catheter, Brazil                     |                       | FJ768919 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | L69D                       | Blood, Brazil                        |                       | FJ768917 <sup>b</sup> |
| <i>C. pseudorugosa</i>       | MZKI K-259                 | Coastal Arctic, Norway               |                       | EU056285 <sup>b</sup> |
| <i>C. pseudorugosa</i>       | MZKI K-269                 | Coastal Arctic, Norway               |                       | EU056286 <sup>b</sup> |
| <i>C. pararugosa</i>         | CBS 9121                   | Saliva, sarcoma patient, Japan       |                       | AB112430 <sup>b</sup> |
| <i>C. pararugosa</i>         | CBS 9122                   | Saliva, sarcoma patient, Japan       |                       | AB112432 <sup>b</sup> |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 01-2568              | Toe, USA                             |                       | HE716177              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 05-205               | Blood, USA                           |                       | HE716180              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 05-646               | Jackson-Pratt drain, USA             |                       | HE716182              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 05-1919              | Ankle, USA                           |                       | HE716179              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 06-3729              | Ear, USA                             | HE716760              | HE716180              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 06-3931              | Stool, USA                           |                       | HE716181              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 06-3976              | Sputum, USA                          |                       | HE716178              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 09-1289              | Dolphin, USA                         |                       | HE716183              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 09-1402              | Blood, USA                           |                       | HE716176              |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC R-3412               | Unknown                              | HE716759              | HE716175              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 03-344               | Bronchial wash, USA                  |                       | HE716167              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 03-1143              | Blood, USA                           |                       | HE716170              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 04-1051              | Blood, USA                           |                       | HE716173              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 05-1693              | Bronchial wash, USA                  |                       | HE716172              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 06-538               | Blood, USA                           |                       | HE716174              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 07-2797              | Blood, USA                           |                       | HE716171              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 07-3133              | Blood, USA                           |                       | HE716169              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 08-442               | Urine, USA                           | HE716757              | HE716166              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 09-2953              | Vaginal, USA                         | HE716758              | HE716165              |
| <i>C. pararugosa</i>         | UTHSC 10-2648              | Blood, USA                           |                       | HE716168              |
| <i>C. pseudorugosa</i>       | UTHSC 06-3641              | Catheter urine, USA                  | HE716755              | HE716163              |
| <i>C. pseudorugosa</i>       | UTHSC 08-707               | Knee, USA                            | HE716756              | HE716164              |
| <i>C. neorugosa</i>          | SK75                       | Ulcerated lesion, Brazil             | GQ176145 <sup>b</sup> | GQ176145 <sup>b</sup> |
| <i>C. neorugosa</i>          | UTHSC 10-2054 <sup>T</sup> | Leg wound, USA                       | HE716762              | HE716185              |
| <i>C. neorugosa</i>          | UTHSC 10-121               | Wound on left forelimb of horse, USA | HE716761              | HE716186              |

<sup>a</sup> CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX; NRRL, National ARS Culture Collection, Peoria, IL.

<sup>b</sup> Sequences retrieved from GenBank database.

assessment of chlamydospore and ascospore production; hydrolysis of esculin; and the urease test. The ability of the isolates to assimilate carbohydrate source compounds was determined for glucose, D-xylose, melibiose, L-arabinose, D-ribose, L-sorbose, galactose, salicin, raffinose, sucrose, D-mannitol, trehalose, glycerol, 2-ceto-D-gluconate, ribitol, xylitol, inositol, sorbitol, α-metil-D-glucoside, N-acetyl-D-glucosamine, cellobiose, lactose, maltose, melezitose, and citric acid. Chromogenic testing of the colonies was performed on Chromagar *Candida* (Chromagar Company, Paris, France). The API ID 20C yeast identification kit (bioMérieux SA, Lyon, France) was also used for identification according to the manufacturer's instructions.

**In vitro studies.** We evaluated the antifungal susceptibility of the fungal isolates to AMB, FLC, itraconazole (ITC), posaconazole (PSC), voriconazole

(VRC), caspofungin (CAS), micafungin (MCF), and anidulafungin (AND). The tests were performed in duplicate using a broth microdilution method according to the M27-A3 guidelines for yeasts (5). MIC results for echinocandins and FLC were read after 24 h and the others after 48 h of incubation. Two reference strains, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258, were included as quality controls for all testing.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The new DNA sequences generated in this study were deposited in the GenBank database (Table 1).

## RESULTS

**Molecular analysis.** The phylogenetic tree inferred from the ML analysis of the D1/D2 sequences revealed that the 24 isolates tested

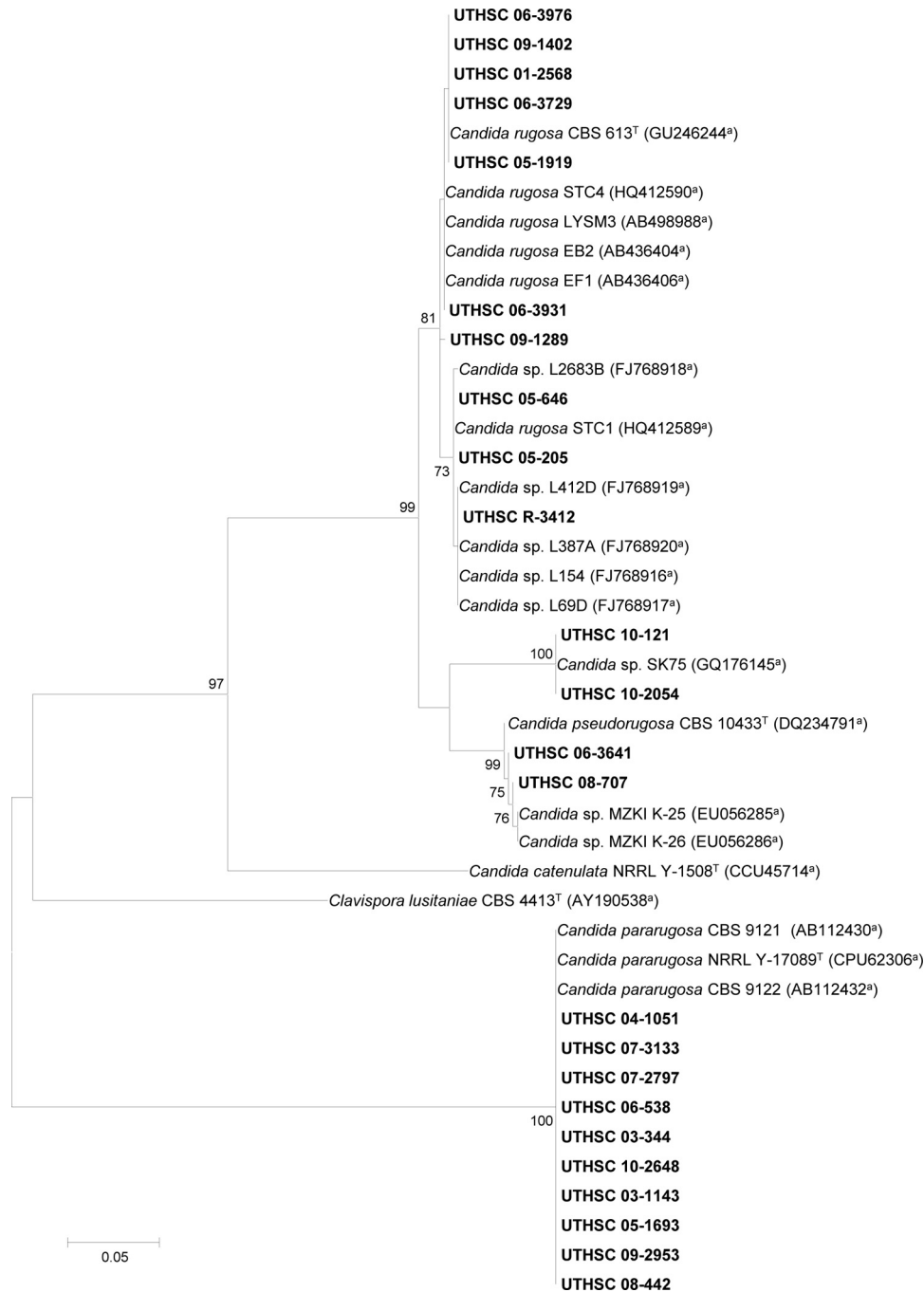


FIG 1 ML tree obtained from the D1/D2 domains of the 28S rRNA gene sequences of the strains of *C. rugosa* and related taxa. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. Clinical isolates from UTHSC are indicated in boldface. The bar indicates genetic distance. Sequences retrieved from GenBank are marked with a superscript "a."

were distributed in four statistically well-supported groups, each representing a phylogenetic species (Fig. 1). The first group (bootstrap support [bs], 81%) was formed by 10 clinical isolates, the sequence of the type strain of *C. rugosa*, and several sequences of clinical and environmental strains retrieved from GenBank, some of which were previously reported as atypical isolates of *C. rugosa* (21). The isolates' sequence similarities ranged from 99.3 to 100%. The second group (bs, 100%) was comprised of three identical

sequences; two belonged to our clinical isolates (UTHSC 10-2054 and UTHSC 10-121) and the third (SK75; GQ176145), retrieved from GenBank, was from an ulcerated lesion in Brazil. The members of that group showed low similarity to the type strains of the species *C. rugosa* (92.3%), *C. pseudorugosa* (92%), and *C. pararugosa* (67.3%). The third group (bs, 99%) consisted of two clinical isolates, the type strain of *C. pseudorugosa*, and sequences of two environmental isolates retrieved from GenBank. The sequence



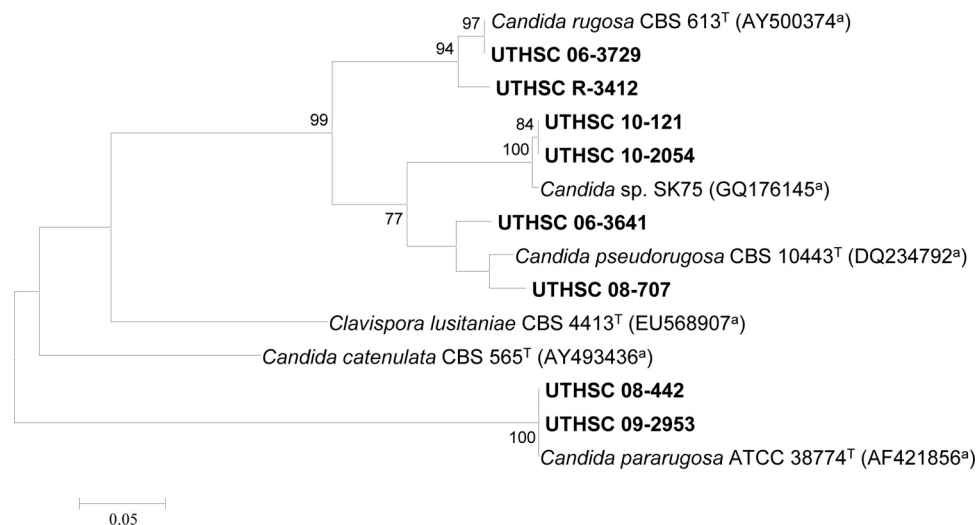


FIG 2 ML tree obtained from the ribosomal ITS sequences of several isolates of *C. rugosa* and related taxa. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. Clinical isolates from UTHSC are indicated in boldface. The bar indicates genetic distance. Sequences retrieved from GenBank are marked with a superscript "a."

similarity of the members of this group ranged from 99.2 to 100%. Finally, 10 clinical isolates were nested with the type strain of *C. pararugosa*, along with two sequences from clinical isolates deposited in GenBank (bs, 100%).

The phylogenetic tree inferred from the ML analysis of the ITS sequences (Fig. 2) showed topology and genetic relationships similar to those seen in the D1/D2 tree.

**Physiology.** Four of the physiological tests used were useful to distinguish the three phylogenetically most closely related species, i.e., *C. rugosa*, *C. pseudorugosa*, and the unidentified species represented by the isolates UTHSC 10-2054 and UTHSC 10-121. The two isolates of each species tested showed identical results (Table 2). *C. rugosa* was differentiated from *C. pseudorugosa* by the utilization of D-xylose, glycerol, and sorbitol. Clinical isolates UTHSC 10-2054 and UTHSC 10-121 differ from *C. rugosa* by their ability to assimilate ribitol and from *C. pseudorugosa* by their ability to assimilate D-xylose, glycerol, ribitol, and sorbitol. API ID 20C results confirmed those findings. On Chromagar, *C. pseudorugosa* and *C. rugosa* yielded dark blue-green and from white to light-blue colonies, respectively, while the isolates UTHSC 10-2054 and UTHSC 10-121 showed white to dark-blue colonies.

TABLE 2 Key physiological features useful to distinguish the species of the *C. rugosa* complex

| Species                      | Isolate <sup>a</sup> | Assimilation test <sup>b</sup> |          |         |          |
|------------------------------|----------------------|--------------------------------|----------|---------|----------|
|                              |                      | D-Xylose                       | Glycerol | Ribitol | Sorbitol |
| <i>C. pseudorugosa</i>       | UTHSC 06-3641        | -                              | -        | -       | -        |
|                              | UTHSC 08-707         | -                              | -        | -       | -        |
| <i>C. rugosa</i>             | UTHSC 06-3729        | +                              | +        | -       | +        |
|                              | UTHSC R-3412         | +                              | +        | -       | +        |
| <i>C. neorugosa</i> sp. nov. | UTHSC 10-121         | +                              | +        | +       | +        |
|                              | UTHSC 10-2054        | +                              | +        | +       | +        |

<sup>a</sup> UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas, USA.

<sup>b</sup> +, positive; -, negative.

**Antifungal susceptibility.** The eight drugs tested showed high *in vitro* activity against all the isolates, with no significant differences noted among the different species. MIC ranges were <0.03 to 2 µg/ml for the azoles, 0.25 to 1 µg/ml for AMB, and 0.03 to 0.5 µg/ml for the echinocandins (Table 3).

**Origins and clinical data of the isolates UTHSC 10-2054 and UTHSC 10-121.** UTHSC 10-2054 was originally recovered from a female patient who sustained leg injuries while in Africa. A culture from the initial wound debridement there yielded yeast that was identified as *C. rugosa*. The patient was subsequently transferred to Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD, where an isolate identified as *C. rugosa* using the API ID 20C kit (profile 2442104, 97.1%) was also recovered from a surgical wound. The wound infection was finally resolved without antifungal therapy.

UTHSC 10-121 was isolated from a 22-month-old male Arabian horse that was presented to the Veterinary Medical Teaching Hospital at Texas A&M University, College Station, TX, for evaluation of a laceration and puncture wound on the palmar medial aspect of the left forelimb. The lesion was surgically debrided, and cultures collected at 24 days of hospitalization grew *Pseudomonas aeruginosa* and a yeast identified as *C. tropicalis* using a commercial identification system (Vitek II YBC; bioMérieux, Durham, NC). The organism was also cultured from the wound 1 week later, along with *Enterococcus* spp. and *Stenotrophomonas maltophilia*. At 56 days of hospitalization, yeast was again isolated from the site and identified as *C. rugosa* (Vitek II YBC; bioMérieux, Durham, NC). The patient was taken to surgery for ankylosis of the joint and started with a daily oral dose of FLC (4 mg/kg of body weight) and broad-spectrum antibiotic therapy. After 79 days of hospitalization, the horse was discharged. *C. tropicalis* was not recovered again.

#### TAXONOMY

Based on molecular and phenotypic data, it is concluded that the isolates UTHSC 10-2054 and UTHSC 10-121 represent a novel species of the genus *Candida*, for which the name *Candida neorugosa* sp. nov. is proposed.

TABLE 3 Results of *in vitro* antifungal susceptibility testing

| Species<br>(no. of isolates)        | Antifungal<br>agents | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup> |      |      |
|-------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|------|------|
|                                     |                      | Range                                 | GM   | 90   |
| <i>C. pseudorugosa</i> (2)          | Amphotericin B       | 0.5–1                                 | 0.71 | –    |
|                                     | Fluconazole          | 1                                     | 1    | –    |
|                                     | Posaconazole         | 0.06                                  | 0.06 | –    |
|                                     | Voriconazole         | <0.03–0.03                            | 0.04 | –    |
|                                     | Itraconazole         | 0.12                                  | 0.12 | –    |
|                                     | Caspofungin          | 0.06–0.5                              | 0.17 | –    |
|                                     | Micafungin           | 0.12–0.25                             | 0.17 | –    |
|                                     | Anidulafungin        | 0.03–0.06                             | 0.04 | –    |
| <i>C. rugosa</i> (10)               | Amphotericin B       | 0.25–1                                | 0.66 | 1    |
|                                     | Fluconazole          | 0.25–2                                | 0.81 | 2    |
|                                     | Posaconazole         | 0.03–0.12                             | 0.07 | 0.12 |
|                                     | Voriconazole         | <0.03–0.03                            | 0.02 | 0.03 |
|                                     | Itraconazole         | 0.03–0.5                              | 0.06 | 0.12 |
|                                     | Caspofungin          | 0.06–1                                | 0.38 | 1    |
|                                     | Micafungin           | 0.06–0.5                              | 0.17 | 0.5  |
|                                     | Anidulafungin        | 0.03–0.5                              | 0.12 | 0.25 |
| <i>C. pararugosa</i> (10)           | Amphotericin B       | 0.25–1                                | 0.47 | 1    |
|                                     | Fluconazole          | 0.25–2                                | 0.76 | 2    |
|                                     | Posaconazole         | 0.03–0.12                             | 0.08 | 0.12 |
|                                     | Voriconazole         | <0.03–0.06                            | 0.03 | 0.06 |
|                                     | Itraconazole         | 0.03–0.25                             | 0.07 | 0.12 |
|                                     | Caspofungin          | 0.03–0.25                             | 0.13 | 0.25 |
|                                     | Micafungin           | 0.06–0.12                             | 0.1  | 0.12 |
|                                     | Anidulafungin        | 0.03–0.12                             | 0.06 | 0.12 |
| <i>C. neorugosa</i> sp.<br>nov. (2) | Amphotericin B       | 0.25–1                                | 0.5  | –    |
|                                     | Fluconazole          | 1–2                                   | 1.41 | –    |
|                                     | Posaconazole         | 0.12                                  | 0.12 | –    |
|                                     | Voriconazole         | 0.06                                  | 0.06 | –    |
|                                     | Itraconazole         | 0.25                                  | 0.25 | –    |
|                                     | Caspofungin          | 0.12–0.25                             | 0.17 | –    |
|                                     | Micafungin           | 0.06                                  | 0.06 | –    |
|                                     | Anidulafungin        | 0.03–0.06                             | 0.04 | –    |

<sup>a</sup> 90, MIC<sub>90</sub>, the minimal concentration of drug capable of inhibiting the growth of 90% of assayed isolates; GM, geometric mean; –, value not calculated.

*Candida neorugosa* Paredes, D. A. Sutton, Cano, Guarro, sp. nov. (Fig. 3).

**Mycobank MB 564807.** In medio liquido YPD post dies 3 ad 25°C sedimentum et annulus formatur, cellulae elipsoideae, ovoidae, 5 to 7 by 3 to 4  $\mu\text{m}$ , singulae, binae et adhaerents aut in racemis brevibus. Per gemmationem multipolarem reproducents. In agar PDA post dies 2 ad 25°C, coloniae convexa, involvit, album ad crema. Germina tubulata non formantur. Chlamydosporas et pseudohyphas non fert. Ascospores non fiunt. Assimilat glucosum, trehalosum, galactosum, D-xylosum, ribitolum, sorbitolum et glycerolum. Fermentatio nulla. Ureum et aesculinum non hydrolysat. Holotypus ex humana crus vulnus in collectione CBS deposita est, CBS H-20946 (cultura viva UTHSC 10-2054, CBS 12627).

Etymology: Refers to its similarity to *C. rugosa*.

***Candida neorugosa* Paredes, D. A. Sutton, Cano, Guarro, sp. nov.** On YPD broth, after 3 days at 25°C, sediment is formed and turbidity of the medium is visible; the cells are ellipsoidal or ovoid, 5 to 7  $\mu\text{m}$  by 3 to 4  $\mu\text{m}$ , single, in pairs, chains or small groups, with multilateral budding. On PDA, the colonies are convex,

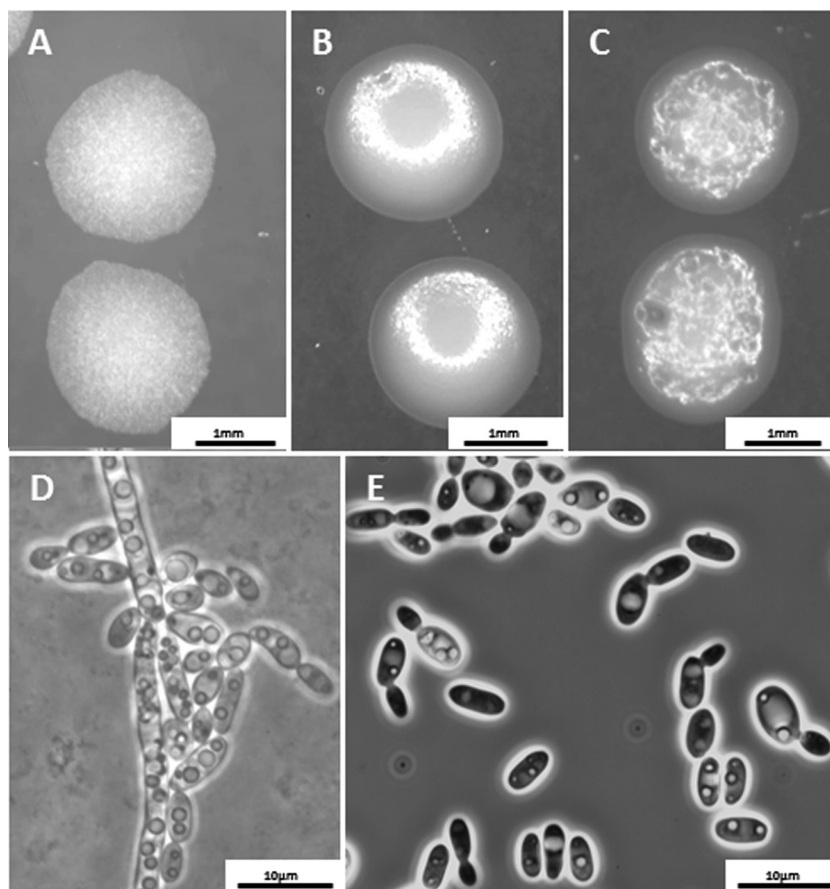
folded, and white to cream colored. Germ tubes and chlamydospores are not formed. Abundant pseudohyphae are formed on rice agar. Ascospores are not detected in acetate agar or Gorodkova medium incubated at 25°C for up to 4 weeks. Assimilation of trehalose, glucose, D-xylose, galactose, ribitol, sorbitol, and glycerol is produced. No sugars are fermented. Susceptible to cycloheximide. Unable to hydrolyze esculin and urea.

The type strain CBS 12627 (= UTHSC 10-2054) was isolated in 2010 in the Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, from a human leg wound. The strain CBS 12628 (= UTHSC 10-121) was isolated in 2010 in the Veterinary Medical Teaching Hospital at Texas A&M University, College Station, TX, from the left forelimb of an Arabian horse.

## DISCUSSION

Our molecular analysis revealed that the 24 isolates initially identified as *C. rugosa* belonged to at least four species, three of which were phylogenetically close to each other, i.e., *C. rugosa*, *C. pseudorugosa*, and the undescribed species, while a fourth species, *C. pararugosa*, was very distant from the other three. The lack of agreement between phenotypic and molecular identification of the isolates included in this study can be explained, as indicated above, by the limitations of the commercial identification systems used in clinical laboratories, which do not allow the identification of uncommon yeasts (1, 23). This can lead to an overestimation of the incidence of some species to the detriment of others that are less common.

Of the 24 isolates investigated, only 10 that nested with the type strain of *C. rugosa* were identified as that species. An identical number of isolates were identified as *C. pararugosa*. The latter species was first isolated from human feces and, after the initial description, has been recovered from the oral cavity of a denture wearer (9) and the saliva of a sarcoma patient (14), suggesting its contribution to the oral microbiota. In both cases, the isolates were misidentified by using phenotypic methods, and their true pathogenic role was not established. Our study has expanded the host range of *C. pararugosa*, with several additional isolates recovered from various anatomical sites. The present study also identified two isolates, one recovered from a urine catheter and the other from a wound infection of the knee, as *C. pseudorugosa*. This is the first report of this species from clinical specimens, as the only two other isolates are from subglacial ice from arctic coastal environments (3). It is also remarkable that two of the isolates tested, UTHSC 10-2054 and UTHSC 10-121, were clearly genetically different from known species of *Candida* whose sequences have been deposited in GenBank, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), or National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (NITE) databases. The D1/D2 sequences of these two isolates clustered in the D1/D2 phylogenetic tree with a third sequence of a *Candida* sp. from a Brazilian patient with an ulcerated lesion. The three sequences were identical and formed a clearly separated branch. Unfortunately, the last isolate is not available for comparative studies. The ITS sequence analysis confirmed those results. Previously, divergent ITS2 sequences (30 to 35 bp), obtained by pyrosequencing, were reported in some clinical isolates of *C. rugosa* (2, 13). Our studies confirmed such variability and showed that *C. pseudorugosa* also displays divergence in that fragment, i.e., a different sequence for each isolate (CBS 613<sup>T</sup>, GTCAAAAGTGGTTAGTCGGCGA CTTACTTGA; UTHSC 06-3729, GTCGATATTGGTTAGTCTG



**FIG 3** (A) *C. rugosa* UTHSC 06-3729. (B) *C. pseudorugosa* UTHSC 06-3641. (C to E) *C. neorugosa* sp. nov. UTHSC 10-2054. (A, B, and C) Colonies on PDA after 2 days of incubation at 25°C. (D) Pseudohyphae on rice Tween agar after 3 days of incubation at 28°C. (E) Yeast cells on YPD broth after 3 days of incubation at 37°C.

CGACTTACTTGA; and UTHSC R-3412, GTCAACATCTAAAA GTCGGCGACTTACTTGA), and all were different from those of *C. rugosa* and *C. neorugosa*. The three strains of *C. neorugosa* showed the same sequence (GTTCGACGTTCAAAAAGCCGGCGA CTACTACTAA) for the referred fragment, which suggests that this new species could be identified by pyrosequencing.

While there are no data on the *in vitro* antifungal susceptibility of *C. pseudorugosa* and *C. pararugosa*, several *in vitro* susceptibility studies have reported reduced susceptibility of *C. rugosa* to AMB (6, 7), FLC and VRC (17, 18), and the echinocandins (7). However, in our case, all the antifungal drugs tested, with the exception of CAS against *C. rugosa*, were active against the 24 isolates. Although *C. rugosa* is not included in the proposed CLSI breakpoints for antifungal susceptibility testing, its GM MIC (0.38 mg/liter) and MIC<sub>90</sub> (1 mg/liter) would be interpreted as inferring resistance to CAS (16), as opposed to the other species of the *C. rugosa* complex, which exhibit lower CAS MICs.

In conclusion, the present study confirmed the value of molecular tools for the identification of cryptic species within the *C. rugosa* species complex. Prior to this evaluation, only *C. rugosa* had been documented as a human etiologic agent. This study confirms that a significant number of isolates of other species have also been recovered from clinical samples. Now that reliable methods for the identification of these species are available, an

important objective for future studies would be to elucidate the true prevalences, susceptibilities, and clinical roles of these species.

#### ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, grant CGL 2009-08698/BOS.

#### REFERENCES

1. Alcoba-Flórez J, Méndez-Álvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, Arévalo MP. 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J. Clin. Microbiol.* 43:4107–4111.
2. Borman AM, et al. 2010. Rapid molecular identification of pathogenic yeasts by pyrosequencing analysis of 35 nucleotides of internal transcribed spacer 2. *J. Clin. Microbiol.* 48:3648–3653.
3. Butinar L, Strmole T, Gunde-Cimerman N. 2011. Relative incidence of ascomycetous yeasts in arctic coastal environments. *Microb. Ecol.* 61:832–843.
4. Cano J, Guarro J, Gené J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* 42:2450–2454.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed, document M27-A3. CLSI, Wayne, PA.
6. Colombo AL, et al. 2003. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46:253–257.

7. Diekema DJ, et al. 2009. *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J. Clin. Microbiol.* 47:3170–3177.
8. Dubé MP, Heseltine PN, Rinaldi MG, Evans S, Zawacki B. 1994. Fungemia and colonization with nystatin-resistant *Candida rugosa* in a burn unit. *Clin. Infect. Dis.* 18:77–82.
9. Giammanco GM, Melilli D, Pizzo G. 2004. *Candida pararugosa* isolation from the oral cavity of an Italian denture wearer. *Res. Microbiol.* 155:571–574.
10. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 43:4930–4942.
11. Li J, Xu J, Bai F. 2006. *Candida pseudorugosa* sp. nov., a novel yeast species from sputum. *J. Clin. Microbiol.* 44:4486–4490.
12. Minces LR, Ho KS, Veldkamp PJ, Clancy CJ. 2009. *Candida rugosa*: a distinctive emerging cause of candidaemia. A case report and review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* 41:892–897.
13. Montero CI, et al. 2008. Evaluation of pyrosequencing technology for the identification of clinically relevant non-dematiaceous yeasts and related species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27:821–830.
14. Nakagawa Y, et al. 2004. Recurrent isolation of an uncommon yeast, *Candida pararugosa*, from a sarcoma patient. *Med. Mycol.* 42:267–271.
15. Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:133–163.
16. Pfaller MA, et al. 2011. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist. Updat.* 14:164–176.
17. Pfaller MA, et al. 2006. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 44:3578–3582.
18. Pfaller MA, et al. 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 48:1366–1377.
19. Singh RI, et al. 2011. Epidemiology of candidemia in critically ill trauma patients: experiences of a level I trauma centre in North India. *J. Med. Microbiol.* 60:342–348.
20. Tamura K, et al. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731–2739.
21. Tay ST, Tan HW, Na SL, Lim SL. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of two closely related subgroups of *Candida rugosa* in clinical specimens. *J. Med. Microbiol.* 60:1591–1597.
22. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876–4882.
23. Vijgen S, et al. 2011. Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre Yeast-One antifungal testing. *Med. Mycol.* 49:107–110.
24. Yarrow D. 1998. Methods for isolation, maintenance and classification of yeasts. p 77–100. *In* Kurtzman C. P. Fell J. W. (ed), *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. Elsevier Science BV, Amsterdam, Netherlands.

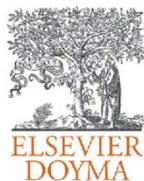


**4.3. Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between *in vitro* antifungal pharmacodynamics and outcome**

Paredes K, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Guarro J

Rev. Iberoam. Micol. 2014, doi: 10.1016/j.riam.2013.10.008





## Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



Original article

# Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between in vitro antifungal pharmacodynamics and outcome

Katihuska Paredes<sup>a</sup>, Francisco Javier Pastor<sup>a</sup>, Javier Capilla<sup>a,\*</sup>, Deanna A. Sutton<sup>c</sup>, Emilio Mayayo<sup>b</sup>, Annette W. Fothergill<sup>c</sup>, Josep Guarro<sup>a</sup>

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

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

<sup>c</sup> Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 July 2013

Accepted 11 October 2013

Available online xxx

#### Keywords:

*Candida guilliermondii*

Animal model

Fungal infection

### ABSTRACT

**Background:** *Candida guilliermondii* has been recognized as an emerging pathogen showing a decreased susceptibility to fluconazole and considerably high echinocandin MICs.

**Aim:** Evaluate the in vitro activity of anidulafungin in comparison to amphotericin B and fluconazole against different isolates of *C. guilliermondii*, and their efficacy in an immunosuppressed murine model of disseminated infection.

**Methods:** The in vitro susceptibility of four strains against amphotericin B, fluconazole and anidulafungin was performed by using a reference broth microdilution method and time-kill curves. The in vivo efficacy was evaluated by determination of fungal load reduction in kidneys of infected animals receiving deoxycholate AMB at 0.8 mg/kg i.v., liposomal amphotericin B at 10 mg/kg i.v., fluconazole at 50 mg/kg, or anidulafungin at 10 mg/kg.

**Results:** Amphotericin B and anidulafungin showed fungicidal activity, while fluconazole was fungistatic for all the strains. In the murine model, liposomal amphotericin B at 10 mg/kg/day was effective in reducing the tissue burden in kidneys of mice infected with any of the tested strains. However, amphotericin B, anidulafungin and fluconazole were only effective against those strains showing low MIC values.

**Conclusions:** Liposomal amphotericin B showed the higher activity and efficacy against the two strains of *C. guilliermondii*, in contrast to the poor effect of fluconazole and anidulafungin. Further studies with more isolates of *C. guilliermondii* representing a wider range of MICs should be carried out to assess whether there is any relationship between MIC values and anidulafungin efficacy.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Terapia antifúngica frente a la infección por *Candida guilliermondii* en ratones, correlación entre los parámetros farmacodinámicos in vitro y la eficacia in vivo

### RESUMEN

#### Palabras clave:

*Candida guilliermondii*

Modelo animal

Infección fúngica

**Antecedentes:** *Candida guilliermondii* es un patógeno emergente, con reducida sensibilidad al fluconazol y a las equinocandinas.

**Objetivos:** Evaluar la actividad in vitro de la anidulafungina, en comparación con la de la anfotericina B y el fluconazol, frente a *C. guilliermondii* y su eficacia en un modelo animal de infección diseminada.

**Métodos:** La sensibilidad in vitro se valoró mediante microdilución en caldo y curvas de mortalidad. La eficacia in vivo se evaluó mediante la determinación de la carga fúngica en riñón de ratones inmunosuprimidos con infección diseminada por *C. guilliermondii* tratados con anfotericina B desoxicolato (0,8 mg/kg i.v.), anfotericina B liposomal (10 mg/kg i.v.), fluconazol (50 mg/kg) o anidulafungina (10 mg/kg).

**Resultados:** La anfotericina B y la anidulafungina mostraron actividad fungicida, mientras que el fluconazol fue fungistático frente a todas las cepas. En el modelo murino, la anfotericina B liposomal redujo para

\* Corresponding author.

E-mail addresses: javier.capilla@urv.cat, kpilqu@yahoo.es (J. Capilla).



27 todas las cepas la carga fúngica en riñones, mientras que la anfotericina B desoxicolato, la anidulafungina  
 28 y el fluconazol fueron efectivas solo en aquellos animales infectados con las cepas de menor valor de  
 29 concentración mínima inhibitoria (CMI).

30 **Conclusiones:** La anfotericina B liposomal mostró la mayor actividad y eficacia frente a *C. guilliermondii*,  
 31 en contraste con el limitado efecto del fluconazol y de la anidulafungina. Se necesitan estudios que  
 32 incluyan cepas con un rango más amplio de CMI que permitan determinar la relación entre la actividad  
 33 in vitro y la eficacia de la anidulafungina.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

34  
 35 The fungus *Candida guilliermondii* is widely distributed in  
 36 nature, including the human microbiota of the skin and mucosal  
 37 surfaces.<sup>22</sup> Although this species shows a reduced virulence in com-  
 38 parison to other *Candida* species,<sup>3</sup> it is currently considered an  
 39 emerging pathogen, with a major incidence in Latin America.<sup>18</sup> *C.*  
 40 *guilliermondii* has been recognized as the etiologic agent of a wide  
 41 variety of clinical infections, including disseminated ones mainly  
 42 in immunocompromised patients,<sup>22</sup> and nosocomial outbreaks  
 43 in surgical patients with intravascular devices.<sup>13</sup> Currently, the  
 44 recommended treatment for invasive candidiasis in neutropenic  
 45 patients includes caspofungin (CFG) or micafungin (MFG) as first-  
 46 line therapies, liposomal amphotericin B (LAMB) and anidulafungin  
 47 (AFG) therapeutic being alternatives, while fluconazole (FLC) is rec-  
 48 ommended only when susceptibility to this drug is confirmed.<sup>23</sup>  
 49 However, several studies have shown that *C. guilliermondii* has  
 50 a decreased susceptibility to FLC<sup>8,15,19</sup> and therapeutic failures,  
 51 associated with isolates with high amphotericin B (AMB) mini-  
 52 mal inhibitory concentrations (MICs), have been reported.<sup>9,12,24</sup>  
 53 Although nearly 90% of isolates shows echinocandins MICs equal or  
 54 lower than clinical breakpoints (CBP) of susceptibility (2 µg/ml),<sup>17</sup>  
 55 similar to other species of *Candida*, such as *C. parapsilosis*, some iso-  
 56 lates of *C. guilliermondii* show MICs considerably high.<sup>8,15</sup> Available  
 57 data concerning the AFG efficacy in invasive candidiasis are limited  
 58 and the potential role of that drug in the clinical practice is poorly  
 59 known.<sup>23</sup> In this context, animal studies can play an important role  
 60 for a better understanding of the in vitro-in vivo correlation.<sup>11</sup>  
 61 Therefore, our main objective was to evaluate the in vitro and in  
 62 vivo activities of AFG against different isolates of *C. guilliermondii*,  
 63 comparing the results with those of AMB and FLC.

## 64 Materials and methods

### 65 Fungal isolates

66 Four clinical isolates of *C. guilliermondii* (UTHSC 11-142, UTHSC  
 67 10-499, UTHSC 11-685 and UTHSC 10-3207) were used in the in  
 68 vitro study and two of them (UTHSC 11-685 and UTHSC 11-142)  
 69 were selected for the murine model on the basis of their different  
 70 in vitro susceptibilities. The isolates were identified by sequencing  
 71 the internal transcribed spacer (ITS) region and the D1-D2 domains  
 72 of the rRNA, comparing the sequences with those of the type strain  
 73 of this species.

### 74 In vitro studies

75 The in vitro susceptibility of the four strains to AMB, FLC and AFG  
 76 was evaluated using a reference broth microdilution method,<sup>6</sup> *Candi-*  
 77 *dida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258 being  
 78 included as quality controls.

79 Time-kill curves were developed for all the strains according  
 80 previous studies.<sup>5,20</sup> In brief, a stock solution of each antifungal was  
 81 prepared, AMB (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) and AFG (Pfizer  
 82 Inc., Madrid, Spain) were dissolved in dimethyl sulfoxide and FLC  
 (Pfizer Inc., Madrid, Spain) in distilled water. Further, drug dilutions

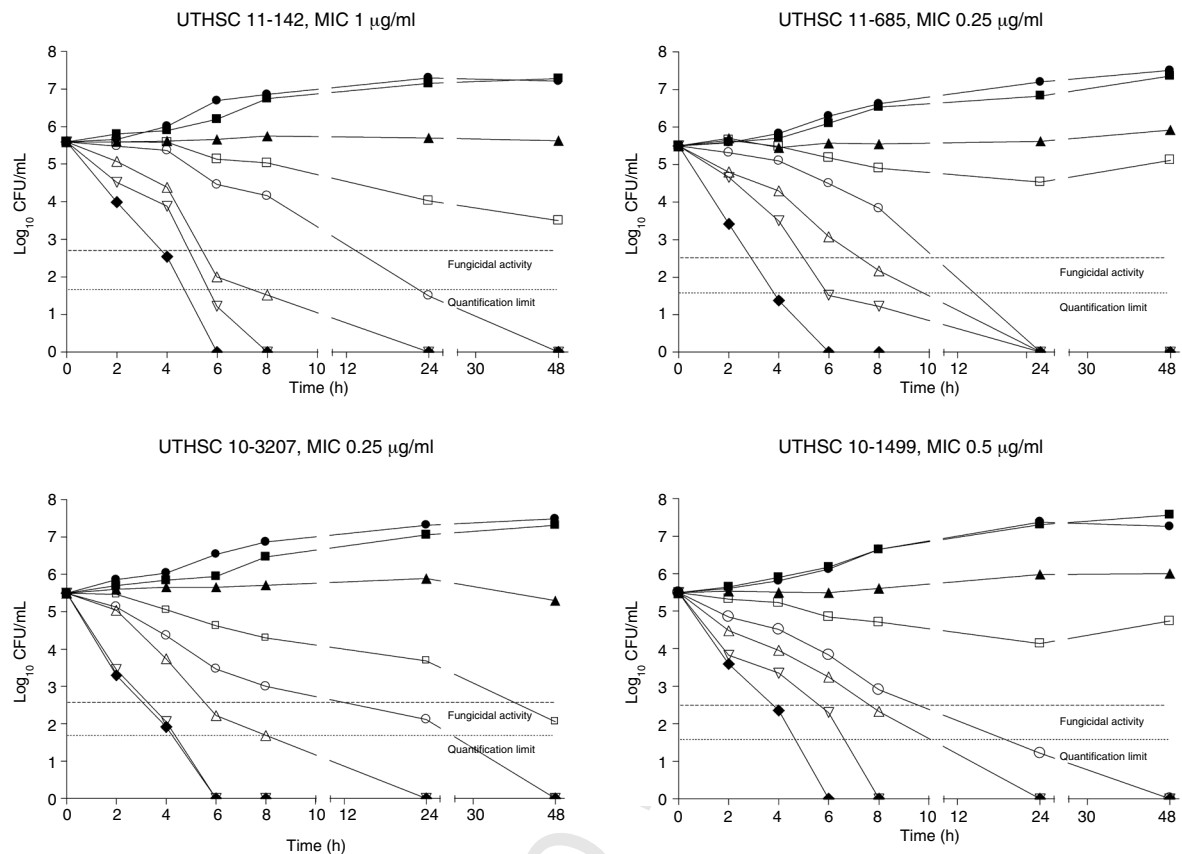
83 were prepared in 9 ml of standard RPMI 1640 medium to obtain  
 84 concentrations of 0.03, 0.12, 0.5, 1, 2, 8 and 32 µg/ml of each drug.  
 85 The isolates were subcultured at 35 °C for 24 h on potato dextrose  
 86 agar (PDA) plates. Cultures of *C. guilliermondii* were suspended in  
 87 sterile saline and the resulting suspensions were adjusted at  $5 \times 10^6$   
 88 colony forming units (CFU)/ml by haemocytometer counts and by  
 89 serial plating onto PDA to confirm viability. Dilutions and controls  
 90 (drug-free) were inoculated with 1 ml of the fungal suspensions,  
 91 resulting in a starting inoculum of  $5 \times 10^5$  CFU/ml, and incubated  
 92 at 35 °C. An aliquot of 100 µl from each tube was collected at 0, 2,  
 93 4, 6, 8, 24, and 48 h after inoculation, diluted, cultured onto PDA  
 94 plates and incubated at 35 °C for 48 h for CFU/ml determination.  
 95 A CFU decrease of  $\geq 99.9\%$  or 3 log<sub>10</sub> unit compared to starting  
 96 inoculum was considered fungicidal, while a reduction of  $< 99.9\%$  or  
 97  $< 3$  log<sub>10</sub> unit, was considered fungistatic. The limit of detection was  
 98 50 CFU/ml. All time-kill curve studies were performed in duplicate.

### 99 In vivo studies

100 Male OF-1 mice (Charles River; Criffa SA, Barcelona, Spain) with  
 101 a mean weight of 30 g were used in the experiment. Mice were  
 102 housed in standard boxes with free access to food and water. All ani-  
 103 mal procedures were supervised and approved by the Universitat  
 104 Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee.

105 Mice were rendered neutropenic one day prior to infection by an  
 106 intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of cyclophosphamide  
 107 (Genoxal; Laboratorios Funk SA, Barcelona, Spain) plus an intra-  
 108 venous (i.v.) injection of 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma  
 109 SA, Barcelona, Spain) at 150 mg/kg.<sup>10,14</sup> The day of infection, mice  
 110 were challenged i.v. with  $1 \times 10^8$  CFU/animal of each of the two  
 111 strains of *C. guilliermondii*, UTHSC 11-685 and UTHSC 11-142, in  
 112 0.2 ml of sterile saline into the lateral tail vein.<sup>3,4</sup>

113 Groups of eight animals were randomly established for each  
 114 strain and drug. The groups were treated as follows: amphotericin B  
 115 deoxycholate (AMBd) (Xalabarder Pharmacy, Barcelona, Spain) at  
 116 doses of 0.8 mg/kg i.v. once a day (QD); liposomal amphotericin  
 117 B (LAMB) (Gilead Sciences S.A., Madrid, Spain) at 10 mg/kg i.v.,  
 118 QD; FLC (Pfizer Inc., Madrid, Spain) at 50 mg/kg orally (p.o.) by  
 119 gavage, twice daily (BID); and AFG (Ecalta; Pfizer Ltd., Sandwich,  
 120 Kent, United Kingdom) at 10 mg/kg of body weight/dose i.p., QD.  
 121 All treatments began 24 h after challenge, and lasted for 7 days.  
 122 Controls received no treatment. To prevent bacterial infections, all  
 123 mice received 5 mg/kg day ceftazidime subcutaneously from days  
 124 1 to 7 after infection. Mice were checked daily and were eutha-  
 125 nized on day 8 post-infection by CO<sub>2</sub> anoxia. The efficacy of each  
 126 drug was evaluated by tissue burden reduction and histopathologi-  
 127 cal studies. Kidneys were aseptically removed, and one of them was  
 128 weighed and homogenized in 2 ml of sterile saline. Serial 10-fold  
 129 dilutions of the homogenates were plated onto PDA and incu-  
 130 bated for 48 h at 35 °C for CFU/g calculation. For the histopathology  
 131 study the remaining kidney was fixed with 10% buffered formal-  
 132 in, dehydrated, paraffin embedded, and sliced into 2 µm sections,  
 133 which were stained with hematoxylin-eosin (H-E) and periodic  
 134 acid-Schiff (PAS) stain for examination by light microscopy.



**Fig. 1.** Time-killing kinetics assays of AMB against four strains of *C. guilliermondii*. (■) 0.03 µg/ml, (▲) 0.12 µg/ml, (□) 0.5 µg/ml, (○) 1 µg/ml, (△) 2 µg/ml, (▽) 8 µg/ml, (◆) 32 µg/ml, (●) control. Dashed lines represent a CFU decrease of 3 log<sub>10</sub> units in growth compared with the initial inoculum (fungicidal activity), dotted lines indicate the quantification limit of the test.

135 **Statistics**

136 Colony counts from tissue were analyzed using the  
 137 Mann-Whitney *U*-test, using Graph Pad Prism 4.0 for Win-  
 138 dows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). When *P* < 0.05 the  
 139 differences were considered statistically significant.

140 **Results**

141 *In vitro* studies

142 MICs of AMB were 0.25–1 µg/ml, of AFG 0.06–0.25 µg/ml and of  
 143 FLC 0.5–1 µg/ml. Following the cut-offs of susceptibility for AMB,  
 144 FLC and AFG against *C. guilliermondii*,<sup>16</sup> all isolates were suscepti-  
 145 ble to the three drugs. Quality control strains susceptibilities were  
 146 within the accepted ranges.<sup>6</sup>

147 The killing kinetics of AMB showed a fast fungicidal activity that  
 148 increased with drug concentration. At concentrations equivalent to  
 149 the MIC, that drug showed a fungicidal effect against three of the  
 150 four isolates tested (Fig. 1). This activity started immediately after  
 151 inoculation at concentrations over 1 µg/ml, the fungicidal endpoint  
 152 being reached after 4 h at 32 µg/ml. AFG at concentrations above  
 153 0.5 µg/ml showed fungicidal activity starting after 4 h of incubation.  
 154 The fungicidal endpoint was reached at 12–24 h of incubation at  
 155 32 µg/ml (Fig. 2). FLC showed fungistatic activity against all four  
 156 isolates (Fig. 3).

157 *In vivo* studies

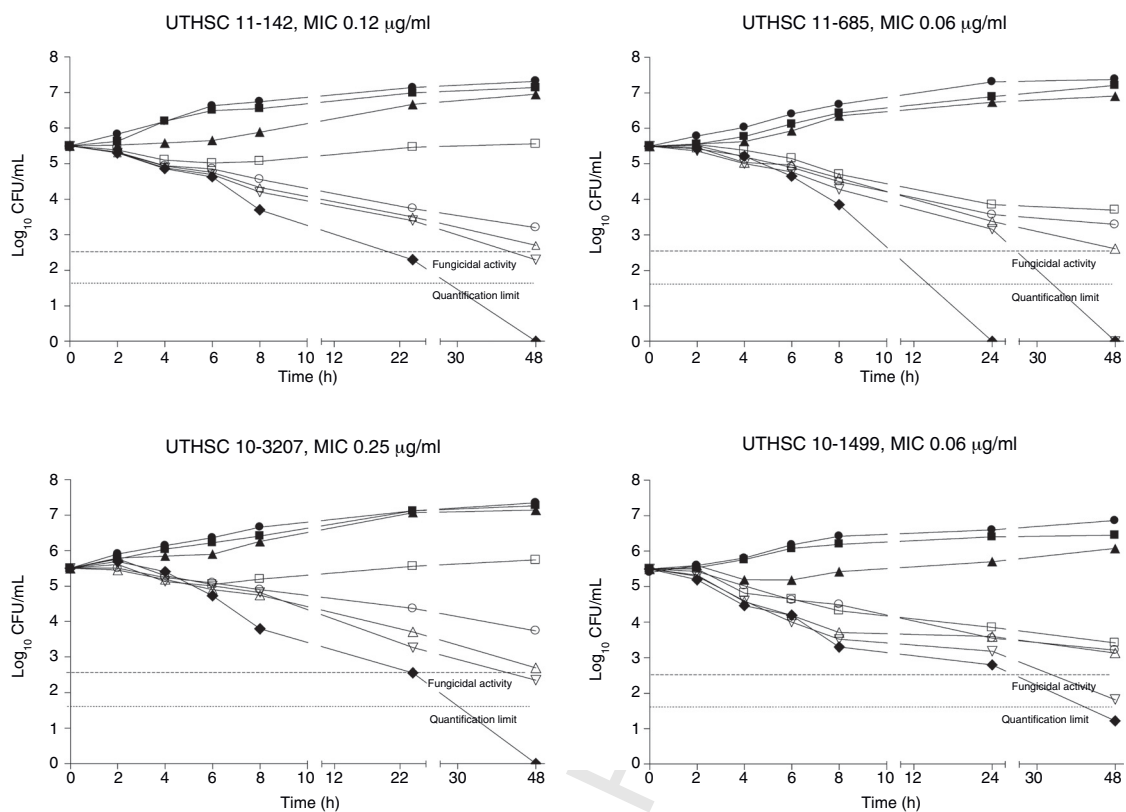
158 LAMB at 10 mg/kg was the only drug able of reducing the fun-  
 159 gal load in kidneys of mice infected with each of the two strains,

160 being the reduction significantly higher than the other therapies  
 161 (*P* ≤ 0.04). AMBd and FLC were only able to reduce the tissue bur-  
 162 den in mice infected with the strain that showed the lowest MICs  
 163 for these two drugs, i.e., 0.25 µg/ml for AMB and 0.5 µg/ml for FLC  
 164 (*P* ≤ 0.008). In the case of AFG the fungal load reduction was modest  
 165 and lower than that for AMBd, and it significantly reduced the tis-  
 166 sue burden in kidney only with respect to control group for strain  
 167 UTHSC 11-685 (*P* = 0.002) (Fig. 4).

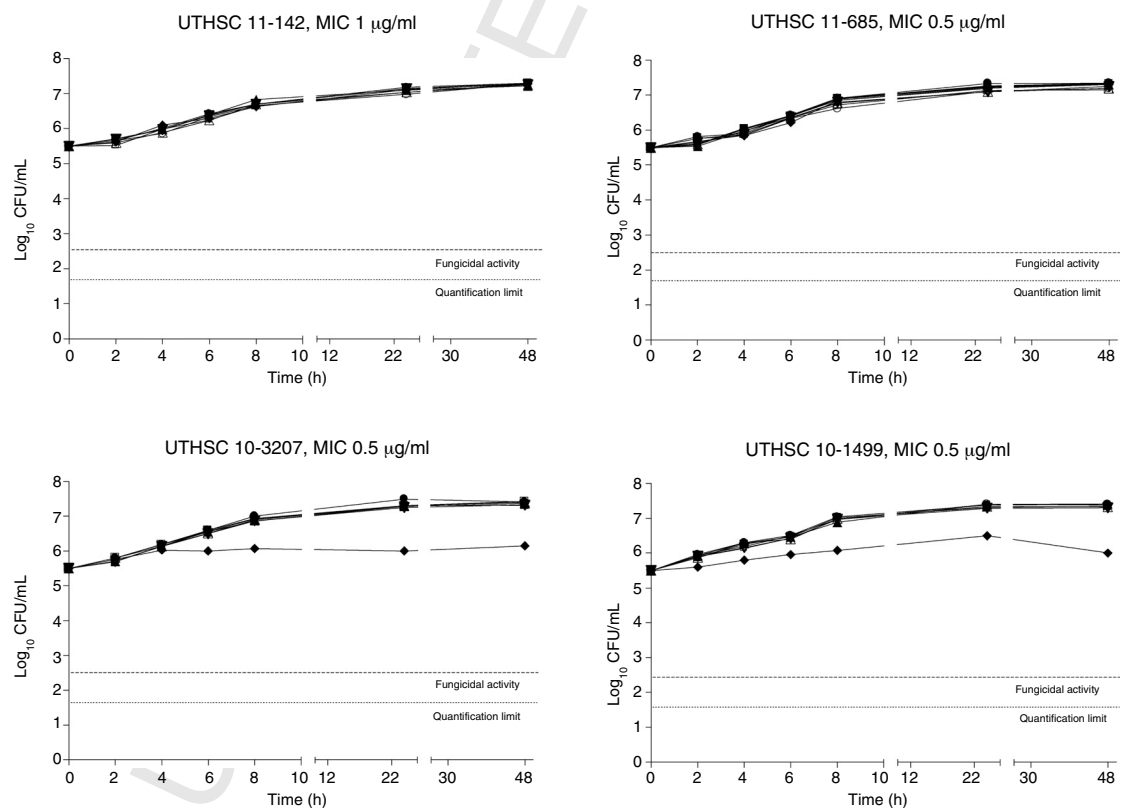
168 The histological study showed focal infiltration of fungal cells in  
 169 kidneys of untreated animals and in mice treated with AMBd, FLC or  
 170 AFG. Kidneys of mice treated with LAMB showed only a mild fungal  
 171 invasion. Signs of necrosis, inflammatory response or parenchyma  
 172 alterations were nor observed in controls neither in treated animals  
 173 (Fig. 5).

174 **Discussion**

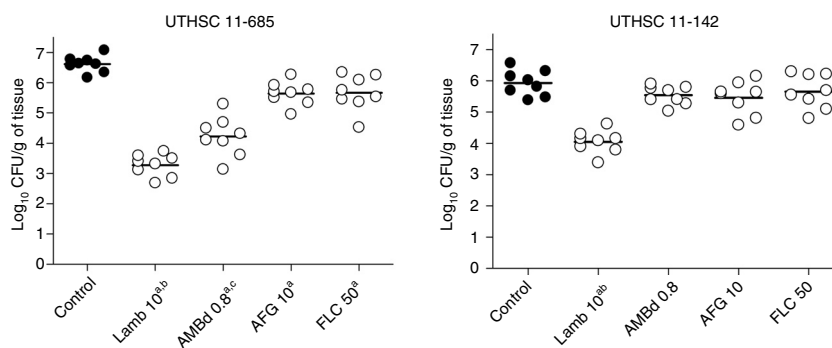
175 The *in vitro* studies did not reveal decreased susceptibility  
 176 of *C. guilliermondii* isolates to FLC or AFG. In agreement with  
 177 previous studies, time-kill curves of AMB showed a concentration-  
 178 dependent fungicidal activity, against all the isolates,<sup>4,5,7</sup> and FLC  
 179 showed a fungistatic effect regardless of the concentration tested.<sup>7</sup>  
 180 It is known that AMBd exhibits a higher efficacy than its lipodic  
 181 formulation, especially in kidney, when administered both at the  
 182 same doses.<sup>1</sup> However, pharmacokinetic studies showed that after  
 183 the administration of 0.75 mg/kg of AMBd the *C*<sub>max</sub> of AMB attained  
 184 in mice serum was 0.30 µg/ml.<sup>25</sup> However, the AMB MIC of one  
 185 of the two isolates tested is higher than this value; therefore, we  
 186 used a high dose of LAMB in order to reach higher concentrations.<sup>1</sup>  
 187 Indeed, the administration of LAMB at 10 mg/kg was effective in  
 188 reducing the fungal load of both strains. This fact correlated with



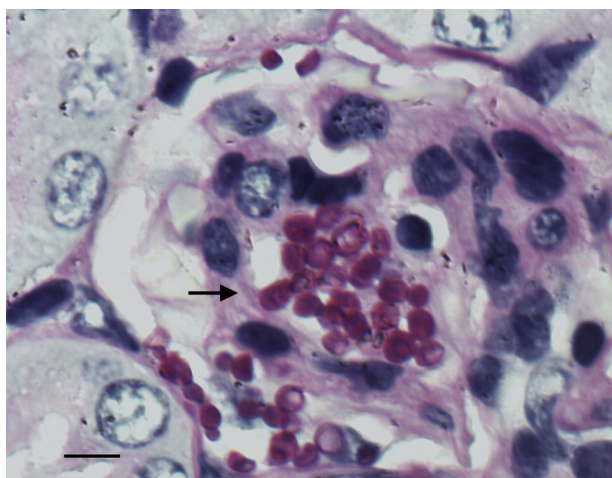
**Fig. 2.** Time-killing kinetics assays of AFG against four strains of *C. guilliermondii*. (■) 0.03 µg/ml, (▲) 0.12 µg/ml, (□) 0.5 µg/ml, (○) 1 µg/ml, (△) 2 µg/ml, (▽) 8 µg/ml, (◆) 32 µg/ml, (●) control. Dashed lines represent a CFU decrease of 3 log<sub>10</sub> units in growth compared with the initial inoculum (fungicidal activity), dotted lines indicate the quantification limit of the test.



**Fig. 3.** Time-killing kinetics assays of FLC against four strains of *C. guilliermondii*. (■) 0.03 µg/ml, (▲) 0.12 µg/ml, (□) 0.5 µg/ml, (●) 1 µg/ml, (△) 2 µg/ml, (▽) 8 µg/ml, (◆) 32 µg/ml, (●) control. Dashed lines represent a CFU decrease of 3 log<sub>10</sub> units in growth compared with the initial inoculum (fungicidal activity), dotted lines indicate the quantification limit of the test.



**Fig. 4.** Effects of antifungal treatment on colony counts of *C. guilliermondii* in kidney of neutropenic mice, 8 days post infection. LAMB 10, liposomal amphotericin B at 10 mg/kg QD; AMBd 0.8, amphotericin B deoxycholate at 0.8 mg/kg QD; AFG 10, anidulafungin at 10 mg/kg QD. <sup>a</sup>*P*<0.05 versus control; <sup>b</sup>*P*<0.05 versus AMBd 0.8, AFG 10 and FLC 50; <sup>c</sup>*P*<0.05 versus AFG 10 and FLC 50.



**Fig. 5.** Presence of fungal infiltration (white arrows) in kidney sections of controls mice infected by *C. guilliermondii*, at 8 days post infection (periodic acid Schiff staining, magnification 1000×). Bar = 10 μm.

189 killing curves, where AMB achieved its fungicidal activity against  
 190 the two isolates tested in vivo, at concentrations of 1 μg/ml. To  
 191 our knowledge, this is the first study that tried to establish a rela-  
 192 tionship between the killing kinetics and the in vivo experimental  
 193 efficacy of AFG and FLC against clinical isolates of *C. guilliermondii*.  
 194 Only a previous study on echinocandins exists, particularly on  
 195 caspofungin (CFG) in disseminated infection by *C. guilliermondii*.  
 196 CFG at 1 mg/kg was effective in reducing the kidney fungal load  
 197 in mice infected with one strain of *C. guilliermondii* with a MIC  
 198 of 8 μg/ml, while time killing revealed that no fungicidal activity  
 199 was achieved at concentrations of 64 μg/ml.<sup>4</sup> Conversely, our  
 200 study showed a concentration-dependent activity of AFG, which  
 201 at 32 μg/ml exerted a fungicidal activity, as previously reported,<sup>17</sup>  
 202 at 24 h and at 8 μg/ml. Previous studies reported AFG concentra-  
 203 tions in serum and kidney of approximately 13 μg/ml after 7 days of  
 204 treatment at doses of 10 mg/kg.<sup>21</sup> Here, AFG was able to reduce only  
 205 modestly the fungal burden in kidneys of neutropenic mice infected  
 206 with one of the two strains tested, which does not seem to be related  
 207 with the low AFG MICs difference between the two strains tested  
 208 (1 dilution), suggesting that the response to AFG treatment is strain  
 209 dependent. Similarly, FLC was also only able to reduce slightly the  
 210 fungal burden in kidney of mice challenged with one of the two  
 211 strains in spite of the dose administered which reach serum con-  
 212 centrations above the MICs,<sup>2</sup> which was also not surprising due to  
 213 its fungistatic activity.

214 In conclusion, our study showed the higher activity and efficacy  
 215 of LAMB against the two strains of *C. guilliermondii*, in contrast to

216 the poor effect of FLC and AFG. However, further studies with more  
 217 isolates of *C. guilliermondii* representing a wider range of AFG MICs  
 218 should be carried out to assess if any relationship between MIC  
 219 values and AFG efficacy exists.

### 220 Conflict of interest

221 None to declare.

### 222 References

- 223 1. Andes D, Safdar N, Marchillo K, Conklin R. Pharmacokinetic-pharmacodynamic  
 224 comparison of amphotericin B (AMB) and two lipid-associated AMB prepara-  
 225 tions, liposomal AMB and AMB lipid complex, in murine candidiasis models.  
 226 Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:674-84.
- 227 2. Andes D, van Ogtrop M. Characterization and quantitation of the pharmaco-  
 228 dynamics of fluconazole in a neutropenic murine disseminated candidiasis  
 229 infection model. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2116-20.
- 230 3. Arendrup M, Horn T, Fridmodt-Møller N. In vivo pathogenicity of eight medically  
 231 relevant *Candida* species in an animal model. Infection. 2002;30:286-91.
- 232 4. Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, et al.  
 233 Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*.  
 234 Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2719-27.
- 235 5. Cantón E, Pemán J, Sastre M, Romero M, Espinel-Ingroff A. Killing kinetics of  
 236 caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*.  
 237 Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2829-32.
- 238 6. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution  
 239 antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Document M27-  
 240 A3. 3rd ed. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- 241 7. Di Bonaventura G, Spedicato I, Picciani C, D'Antonio D, Piccolomini R. In vitro  
 242 pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole,  
 243 and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species  
 244 from patients with hematologic malignancies. Antimicrob Agents Chemother.  
 245 2004;48:4453-6.
- 246 8. Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, et al. In  
 247 vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global  
 248 collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution  
 249 methods. J Clin Microbiol. 2009;47:3170-7.
- 250 9. Dick JD, Rosengard BR, Merz WG, Stuart RK, Hutchins GM, Saral R. Fatal dissem-  
 251 inated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida guilliermondii*. Ann  
 252 Intern Med. 1985;102:67-8.
- 253 10. Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D, Luther MF. Granulocyte  
 254 colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis:  
 255 role of immune suppression. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:2467-73.
- 256 11. Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human  
 257 infections due to uncommon fungi. J Antimicrob Chemother. 2011;66:1447-66.
- 258 12. Kovacicova G, Hanzen J, Pisarcikova M, Sejnova D, Horn J, Babela R, et al. Nosocomial  
 259 fungemia due to amphotericin B-resistant *Candida* spp. in three pediatric  
 260 patients after previous neurosurgery for brain tumors. J Infect Chemother.  
 261 2001;7:45-8.
- 262 13. Masala L, Luzzati R, Maccacaro L, Antozzi L, Concia E, Fontana R. Nosocomial cluster  
 263 of *Candida guilliermondii* fungemia in surgical patients. Eur J Clin Microbiol  
 264 Infect Dis. 2003;22:686-8.
- 265 14. Ortoneda MJ, Capilla J, Pastor FJ, Guarro J. Interaction of granulocyte colony-  
 266 stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment  
 267 of systemic murine scedosporiosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;50:247-51.
- 268 15. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN. Triazole and  
 269 echinocandin MIC distributions with epidemiological cutoff values for differen-  
 270 tiation of wild-type strains from non-wild-type strains of six uncommon species  
 271 of *Candida*. J Clin Microbiol. 2011;49:3800-4.

- 272 16. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2846–56. 273  
274  
275 17. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, et al., CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat.* 2011;14:164–76. 276  
277  
278 18. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al., Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1366–77. 279  
280  
281 19. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, et al., Global Antifungal Surveillance Group. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3551–6. 282  
283  
284 20. Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin Microb Rev.* 2004;17:268–80. 285  
286  
287  
288  
289  
290  
291
21. Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Mayayo E, Quindós G, Carillo AJ, et al. Anidulafungin in treatment of experimental invasive infection by *Candida parapsilosis*: in vitro activity, (1→3)-beta-D-glucan and mannan serum levels, histopathological findings, and in vivo efficacy. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2011;55:4985–9. 292  
293  
294  
295  
296  
297 22. Savini V, Catavittello C, Onofrillo D, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, et al. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses.* 2011;54:434–41. 298  
299  
300  
301 23. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al., ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl. 7:53–67. 302  
303  
304  
305  
306 24. Vazquez JA, Lundstrom T, Dembry L, Chandrasekar P, Boikov D, Parri MB, et al. Invasive *Candida guilliermondii* infection: in vitro susceptibility studies and molecular analysis. *Bone Marrow Transplant.* 1995;16:849–53. 307  
308  
309 25. Wiederhold NP, Tam VH, Chi J, Prince RA, Kontoyiannis DP, Lewis RE. Pharmacodynamic activity of amphotericin B deoxycholate is associated with peak plasma concentrations in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2006;50:469–73. 310  
311  
312

UNCORRECTED PROOF

#### **4.4 Virulence of *Curvularia* in a murine model**

Paredes K, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Guarro J

*Mycoses*. 2013, 56:512-515



## Virulence of *Curvularia* in a murine model

Katihuska Paredes,<sup>1</sup> Javier Capilla,<sup>1</sup> Deanna A. Sutton,<sup>2</sup> Emilio Mayayo,<sup>3</sup> Annette W. Fothergill<sup>2</sup> and Josep Guarro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, <sup>2</sup>Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA and <sup>3</sup>Unitat de Anatomia Patològica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

### Summary

We have evaluated the virulence of two clinically relevant species of *Curvularia*; *Curvularia spicifera* and *C. hawaiiensis*, using an experimental model of disseminated infection in immunocompromised mice. Several inocula were tested over a range  $1 \times 10^3$ – $1 \times 10^6$  colony-forming units/animal. Both species had a similar behaviour, producing a high mortality. Tissue burden and histopathology studies demonstrated that lung was the organ most affected.

**Key words:** Animal model, fungal infections, *Bipolaris*, *Curvularia*.

### Introduction

Phaeohyphomycoses are infections caused by a large and heterogeneous group of melanised fungi that include over 150 species,<sup>1</sup> most of them well-known plant pathogens commonly found in soil and plant debris. *Curvularia* is one of the most relevant genera of this group, which has frequently been involved in human infections. On the basis of molecular studies, the taxonomy of this genus has recently undergone sweeping changes. Some species that were formerly included in the genus *Bipolaris*, characterised by having small, septate, often curved conidia, have been reaccommodated into *Curvularia*.<sup>2</sup> These species, are often associated with allergic sinusitis,<sup>3–5</sup> allergic bronchopulmonary disease,<sup>6,7</sup> infections affecting the central nervous system,<sup>8–10</sup> the eyes,<sup>11–13</sup> skin,<sup>14,15</sup> deep local infections<sup>16,17</sup> and disseminated infections in both immunocompromised<sup>18</sup> and immunocompetent patients.<sup>18,19</sup> Despite their relative rarity, their prevalence has increased in recent years.<sup>20,21</sup>

Due to the scarce clinical and experimental data on the pathogenicity of *Curvularia*, the aim of this study was to develop a murine model of invasive infection to evaluate and compare the virulence of the two clinically relevant species, *C. spicifera* and *C. hawaiiensis*.

### Materials and methods

Four clinical isolates, two belonging to *C. spicifera* (UTHSC 06-4551 from frontal sinus, UTHSC 09-3102 from maxillary sinus) and two to *C. hawaiiensis* (UTHSC 07-3226 from lung, UTHSC 10-2694 from frontal sinus) were used in this study. The strains were grown on oat agar plates (30 g of filtered oatmeal and 15 g of agar per litre of distilled water) for 12 days at room temperature. On the day of infection, cultures were flooded with sterile saline and the resulting conidial suspension filtered through sterile gauze to remove clumps of cells and hyphae. The suspensions were adjusted by haemocytometer count. To confirm viability, samples were diluted 10-fold and cultured onto Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC), which restricts rapid colony development of these fungi. Inocula were adjusted to the desired concentration based on conidia viability.

Male OF-1 mice (Charles River; Criffa SA, Barcelona, Spain) with a mean weight of 30 g were used in the experiment. Mice were housed, in standard boxes with free access to food and water. All animal procedures

*Correspondence:* J. Capilla, Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain.

Tel.: +977 759 350. Fax: +977 759 322.

E-mail: javier.capilla@urv.cat

Submitted for publication 7 December 2012

Revised 1 February 2013

Accepted for publication 1 February 2013



were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Mice were immunosuppressed 1 day prior to infection, by an intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg kg<sup>-1</sup> of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk SA, Barcelona, Spain) plus 150 mg kg<sup>-1</sup> of 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma SA, Barcelona, Spain) given intravenously (i.v.).<sup>22,23</sup> To prevent bacterial infections, mice received 5 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> of ceftazidime subcutaneously.

In a preliminary experiment, strain UTHSC 09-3102 of *C. spicifera* was selected randomly to carry out a dose-escalation study. Groups of eight immunosuppressed mice were challenged i.v., with viable conidial suspensions at 1 × 10<sup>6</sup>, 1 × 10<sup>5</sup>, 1 × 10<sup>4</sup> or 1 × 10<sup>3</sup> colony-forming units (CFU) in 0.2 ml of sterile saline solution injected into the lateral tail vein. Mice were checked twice a day and mortality was recorded for 30 days.

The inoculum that caused an acute infection, in which all the animals died between 5 and 10 days, was used to compare the virulence of the four strains. For survival studies, groups of eight animals were established for each strain. Mortality was recorded daily until the end of the experiment. For tissue burden studies and histopathological analyses, groups of 10 animals were established. Two mice of each group were randomly chosen and sacrificed 24-h postinfection by CO<sub>2</sub> anoxia, whereas the remaining animals were sacrificed on day 5 postinfection. Lung, kidney, spleen, liver and brain were aseptically removed and approximately half of each organ was weighed and homogenised in 2 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated onto DRBC agar and incubated for 3 days at room temperature and the CFU g<sup>-1</sup> of tissue was calculated. The remaining half of each organ was fixed with 10% buffered formalin and then dehydrated, paraffin embedded, sliced into 2 µm sections and stained with haematoxylin-eosin (H-E) and Grocott methenamine silver (GMS) for examination by light microscopy.

### Statistical analysis

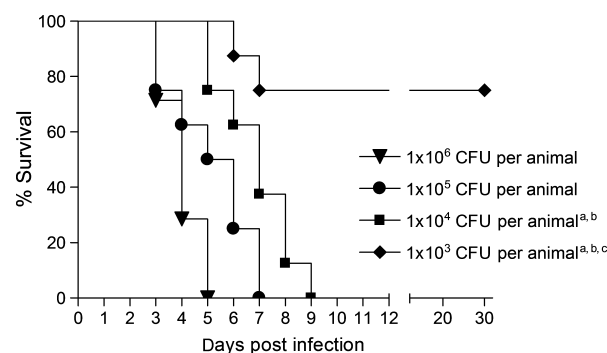
The mean survival times (MST) were estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups by using the log-rank test. In tissue burden studies, colony counts were log<sup>10</sup>-transformed and compared by the two-tailed Mann–Whitney *U*-test, using Graph Pad Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

## Results and discussion

The viability of the conidia was estimated in 73–75%. The results of the dose-escalation study showed a dose-dependent response, with significant differences between the four inocula (*P* < 0.05), except for the two highest inocula (1 × 10<sup>6</sup> and 1 × 10<sup>5</sup> CFU/animal). All the animals infected with the strain of *C. spicifera* UTHSC 09-3102 died within 10 days with the exception of those infected with 1 × 10<sup>3</sup> CFU/animal, 75% of which survived to the end of the experiment, whereas with an inoculum of 1 × 10<sup>4</sup> CFU/animal, the MST was of 6.8 days and the mortality was 100% at day 10 postinfection. The MST of mice infected with the inocula of 1 × 10<sup>6</sup> and 1 × 10<sup>5</sup> CFU/animal was 3 and 6 days respectively (Fig. 1). Therefore, the inoculum of 1 × 10<sup>4</sup> CFU/animal was chosen to evaluate and compare the virulence of the four strains. Mice infected with that inoculum, all died within 5–9 days with no significant differences among strains tested, with the exception of those infected with UTHSC 09-3102, which had the lowest MST (6 days) (Fig. 2).

On day 5 postinfection, the lungs were the most affected organs with each of the four strains, with no significant differences among them. The fungal load in the lungs was significantly higher than in other organs for all the strains tested (*P* ≤ 0.0002), followed by kidneys where only the mice infected with *C. hawaiiensis* UTHSC 10-2694 had significant differences in fungal loads (*P* = 0.02) with respect to those infected with *C. spicifera* (UTHSC 06-4551, UTHSC 09-3102). The brain, spleen and liver showed either considerably lower or no detectable fungal loads (Fig. 3).

Histological findings confirmed the results obtained in tissue burden studies, with lungs being the most affected organ in each of all the four strains tested.



**Figure 1** Cumulative mortality of immunosuppressed mice infected with *Curvularia spicifera* UTHSC 09-3102. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. 1 × 10<sup>6</sup> CFU/animal; <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs. 1 × 10<sup>5</sup> CFU/animal; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs. 1 × 10<sup>4</sup> CFU/animal.

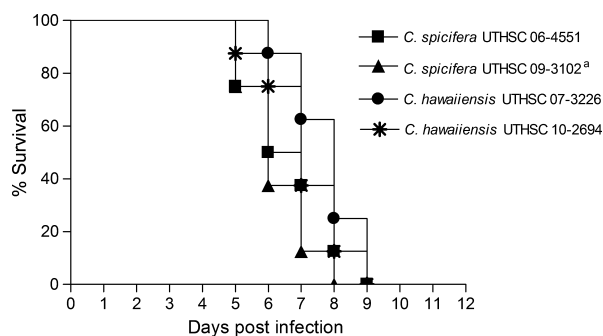
K. Paredes *et al.*

Animals sacrificed at 24-h postinfection showed conidia trapped in the lung alveoli (Fig. 4a). The brain, spleen and liver did not reveal the presence of fungal elements nor inflammatory changes. At day 5 postinfection, sections of lungs showed dispersed dark fungal cells, granulomata composed of multinucleated giant cells and histiocytes surrounding septate dematiaceous hyphae, whereas no inflammatory response or signs of necrosis were observed (Fig. 4b). The kidney showed glomerular and tubular invasion by dematiaceous

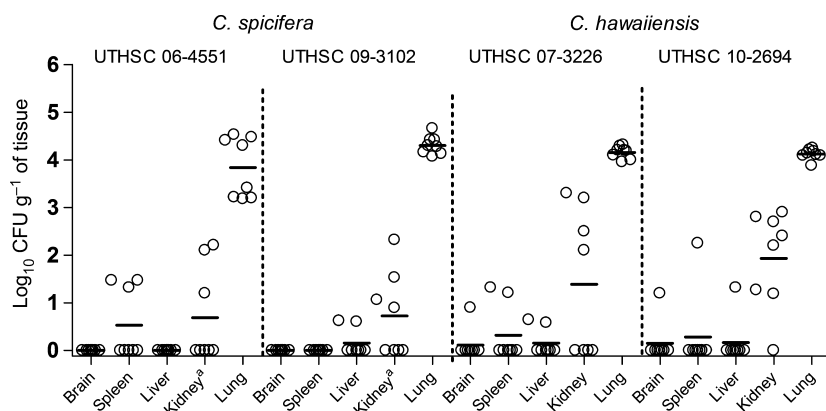
hyphae with signs of necrosis, but with no inflammatory response.

Previous experimental studies with *Curvularia* have demonstrated the ability of this fungus to cause infection.<sup>24,25</sup> However, this is the first study that develops a murine model of disseminated infection in immunosuppressed host to explore the virulence of *C. spicifera* and *C. hawaiiensis*, the most relevant clinical species previously included in genus *Bipolaris*.

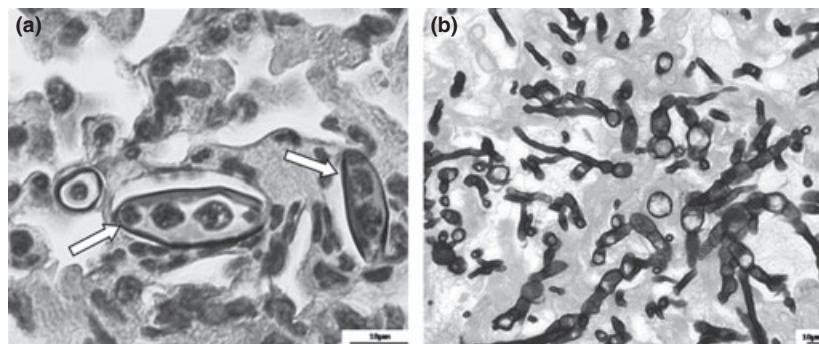
Our animal model showed that inocula of  $1 \times 10^4$  CFU/animal were able to invade and proliferate in immunosuppressed mice, killing the animals quickly. Animals infected by both species had a high fungal load, especially in lungs and, to a lesser degree, in kidneys. There was severe tissue damage that was confirmed by histopathological findings, which agrees with previous studies in animal models.<sup>24,25</sup> The ability of *Curvularia* to affect mainly lung tissue can be explained by the large conidial size in these species, which can reach 40  $\mu\text{m}$  in length and 14  $\mu\text{m}$  in width,<sup>26</sup> and become trapped in the pulmonary alveoli causing serious lung dysfunction. These findings correlate with clinical reports of disseminated infection by these fungi, where chest-computed tomography revealed lesions mainly in the lungs and pulmonary infiltrates.<sup>27-29</sup> Other organs tested were not



**Figure 2** Cumulative mortality of immunosuppressed mice infected with  $1 \times 10^4$  CFU/animal of *Curvularia* spp. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. *C. hawaiiensis* UTHSC 07-3226.



**Figure 3** Tissue burden in lung, spleen, kidney, brain and liver 5 days postinfection of mice challenged with four strains of *Curvularia*. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. UTHSC 10-2694. Horizontal lines indicate median values.



**Figure 4** Lung sections of neutropenic mice infected with *C. spicifera* UTHSC 09-3102. (a) Conidia (arrows) in pulmonary alveoli in mice sacrificed at 24 h after infection (haematoxylin-eosin, magnification  $\times 1000$ ). (b) Invasion by fungal elements 5 days postinfection (Grocott methenamine silver, magnification  $\times 400$ ).

affected, probably because only very few conidia that were not retained in lungs were able to reach these organs which were extracted before visible tissue lesions had been produced.

In conclusion, our results show that both *C. spicifera* and *C. hawaiiensis* possess high virulence for mice, and that there were no important differences between the high fungal loads in the lung. The high level of mortality caused by these species indicates a need for further studies to better assess their pathogenicity and to evaluate treatment regimens for infections caused by these species.

### Conflict of interest

No conflict of interest.

### References

- Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clin Microb Rev* 2010; **23**: 884–928.
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EH *et al.* A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 2012; **56**: 131–44.
- Castelnuovo P, de Bernardi F, Cavanna C *et al.* Invasive fungal sinusitis due to *Bipolaris hawaiiensis*. *Mycoses* 2004; **47**: 76–81.
- Fryen A, Mayser P, Glanz H, Füssle R, Breithaupt H, de Hoog GS. Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris (Drechslera) hawaiiensis*. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; **256**: 330–4.
- Taguchi K, Oharaseki T, Yokouchi Y *et al.* Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris spicifera* and *Schizophyllum commune*. *Med Mycol* 2007; **45**: 559–64.
- Chowdhary A, Randhawa H, Singh V *et al.* *Bipolaris hawaiiensis* as etiologic agent of allergic bronchopulmonary mycosis: first case in a pediatric patient. *Med Mycol* 2011; **49**: 760–5.
- Dyer ZA, Wright RS, Rong IH, Jacobs A. Back pain associated with endobronchial mucus impaction due to *Bipolaris australiensis* colonization representing atypical allergic bronchopulmonary mycosis. *Med Mycol* 2008; **46**: 589–94.
- Filizzola MJ, Martinez F, Rauf SJ. Phaeohiphomycosis of the central nervous system in immunocompetent hosts: report of a case and review of the literature. *Int J Infect Dis* 2003; **7**: 282–6.
- Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG. Primary central nervous system phaeohiphomycosis: a review of 101 cases. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 206–16.
- Viola GM, Sutton R. Allergic fungal sinusitis complicated by fungal brain mass. *Int J Infect Dis* 2010; **14** (Suppl. 3): 299–301.
- Saha R, Das S. *Bipolaris* keratomycosis. *Mycoses* 2005; **48**: 453–5.
- Durkin SR, Henderson T, Raju R, Ellis D. Successful treatment of phaeohiphomyotic keratitis caused by *Bipolaris australiensis*. *Clin Exp Ophthalmol* 2008; **36**: 697–9.
- Bashir G, Hussain W, Rizvi A. *Bipolaris hawaiiensis* keratomycosis and endophthalmitis. *Mycopathologia* 2009; **167**: 51–3.
- Bilu D, Movahedi-Lankarani S, Kazin RA, Shields C, Moresi M. Cutaneous *Bipolaris* infection in a neutropenic patient with acute lymphoblastic leukemia. *J Cutan Med Surg* 2004; **8**: 446–9.
- Moore ML, Collins GR, Hawk BJ, Russell T. Disseminated *Bipolaris spicifera* in a neonate. *J Perinatol* 2001; **21**: 399–401.
- Bava AJ, Fayad A, Cespedes C, Sandoval M. Fungal peritonitis caused by *Bipolaris spicifera*. *Med Mycol* 2003; **41**: 529–31.
- Gadallah MF, White R, el-Shahawy MA, Abreo F, Oberle A, Work J. Peritoneal dialysis complicated by *Bipolaris hawaiiensis* peritonitis: successful therapy with catheter removal and oral itraconazole without the use of amphotericin-B. *Am J Nephrol* 1995; **15**: 348–52.
- Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, Pullen R, Rinaldi MG. Disseminated phaeohiphomycosis: review of an emerging mycosis. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 467–76.
- Kobayashi H, Sano A, Aragane N *et al.* Disseminated infection by *Bipolaris spicifera* in an immunocompetent subject. *Med Mycol* 2008; **46**: 361–5.
- El Khizzi N, Bakheshwain S, Parvez S. *Bipolaris*: a plant pathogen causing human infections: an emerging problem in Saudi Arabia. *Res J Microbiol* 2010; **5**: 212–7.
- da Cunha KC, Sutton DA, Fothergill AW *et al.* Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their antifungal susceptibility profiles. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 4061–6.
- Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D, Luther MF. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2467–73.
- Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Guarro J. Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **50**: 247–51.
- Fuste FJ, Ajello L, Threlkeld M, Henry JE. *Drechslera hawaiiensis*: causative agent of a fatal fungal meningo-encephalitis. *Sabouraudia* 1973; **11**: 59–63.
- Yoshimori R, Moore R, Itabashi HH, Fujikawa DG. Phaeohiphomycosis of brain: granulomatous encephalitis caused by *Drechslera spicifera*. *Am J Clin Pathol* 1982; **77**: 363–70.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (eds). *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and University Rovira i Virgili, Reus, Spain, 2000.
- Karim M, Sheikh H, Alam M, Sheikh Y. Disseminated *Bipolaris* infection in an asthmatic patient: case report. *Clin Infect Dis* 1993; **17**: 248–53.
- Flanagan KL, Bryceson AD. Disseminated infection due to *Bipolaris australiensis* in a young immunocompetent man: case report and review. *Clin Infect Dis* 1997; **25**: 311–3.
- Khan JA, Hussain ST, Hasan S, McEvoy P, Sarwari A. Disseminated *Bipolaris* infection in an immunocompetent host: an atypical presentation. *J Pak Med Assoc* 2000; **50**: 68–71.

#### **4.5 Experimental treatment of *Curvularia* infection**

Paredes K, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Guarro J

Enviado a Diagnostic Microbiology and Infectious Disease



1     **Title: Experimental treatment of *Curvularia* infection.**

2

3

4     **Running title:** Antifungal therapies against *Curvularia* infection.

5

6

7

8

9

10

11

12     Katihuska Paredes<sup>1</sup>, Javier Capilla<sup>1</sup>, Deanna A. Sutton<sup>3</sup>, Emilio Mayayo<sup>2</sup>, Annette W. Fothergill<sup>3</sup>,  
13     and Josep Guarro<sup>1#</sup>.

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

16     Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas,  
17     USA<sup>3</sup>.

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27     # Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina,  
28     Universitat Rovira i Virgili. Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone 0034-977-  
29     759350. Fax: 0034-977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat

30

31 **Abstract**

32 We have evaluated the efficacy of amphotericin B, posaconazole, and voriconazole in  
33 immunosuppressed murine models of disseminated infection by *Curvularia spicifera* and  
34 *Curvularia hawaiiensis*. The three antifungals improved survival of mice in comparison to  
35 controls; however, only the two azoles were able to reduce significantly the fungal load.

36

37

38

39 **Keywords:** *Curvularia*, *Bipolaris hawaiiensis*, *Bipolaris spicifera*, animal model, fungal infection

40

## 41 **Introduction**

42 *Curvularia* is one of the most relevant genera of dematiaceous fungi involved in  
43 phaeohyphomycosis. Despite allergic fungal sinusitis being the most common clinical  
44 manifestation attributed to this genus (Alvarez et al., 2011; Fryen et al., 1999), a wide variety of  
45 infections (Bashir et al., 2009; Bilu et al., 2004; Castelnuovo et al., 2004; Viola and Sutton,  
46 2010), including disseminated disease in both immunocompromised and immunocompetent  
47 patients (Kobayashi et al., 2008; Revankar et al., 2002), have been linked to *Curvularia*. Based  
48 on molecular studies, the taxonomy of *Curvularia* recently underwent important changes and  
49 some species formerly included in the genus *Bipolaris* i.e., *B. spicifera* and *B. hawaiiensis*, have  
50 been re-accommodated into *Curvularia* (Manamgoda et al., 2012). Although infections by this  
51 genus are still rare, they have increased in recent years (da Cunha et al., 2012; El Khizzi et al.,  
52 2010).

53 Due to the scarcity of clinical cases, the treatment of choice for these infections has not yet  
54 been established. *In vitro* studies have shown variable activity of amphotericin B (AMB),  
55 although the newest azoles, posaconazole (PSC) and voriconazole (VRC) have shown good  
56 activity (da Cunha et al., 2012; Revankar and Sutton, 2010). Since there is no experimental *in*  
57 *vivo* data on the efficacy of the available antifungal drugs, the aim of this study was to evaluate  
58 the therapeutic efficacy of AMB, PSC and VRC using murine models of disseminated infection  
59 caused by the two species of this genus that are most commonly involved in human infection,  
60 *C. spicifera* and *C. hawaiiensis*.

61

## 62 **Material and methods**

63 **Fungal isolates.** One strain of *C. spicifera* (UTHSC 09-3102, isolated from maxillary sinus) and  
64 one of *C. hawaiiensis* (UTHSC 07-3226, from lung) were included in the study. Both strains  
65 were identified by comparing their internal transcribed spacer (ITS) sequences with those of  
66 reference strains. The *in vitro* antifungal susceptibility tests were carried out following the CLSI  
67 guidelines (CLSI, 2008). The MICs of AMB, PSC and VRC for *C. spicifera* were 0.25 µg/ml, 0.25  
68 µg/ml and 1 µg/ml; and for *C. hawaiiensis* were 0.125 µg/ml, 0.125 µg/ml and 1 µg/ml,  
69 respectively.

70



71 **Inoculum.** Strains were grown on oatmeal agar (OA; 30 g of filtered oat flakes, 20 g of agar, 1  
72 liter of distilled water) for 12 days at room temperature. On the day of infection, cultures were  
73 flooded in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells and hyphae.  
74 The suspensions were adjusted to  $5 \times 10^4$  colony forming units (CFU) per ml by haemocytometer  
75 count and the viability of the inoculum was determined by serial plating onto Dichloran Rose  
76 Bengala Chloramphenicol (DRBC) agar.

77

78 **Infection.** Male OF-1 mice (Charles River; Criffa SA, Barcelona, Spain) with a mean weight of  
79 30 g were used in the experiment. Mice were housed in standard boxes with food and water *ad*  
80 *libitum*. All animal procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili  
81 Animal Welfare and Ethics Committee. Animals were immunosuppressed 1 day prior to the  
82 infection by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of body weight of  
83 cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk SA, Barcelona, Spain) plus 5-fluorouracil  
84 (Fluorouracilo; Ferrer Farma SA, Barcelona, Spain) at 150 mg/kg given intravenously (i.v.)  
85 (Ortoneda et al., 2004). Mice were challenged i.v., with  $1 \times 10^4$  CFU per animal in a volume of 0.2  
86 ml into the lateral tail vein. Previous studies have shown that this inoculum is able to produce an  
87 acute infection, with all animals dying within 10 days (Paredes et al., 2013).

88

89 **Treatments.** Treatments were selected based on previous studies. AMB (amphotericin B  
90 deoxycholate, Xalabarder Pharmacy, Barcelona, Spain) was administered i.v., at doses of 0.8  
91 mg/kg once a day (QD); PSC (Noxafil; Schering-Plough Ltd., Hertfordshire, United Kingdom) at  
92 20 mg/kg given orally (p.o) by gavage, twice daily (BD) or VRC (Vfend; Pfizer S.A., Madrid,  
93 Spain) at 25 mg/kg p.o., by gavage QD. Mice treated with VRC received from 3 days before  
94 infection, grapefruit juice instead of water (Sugar and Liu, 2000). These doses allowed serum  
95 concentrations above the respective MICs (Calvo et al., 2010b; Warn et al., 2006; Wiederhold et  
96 al., 2006). All therapies began 1 day after challenge and lasted for 7 days. Control animals  
97 received no treatment. To prevent bacterial infections, all animals received ceftazidime at 5  
98 mg/kg day subcutaneously. The efficacy of the treatments was evaluated by prolongation of  
99 survival and reduction of fungal burden and histopathology of lungs, due that it is the most  
100 affected organ in these type of infection (Paredes et al., 2013). For survival studies, groups of 8

101 mice were randomly established for each strain and treatment. Mice were checked twice a day  
102 and mortality was recorded for 15 days. For tissue burden and histopathological studies, groups  
103 of 8 mice were established. In order to compare results, on day 5 post infection, which coincides  
104 with when untreated controls begin to die, mice of both treated and untreated groups were  
105 euthanized by CO<sub>2</sub> anoxia. Lungs were aseptically removed, and approximately half of each  
106 one was weighed and homogenized in 2 ml of sterile saline. Dilutions of the homogenates were  
107 then plated onto DRBC agar and incubated for 3 days at room temperature to determine CFU  
108 per gram of tissue. The remaining half of each organ was fixed with 10% buffered formalin and  
109 then dehydrated, paraffin embedded, and sliced into 2 µm sections, which were then stained  
110 with hematoxylin-eosin (H-E), periodic acid-Schiff (PAS) stain and Grocott methamine silver  
111 (GMS) for examination by light microscopy.

112

113 **Statistical analysis.** The mean survival times (MST) were estimated by the Kaplan-Meier  
114 method and compared among groups by using the log rank test. In tissue burden studies,  
115 colony counts were log<sub>10</sub>-transformed and compared by the two-tailed Mann-Whitney U-test,  
116 using Graph Pad Prism 5 for Windows. *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

117

## 118 **Results and Discussion**

119 Irrespective of the infecting strain, all treatments significantly prolonged survival compared with  
120 the controls (*P* ≤ 0.02) (Fig. 1). Animals receiving PSC or VRC succumbed to the infection  
121 within 10 to 12 days after infection; however, those treated with AMB at 0.8 mg/kg showed  
122 62.5% and 30% of survival after 15 days of infection with *C. spicifera* or *C. hawaiiensis*,  
123 respectively. Although AMB increased slightly the survival over the other therapies, it was only  
124 significant in comparison to those VRC-treated animals infected with *C. spicifera*. For both  
125 strains, AMB was unable to reduce the fungal load in lungs with respect to their controls. On the  
126 other hand, PSC and VRC significantly reduced the fungal load in lungs with respect to controls  
127 (*P* ≤ 0.02) and to AMB (*P* ≤ 0.007), and in the infection by *C. hawaiiensis*, PSC was more  
128 effective than VRC (Fig. 2).

129 The histological study confirmed invasion of lungs by abundant fungal elements. Sections of this  
130 organ from controls and treated mice showed similar histological alteration, with a presence of

131 multinucleated giant cells and histiocytes surrounding septate dematiaceous hyphae, without an  
132 inflammatory response or signs of necrosis.

133 Disseminated phaeohyphomycosis is infrequent in the clinical setting; however, these fungi can  
134 sometimes cause severe and fatal infections including important outbreaks like the recent USA  
135 multi-state outbreak by contaminated methylprednisolone injections with already 700 cases of  
136 meningitis or other central nervous system infections, mostly related to the dematiaceous  
137 fungus *Exserohillum rostratum*, morphologically similar to *Curvularia*. The initial  
138 recommendations by the Centers for Disease Control and Prevention for overcoming the crisis,  
139 include VRC and liposomal amphotericin B; however, 64 deaths have been reported so far  
140 (Stevens, 2013; CDC, 2013). *Exserohillum* and *Curvularia* produce infections that are difficult to  
141 treat principally because of the lack of clinical experience. Moreover, the *in vitro* data is scarce  
142 and often reported before to the current standardized methodology of susceptibility testing. In  
143 general, the drugs tested showed high MICs, although a recent study showed that azoles, with  
144 the exception of fluconazole, AMB and echinocandins have good activity against most  
145 *Curvularia* spp, (da Cunha et al., 2012), but clinical breakpoints have not been established for  
146 these species. In a retrospective review of 72 cases of disseminated phaeohyphomycosis,  
147 *Curvularia* and *Bipolaris* were the most common genera (15.2%) after *Scedosporium prolificans*,  
148 causing disseminated infections in immunocompetent and immunocompromised patients with a  
149 mortality rate of 72.7% despite aggressive antifungal therapy (Revankar et al., 2002). There are  
150 no standard therapies associated with favourable patient's outcome against disseminated  
151 *Curvularia* infections. In the absence of relevant clinical data on the management of these  
152 infections, animal models can play an important role in the assessment of the predictive value of  
153 the *in vitro* data (Guarro, 2011). No therapy has been experimentally tested previously against  
154 *Curvularia* infection. In the present study, despite the two strains tested showing low MICs, no  
155 remarkable antifungal efficacy was observed. All the treatments were able to prolong mice  
156 survival for both species, although mice treated with azoles died within 12 days. By contrast,  
157 fungal burden was reduced modestly only by the two azoles.

158 It is likely that lower counts could be obtained with more days of treatment but due to the early  
159 death of the untreated animals and in order to compare fungal loads between them and the  
160 treated ones at same day post infection, the latest only received 5 doses of treatment. The

161 relatively good efficacy of PSC agrees with previous experimental studies of disseminated  
162 infections produced by other dematiaceous fungi such as *Fonsecaea*, *Exophiala* and *Wangiella*  
163 species (Calvo et al., 2010a, 2010b; Graybill et al., 2004; Rivard et al., 2007), which  
164 demonstrate the usefulness of this drug for the treatment of infections by pigmented fungi  
165 (Guarro, 2011). In clinical practice, infections by *Curvularia/Bipolaris* are rare and AMB has been  
166 the standard therapy. Unfortunately, the treatment often fails and its associated toxicity limits its  
167 use (Revankar and Sutton, 2010). Concerning the new triazoles, a few cases have been  
168 reported on the efficacy of itraconazole (Flanagan and Bryceson, 1997; Vásquez-del-Mercado  
169 et al., 2013) and VRC (Kobayashi et al., 2008; Rosow et al., 2011; Skovrlj et al., 2013) but not  
170 on the efficacy of PSC for treating *Curvularia* infections. In conclusion, the present study has  
171 demonstrated the poor activity of AMB in treating these types of infections and the potential  
172 usefulness and PSC and VRC, which requires further studies for confirmation.

173

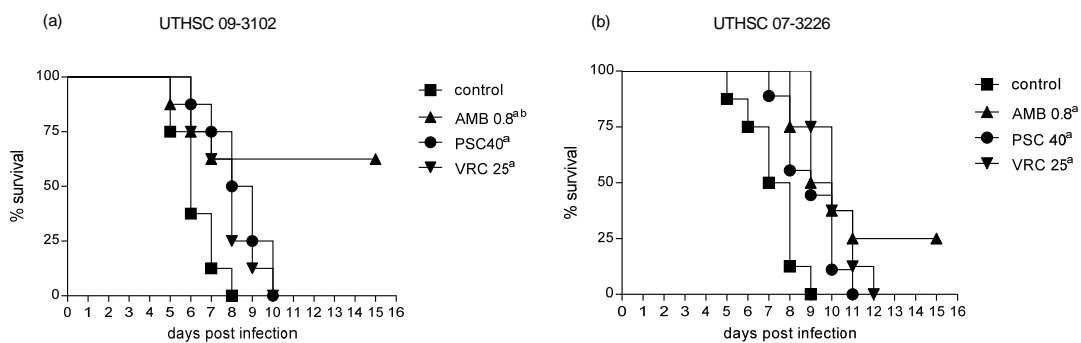
#### 174 **References**

- 175 Alvarez VC, Guelfand L, Pidone JC, Soloaga R, Ontivero P, Margari A, López Daneri G.  
176 Rinosinusitis alérgica fúngica causada por *Curvularia* sp. Rev Iberoam Micol  
177 2011;28:104-6.
- 178 Bashir G, Hussain W, Rizvi A. *Bipolaris hawaiiensis* keratomycosis and endophthalmitis.  
179 Mycopathologia 2009;167:51-3.
- 180 Bilu D, Movahedi-Lankarani S, Kazin RA, Shields C, Moresi M. Cutaneous *Bipolaris* infection in  
181 a neutropenic patient with acute lymphoblastic leukemia. J Cutan Med Surg  
182 2004;8:446–9.
- 183 Calvo E, Pastor FJ, Guarro J. Antifungal therapies in murine disseminated phaeohyphomycoses  
184 caused by *Exophiala* species. J Antimicrob Chemother 2010a;65:1455–9.
- 185 Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM, Mayayo E, Salas V, Guarro J. Murine model of a  
186 disseminated infection by the novel fungus *Fonsecaea monophora* and successful  
187 treatment with posaconazole. Antimicrob Agents Chemother 2010b;54:919-23.
- 188 Castelnovo P, De Bernardi F, Cavanna C, Pagella F, Bossolesi P, Marone P, Farina C. Invasive  
189 fungal sinusitis due to *Bipolaris hawaiiensis*. Mycoses 2004;47:76–81.

190

- 191 Centers for Disease Control and Prevention. Multistate fungal meningitis outbreak investigation.  
192 Current case count. <http://www.cdc.gov/hai/outbreaks/meningitis-map-large.html>.  
193 Accessed 27 November 2013.
- 194 Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal  
195 susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard-second edition M38-A2.  
196 Wayne, PA; CLSI; 2008.
- 197 da Cunha CK, Sutton DA, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Madrid H, De Hoog S, Crous PW,  
198 Guarro J. Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their  
199 antifungal susceptibility profiles. *J Clin Microbiol* 2012;50:4061-6.
- 200 El Khizzi N, Bakheshwain S, Parvez S. *Bipolaris*: a plant pathogen causing human infections: an  
201 emerging problem in Saudi Arabia. *Res J Microbiol* 2010;5:212-7.
- 202 Flanagan KL, Bryceson AD. Disseminated infection due to *Bipolaris australiensis* in a young  
203 immunocompetent man: case report and review. *Clin Infect Dis* 1997;25:311-3.
- 204 Fryen A, Mayser P, Glanz H, Füssle R, Breithaupt H, de Hoog GS. Allergic fungal sinusitis  
205 caused by *Bipolaris (Drechslera) hawaiiensis*. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999;256:330-  
206 4.
- 207 Graybill JR, Najvar LK, Johnson E, Bocanegra R, Loebenberg D. Posaconazole therapy of  
208 disseminated phaeohyphomycosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother*  
209 2004;42: 2288-91.
- 210 Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to  
211 uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1447-66.
- 212 Kobayashi H, Sano A, Aragane N, Fukuoka M, Tanaka M, Kawaura F, Fukuno Y, Matsuishi E,  
213 Hayashi S. Disseminated infection by *Bipolaris spicifera* in an immunocompetent  
214 subject. *Med Mycol* 2008;46: 361-5.
- 215 Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EH, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas R, Tan YP,  
216 Hyde KD. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris*—*Cochliobolus*-  
217 *Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 2012;56:131-44.
- 218 Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Guarro J. Interaction of granulocyte colony-stimulating factor  
219 and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine  
220 scedosporiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50:247-51.

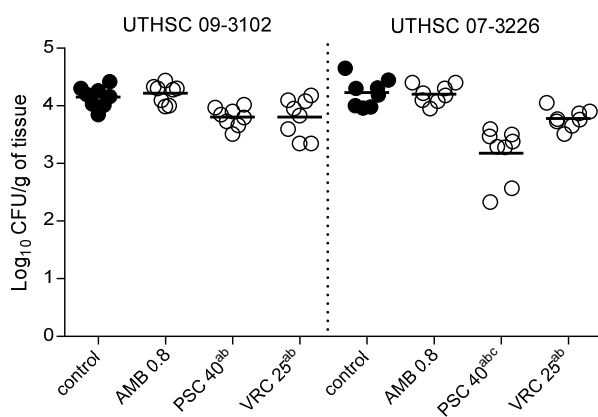
- 221 Paredes K, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Guarro J. Virulence of *Curvularia* in  
222 a murine model. *Mycoses* 2013;56:512-5.
- 223 Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, Pullen R, Rinaldi MG. Disseminated  
224 phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. *Clin Infect Dis* 2002;34:467–76.
- 225 Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:884-  
226 928.
- 227 Rivard RG, McCall S, Griffith ME, Hawley JS, Ressner RA, Borra H, Moon JE, Beckius ML,  
228 Murray CK, Hospenthal DR. Efficacy of caspofungin and posaconazole in a murine  
229 model of disseminated *Exophiala* infection. *Med Mycol* 2007;45:685-9.
- 230 Rosow L, Jiang JX, Deuel T, Lechpammer M, Zamani AA, Milner DA, Folkerth R, Marty FM,  
231 Kesari S. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris spicifera* after heart  
232 transplantation. *Transpl Infect Dis* 2011;13:419-23.
- 233 Skovrlj B, Haghghi M, Smethurst ME, Caridi J, Bederson JB. *Curvularia* abscess of the  
234 brainstem: a case report. *World Neurosurg* 2013 doi:10.1016/j.wneu.2013.07.014
- 235 Stevens DA. Reflections on the approach to treatment of a mycologic disaster. *Antimicrob*  
236 *Agents Chemother* 2013;57:1567-72.
- 237 Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse.  
238 *Med Mycol* 2000;38:209–13.
- 239 Vásquez-del-Mercado E, Lammoglia L, Arenas R. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to  
240 *Curvularia lunata* in a renal transplant patient. *Rev Iberoam Micol* 2013;30:116-8.
- 241 Viola GM, Sutton R. Allergic fungal sinusitis complicated by fungal brain mass. *Int J Infect Dis*  
242 2010;14 Suppl 3: 299-301
- 243 Warn PA, Sharp A, Mosquera J, Spickermann J, Schmitt-Hoffmann A, Heep M, Denning DW.  
244 Comparative *in vivo* activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557,  
245 in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J Antimicrob*  
246 *Chemother* 2006;58:1198-207.
- 247 Wiederhold NP, Tam VH, Chi J, Prince RA, Kontoyiannis DP, Lewis RE. Pharmacodynamic  
248 activity of amphotericin B deoxycholate is associated with peak plasma concentrations  
249 in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents*  
250 *Chemother* 2006;50:469-73.



251

252 Fig. 1 Cumulative mortality of immunosuppressed mice infected with  $1 \times 10^4$  CFU of *C. spicifera*  
 253 UTHSC 09-3102 (A) and *C. hawaiiensis* UTHSC 07-3226 (B). AMB 0.8, amphotericin B at 0.8  
 254 mg/kg QD; PSC 40, posaconazole at 20 mg/kg BD; VRC 25, voriconazole at 25 mg/kg QD. <sup>a</sup>  $P$   
 255  $< 0.05$  versus control, <sup>b</sup>  $P < 0.05$  versus VRC 25.

256



257

258 Fig. 2 Effect of antifungal treatments on colony counts of *C. spicifera* UTHSC 09-3102 and *C.*  
 259 *hawaiiensis* UTHSC 07-3226 in lungs of immunosuppressed mice. AMB 0.8, amphotericin B at  
 260 0.8 mg/kg QD; PSC 40, posaconazole at 20 mg/kg BD; VRC 25, voriconazole at 25 mg/kg QD.  
 261 Horizontal lines indicate median values. <sup>a</sup>  $P < 0.05$  versus control; <sup>b</sup>  $P < 0.05$  versus AMB 0.8; <sup>c</sup>  
 262  $P < 0.05$  versus VRC.

263

#### **4.6. Virulence of *Scopulariopsis* and experimental treatment of invasive infection**

Paredes K, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Guarro J

En preparación





1 **Virulence of *Scopulariopsis* and experimental treatment of invasive infection**

2

3

4 **Runnig title:** Virulence of *Scopulariopsis* species

5

6

7

8

9 Katihuska Paredes<sup>1</sup>, Javier Capilla<sup>1#</sup>, Deanna A. Sutton<sup>3</sup>, Emilio Mayayo<sup>2</sup> and Josep Guarro<sup>1</sup>

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

12 Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas,  
13 USA<sup>3</sup>.

14

15

16

17

18

19

20

21 # Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina,  
22 Universitat Rovira i Virgili. Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone 0034-977-  
23 759350. Fax: 0034-977-759322. E-mail: javier.capilla@urv.cat

24

25 **Abstract:**

26 We have evaluated and compared the virulence *S. brevicaulis* and *S. brumptii*, the most  
27 clinically relevant species by developing a model of disseminated infection in  
28 immunosuppressed mice. *Scopulariopsis brumptii* was the species causing the highest  
29 mortality. Tissue burden and histopathology studies showed the great ability of these species  
30 for invading all the organs tested. These models could be useful for testing new therapies  
31 against *Scopulariopsis* infection.

32

33

34

35 **Keywords:** animal model, fungal infection, treatment *Scopulariopsis*

36

## 37 **Introduction**

38 The genus *Scopulariopsis* (Teleomorph *Microascus*) constitutes a group of ascomycetes that  
39 includes both hialine and melanized species. They are soil saprophytes with a wide geographic  
40 distribution, commonly isolated from the air, wood, decaying organic matter, manure and animal  
41 remains (de Hoog *et al*, 2011). They are occasionally involved in human infection, mainly  
42 related to onychomycosis (Bonifaz *et al*, 2007; Issakainen *et al*, 2007), keratitis (Aydin *et al*,  
43 2007), otomycoses (Issakainen *et al*, 2010), cutaneous infections (Wu *et al*, 2009) and  
44 disseminated disease in immunosuppressed (Yang *et al*, 2012; Iwen *et al*, 2012) and  
45 immunocompetent patients (Hart *et al*, 2001), showing a high mortality associated. The species  
46 most commonly found in clinical specimens are *Scopulariopsis acremonium*, *Scopulariopsis*  
47 *brevicaulis*, *Scopulariopsis brumptii*, *Scopulariopsis candida* and the teleomorphs *Microascus*  
48 *cirrosus* and *Microascus cinereus* the species commonly related with human infection (Iwen *et*  
49 *al*, 2012 Sandoval-Denis *et al*, 2013). The main concern of the infections caused by these fungi  
50 lays in their high resistance to antifungal drugs. Different *in vitro* antifungal susceptibility studies  
51 have shown high rates of resistance of these fungi to practically all currently used antifungal  
52 agents, including amphotericin B (AMB) (Aguilar *et al.*, 1999; Cuenca-Estrella *et al.*,2006;  
53 Sandoval-Denis *et al*, 2013). Very scarce information exists about clinical and experimental data  
54 on the pathogenicity and the management of infections by *Scopulariopsis*. For this reason, the  
55 aim of this study was to develop a murine model of invasive infection to determine and compare  
56 the virulence of the two most clinically relevant species, *S. brumptii* and *S. brevicaulis* and to  
57 evaluate the efficacy of liposomal amphotericin B (LAMB), voriconazole (VRC) and  
58 posaconazole (PSC).

59

## 60 **Materials and methods**

### 61 **Fungal isolates**

62 Two strains of *S. brevicaulis* (UTHSC 10-2899 from synovial fluid, UTHSC 08-2981 from aorta  
63 tissue) and two of *S. brumptii* (UTHSC 09-482 from BAL, UTHSC 09-2391 from sputum), were  
64 included in this study. The isolates were identified by sequencing the D1/D2 domain of the 28S  
65 rRNA gene and a fragment of the elongation factor 1- $\alpha$  gene (EF1- $\alpha$ ) (Sandoval-Denis *et al.*,  
66 2013). The *in vitro* antifungal susceptibility tests were performed following the CLSI guidelines

67 (CLSI, 2008). The MICs of AMB, PSC and VRC for *S. brevicaulis* UTHSC 08-2981 were >16  
68 µg/ml, 2 µg/ml and 4 µg/ml; and for *S. brumptii* UTHSC 09-482 were >16 µg/ml, 1 µg/ml and 4  
69 µg/ml respectively.

70

#### 71 **Virulence study**

72 Fungi were grown on potato-carrot agar (PCA; 20 g each of filtered potatoes and carrots, 20 g  
73 of agar, 1 L of distilled water) for 5 days at 25°C. This is a poor medium that enhances fungal  
74 sporulation. On the day of infection, cultures were flooded with sterile saline and filtered through  
75 sterile gauze to remove clumps of conidia and hyphae. The resulting suspensions were  
76 adjusted by haemocytometer count and by serial plating on PCA to confirm viability.

77 Male OF-1 mice (Charles River; Criffa SA, Barcelona), with a mean weight of 30 g were used in  
78 the test. Mice were housed in standard conditions with *ad libitum* access to food and water. All  
79 animal procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal  
80 Welfare and Ethics Committee.

81 In a preliminary study on both, immunocompetent and immunosuppressed mice, different  
82 inocula of *S. brevicaulis* UTHSC 08-2981 were assayed. The inocula were  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^7$   
83 conidia/animal, for immunocompetent mice and  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  conidia/animal for  
84 immunosuppressed animals that were administered in 200 µL of sterile saline via the lateral tail  
85 vein of groups of 8 animals. Mice were rendered neutropenic a day prior to infection, by an  
86 intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk  
87 SA, Barcelona, Spain) plus 150 mg/kg of 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma SA,  
88 Barcelona, Spain) given intravenously (i.v.) (Ortoneda *et al.*, 2004). Later we carry out a dose  
89 escalation study with two strains of *S. brevicaulis* (UTHSC 10-2899, UTHSC 08-2981) and two  
90 strains of *S. brumptii* (UTHSC 09-482, UTHSC 09-2391). Immunosuppressed mice were  
91 challenged i.v., with conidial suspensions of at  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  CFU (colony  
92 forming units) in 200 µL of sterile saline, injected via the lateral tail vein.

93

94

95

96

## 97 **Treatments**

98 Immunosuppressed animals were infected with  $5 \times 10^5$  CFU of *S. brevicaulis* UTHSC 08-2981 or  
99  $1 \times 10^6$  CFU of *S. brumptii* UTHSC 09-482. Dose-escalation study showed that these inocula  
100 were able to produce an acute infection were all animals died within 15 days. The drugs  
101 assayed were LAMB (Gilead Sciences S.A., Madrid, Spain) at 10 mg/kg i.v., once a day (QD);  
102 PSC (Noxafil; Schering-Plough Ltd., Hertfordshire, United Kingdom) at 20 mg/kg given orally  
103 (p.o) by gavage, twice daily (BD) or VRC (Vfend; Pfizer S.A., Madrid, Spain) at 60mg/kg p.o, by  
104 gavage QD. From 3 days before infection, mice that received VRC were given grapefruit juice  
105 instead of water (Sugar & Liu, 2001). All treatments began 1 day after challenge, and the  
106 therapy lasted for 6 days. To prevent bacterial infections, mice received 5 mg/kg/day of  
107 ceftazidime subcutaneously.

108 The virulence of the strains and the efficacy of the drugs tested were evaluated by the  
109 comparison of survival rates, tissue burden and histopathological studies in groups of 8 animals.  
110 For survival studies groups of 8 mice were randomly established for each strain, inocula and  
111 drug assayed, animals were checked twice a day and mortality was recorded for 20 days after  
112 challenge. For tissue burden studies mice were sacrificed on day 5 post infection for virulence  
113 studies and 6 days for therapy efficacy evaluation by CO<sub>2</sub> anoxia in order to compare the  
114 results.

115

## 116 **Tissue burden and histopathology studies**

117 Kidneys, lungs, spleen, liver and brain were aseptically removed and approximately half of each  
118 organ was weighed and homogenized in 2 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the  
119 homogenates were plated onto PCA and incubated for 3 days at 25°C and the numbers of  
120 CFU/g of tissue were calculated. For the histopathology study, the remaining portion of each  
121 organ was fixed with 10% buffered formalin, dehydrated, paraffin embedded, and sliced into 2  
122 µm sections, which were stained with hematoxylin-eosin (H-E), periodic acid-Schiff (PAS) stain  
123 and Grocott methamine silver (GMS) for examination by light microscopy.

124

125

126

127 **Statistical analysis**

128 The mean survival times (MST) were estimated by the Kaplan-Meier method and compared  
129 among groups by using the log rank test. In tissue burden studies, colony counts were  $\log_{10}$ -  
130 transformed and compared by the two-tailed Mann–Whitney U-test, using Graph Pad Prism 5  
131 for Windows.  $P$  values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

132

133 **Results and discussion**

134 The results of the first study showed a dose-dependent response, with significant differences  
135 between immunocompetent and immunosuppressed mice. The immunocompetent groups  
136 challenged with  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^7$  conidia/animal showed a survival rate of 100% and 80%  
137 respectively. In contrast, in immunosuppressed groups inoculated with  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$   
138 conidia/animal, all the animals died within 7 days with a mean survival time of 5.4 and 5.2 days.  
139 The only exception were mice infected with the lowest inoculum ( $1 \times 10^5$  conidia/animal), 60% of  
140 which survived at the end of the experiment (Fig. 1).

141 Therefore, the immunosuppressed model using the inocula of  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$   
142 CFU/animal were chosen to evaluate and compare the virulence of the four strains included in  
143 the study. The inocula escalation study carried out on *S. brevicaulis* and *S. brumptii*, showed  
144 that survival of mice challenged with different inocula showed a similar behavior in all strains  
145 tested (Fig. 2).

146 The two highest inocula ( $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^6$  CFU/animal) caused a fatal acute infections with all  
147 animals died between the third and ninth day, with no significant differences among inocula.  
148 The inoculum of  $1 \times 10^5$  CFU/animal showed a higher survival rate, especially in those animals  
149 challenged with the two strains of *S. brevicaulis* which had a survival rate of 37.5% with  
150 significant differences respect to the others inocula and a mean survival time of 17.3 and 14.8  
151 days respectively. However, mice infected with  $1 \times 10^5$  CFU/animal of *S. brumptii* UTHSC 09-482  
152 had only a 12.5% of survival, and those infected with UTHSC 09-2391 had a 100% of mortality,  
153 demonstrating a higher virulence of this species (Fig. 2).

154 Results of tissue burden are shown in figure 3. The most affected organs were liver and spleen  
155 followed by lung, kidney and brain. Fungal loads in all the studied organs correlated with inocula  
156 size with no differences between the loads of the organs between the two species. Histological

157 analysis showed microgranulomatosus lesions with invasion of fungal cells in all the organs  
158 tested; however, inflammatory cells were not observed.

159 In mice infected with *S. brumptii*, the rate of survival of groups treated with LAMB 10, PSC 40 or  
160 VRC 60 ranged between 50% and 75% at the end of the assay, prolonging significantly the  
161 survival in comparison with the control group ( $P < 0.0012$ ). However, in mice infected with *S.*  
162 *brevicaulis*, all treatments were unable to prolong significantly survival versus the controls.

163 For the two strains tested LAMB, PSC or VRC were not able to reduce fungal burden in liver.  
164 PSC was the most effective therapies against *S. brevicaulis*, reducing the fungal load in kidney,  
165 brain and lung ( $P < 0.037$ ), while LAMB was effective in spleen and lung ( $P < 0.027$ ). For *S.*  
166 *brumptii* LAMB showed more efficacy reducing fungal loads in kidney and spleen ( $P < 0.01$ ).  
167 Moreover, VRC reduce the tissue burden only occasionally in both strains (Fig 5).

168

## 169 **Discussion**

170 Although invasive aspergillosis and candidiasis remains, as the most frequent cause of invasive  
171 fungal infections, severe infections due to other opportunistic molds are emerging especially in  
172 immunocompromised population (Kontoyiannis et al., 2010; Pappas et al., 2010.) Even though,  
173 *Scopulariopsis* species are associated mainly with nail infections in immunocompetent patients  
174 (Bonifaz et al., 2006; Issakainen et al., 2007), invasive infections with this fungus have been  
175 described producing a disseminated infection almost exclusively in neutropenic patients, which  
176 added to a delayed diagnosis and a high level of resistance of *Scopulariopsis* to conventional  
177 antifungals (Sandoval-Denis et al., 2013) are responsible of the poor outcome (Issakainen et al.,  
178 2010).

179 To our knowledge, this is the first animal study that has explored the virulence of  
180 *Scopulariopsis*. In general, immunocompetent mice had a high survival rate, despite the high  
181 concentrations employed. Also, our results demonstrate a high virulence of the four strains  
182 tested in immunosuppressed animals, being *S. brumptii* UTHSC 09-2391 slightly more virulent  
183 than the others, at low inocula level. Infections at a high inocula resulted in the death of all  
184 animals regardless of species. Histopathological findings were similar among species and we  
185 recovered fungi from all organs studied, including brain at different inoculum in all the strains  
186 tested, this data is in agreement with clinical reports were disseminated infection by



187 *Scopulariopsis* has been reported to involve multiple organs, including liver, spleen, kidney and  
188 brain (Issakainen *et al.*, 2010).

189 There are no standard therapies associated with favourable patient's outcome against  
190 disseminated *Scopulariopsis* infections and no therapy has been experimentally tested  
191 previously against this infection. In the absence of relevant clinical data, animal models can play  
192 an important role (Guarro, 2011). In our study, despite the high MIC values obtained all the  
193 treatments were able to prolong mice survival only for *S. brumptii*, where remarkable antifungal  
194 efficacy was observed despite both strains showed similar MICs. Likewise fungal burden was  
195 reduced modestly by the three antifungals in both strains tested.

196 Difficulties encountered in the management of this infection showing high mortality, tissue  
197 invasion and poor efficacy of antifungals indicates that these species underline the need of  
198 further studies to assess an adequate therapy. Synergistic activities between antifungal  
199 combinations of posaconazole and terbinafine against *S. brevicaulis* have been reported  
200 (Cuenca-Estrella *et al.*, 2006) that could be considered as alternative of *Scopulariopsis*  
201 treatment.

202

## 203 **References**

204 **Aguilar C, Pujol I, Guarro J.** 1999. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Scopulariopsis* isolates.

205 Antimicrob. Agents Chemother. 43:1520-2.

206 **Aydin S, Ertugrul B, Gultekin B, Uyar G, Kir E.** 2007. Treatment of two postoperative  
207 endophthalmitis cases due to *Aspergillus flavus* and *Scopulariopsis* spp. with local and  
208 systemic antifungal therapy. BMC Infect. Dis. 7: 87-91.

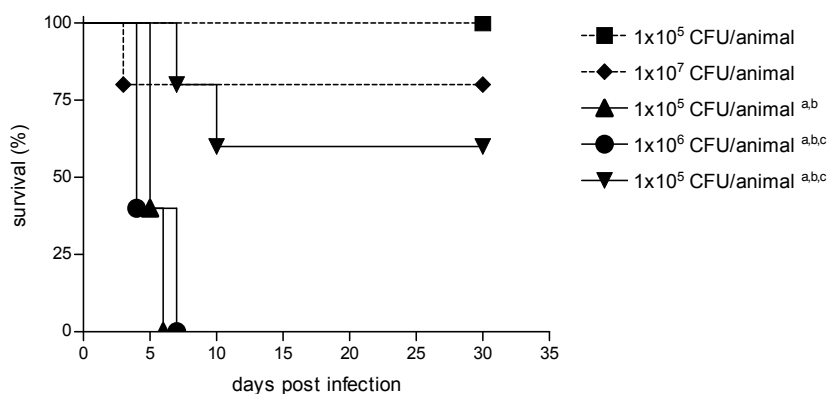
209 **Bonifaz A, Cruz-Aguilar P, Ponce RM.** 2007. Onychomycosis by molds. Report of 78 cases.  
210 Eur. J. Dermatol. 17: 70-72.

211 **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution  
212 antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 2nd ed. CLSI  
213 document M38-A2. CLSI, Wayne, PA.

214 **Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Mellado E, Garcia-Effron G, Rodriguez-**  
215 **Tudela JL.** 2006. *In vitro* activities of 10 combinations of antifungal agents against the

- 216 multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*  
217 50:2248–2250.
- 218 **Guarro J.** 2011. Lessons from animals studies for the treatment of invasive human infections  
219 due to uncommon fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 1447-1466.
- 220 **Hart AP, Sutton DA, McFeeley PJ, Kornfeld M.** 2001. Cerebral phaeohyphomycosis caused  
221 by a dematiaceous *Scopulariopsis* species. *Clin. Neuropathol.* 20: 224-228.
- 222 **Hoog GS de, Guarro J, Gené J, Figueras MJ** (eds) (2005) Atlas of Clinical Fungi, CD-ROM  
223 version.
- 224 **Issakainen J, Heikkilä H, Vainio E, Koukila-Kähkölä P, Castren M, Liimatainen O, Ojanen**  
225 **T, Koskela M, Meurman O.** 2007. Occurrence of *Scopulariopsis* and *Scedosporium* in  
226 nails and keratinous skin. A 5-year retrospective multi-center study. *Med. Mycol.* 45:  
227 201-9.
- 228 **Issakainen J, Salonen JH, Anttilas V-J, Koukila-Kähkölä P, Castren M, Liimatainen O,**  
229 **Vuento R, Ojanen T, Koivula I, Koskela M, Meurman O.** 2010. Deep, respiratory tract  
230 and ear infections caused by *Pseudallescheria* (*Scedosporium*) and *Microascus*  
231 (*Scopulariopsis*) in Finland. A 10-year retrospective multi-center study. *Med. Mycol.* 48:  
232 458-465.
- 233 **Iwen PC, Schutte SD, Florescu DF, Noel-Hurst RK, Sigler L.** 2012. Invasive *Scopulariopsis*  
234 *brevicaulis* infection in an immunocompromised patient and review of prior cases  
235 caused by *Scopulariopsis* and *Microascus* species. *Med. Mycol.* 50:561-9.
- 236 **Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, Ito J, Andes**  
237 **DR, Baddley JW, Brown JM, Brumble LM, Freifeld AG, Hadley S, Herwaldt LA,**  
238 **Kauffman CA, Knapp K, Lyon GM, Morrison VA, Papanicolaou G, Patterson TF,**  
239 **Perl TM, Schuster MG, Walker R, Wannemuehler KA, Wingard JR, Chiller TM,**  
240 **Pappas PG.** 2010. Prospective surveillance for invasive fungal infections in  
241 hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-  
242 Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin. Infect. Dis.*  
243 50:1091–1100.

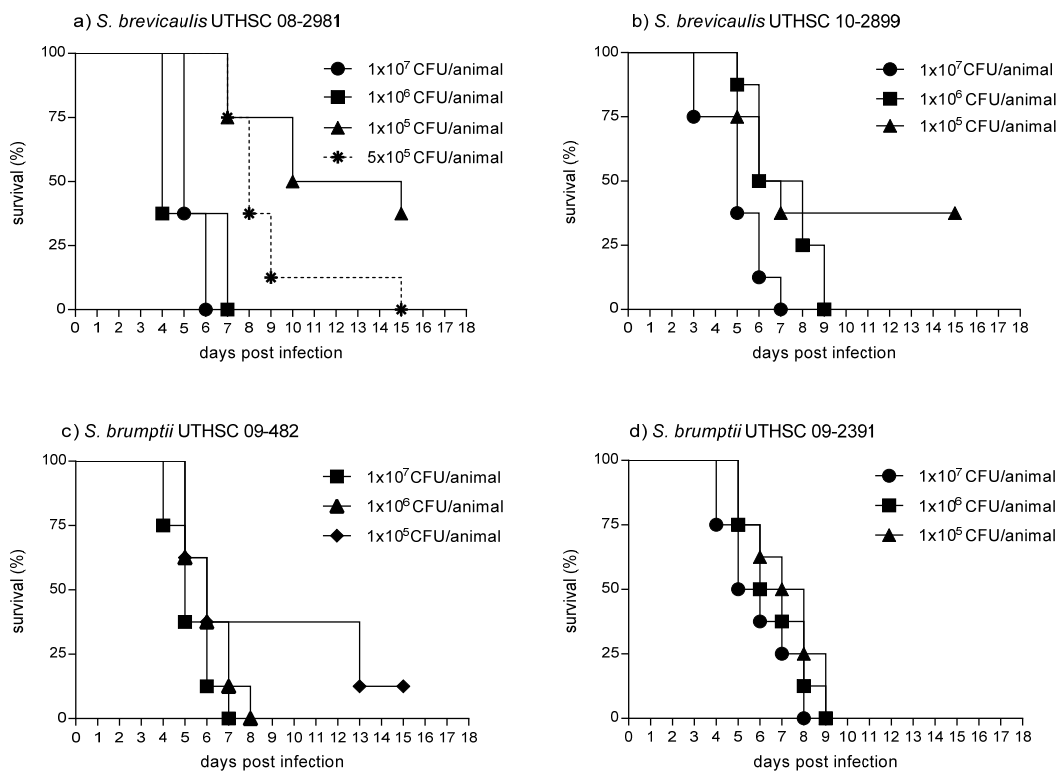
- 244 **Miossec C, Morio F, Lepoivre T, Le Pape P, Garcia-Hermoso D, Gay-Andrieu F, Haloun A,**  
245 **Treilhaud M, Leclair F, Miegerville M.** 2011. Fatal invasive infection with fungemia due  
246 to *Microascus cirrosus* after heart and lung transplantation in a patient with cystic  
247 fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 49: 2743–2747.
- 248 **Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Guarro J.** 2004. Interaction of granulocyte colony-  
249 stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of  
250 systemic murine scedosporiosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50:247-251.
- 251 **Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, Anaissie EJ,**  
252 **Brumble LM, Herwaldt L, Ito J, Kontoyiannis DP, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA,**  
253 **Park BJ, Patterson TF, Perl TM, Oster RA, Schuster MG, Walker R, Walsh TJ,**  
254 **Wannemuehler KA, Chiller TM.** 2010. Invasive fungal infections among organ  
255 transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance  
256 Network (TRANSNET). *Clin. Infect. Dis.* 50:1101–1111.
- 257 **Sandoval-Denis M, Sutton DA, Fothergill AW, Cano-Lira J, Gené J, Decock CA, de Hoog**  
258 **GS, Guarro J.** 2013. *Scopulariopsis*, a poorly known opportunistic fungus: spectrum of  
259 species in clinical samples and *in vitro* responses to antifungal drugs. *J. Clin. Microbiol.*  
260 51:3937-43.
- 261 **Steinbach WJ, Schell WA, Miller JL, Perfect JR, Martin PL.** 2004. Fatal *Scopulariopsis*  
262 *brevicaulis* infection in a paediatric stem-cell transplant patient treated with voriconazole  
263 and caspofungin and a review of *Scopulariopsis* infections in immunocompromised  
264 patients. *J. Infect.* 48: 112-16.
- 265 **Sugar AM, Liu X.** 2001. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary  
266 blastomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:601– 604.
- 267 **Wu CY, Lee CH, Lin HL, Wu CS.** 2009. Cutaneous granulomatous infection caused by  
268 *Scopulariopsis brevicaulis*. *Acta Derm. Venereol.* 89:103-104.
- 269 **Yang Q, Wei J, Chen Z.** 2012. Fatal bronchial invasion of *Scopulariopsis brevicaulis* in an acute  
270 monocytic leukemia patient. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73:369-71.
- 271



272

273 **Fig. 1.** Cumulative mortality of mice infected with *Scopulariopsis brevicaulis* UTHSC 08-2981. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. 1x10<sup>5</sup>  
 274 CFU/animal; <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs. 1x10<sup>7</sup> CFU/animal; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs. 1x10<sup>5</sup> CFU/animal. Dashed lines represent  
 275 immunocompetent mice.

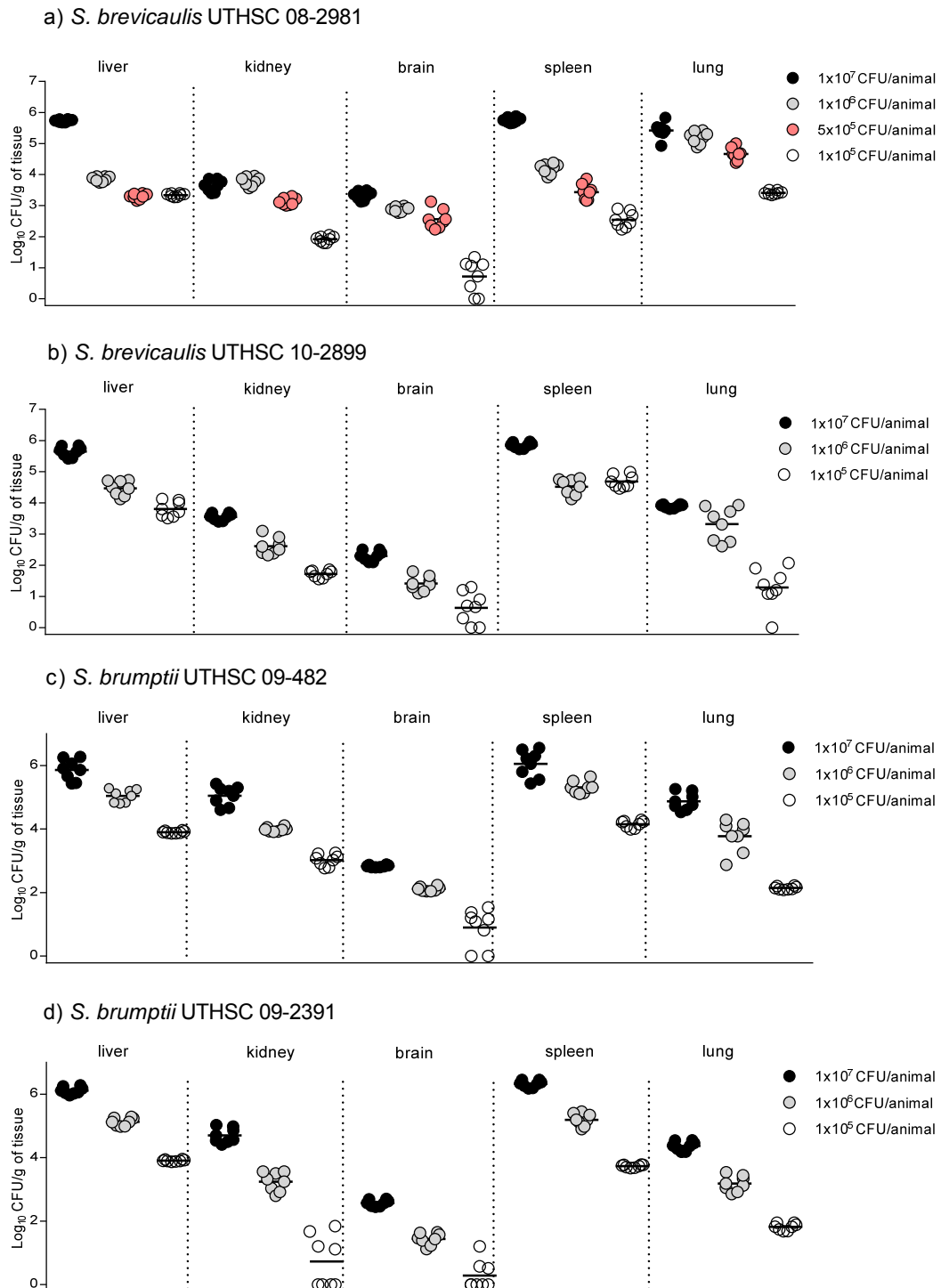
276



277

278 **Fig 2.** Cumulative mortality of mice infected with the indicated strains. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. 1x10<sup>5</sup> CFU/animal; <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs.  
 279 1x10<sup>7</sup> CFU/animal; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs. 1x10<sup>5</sup> CFU/animal.

280



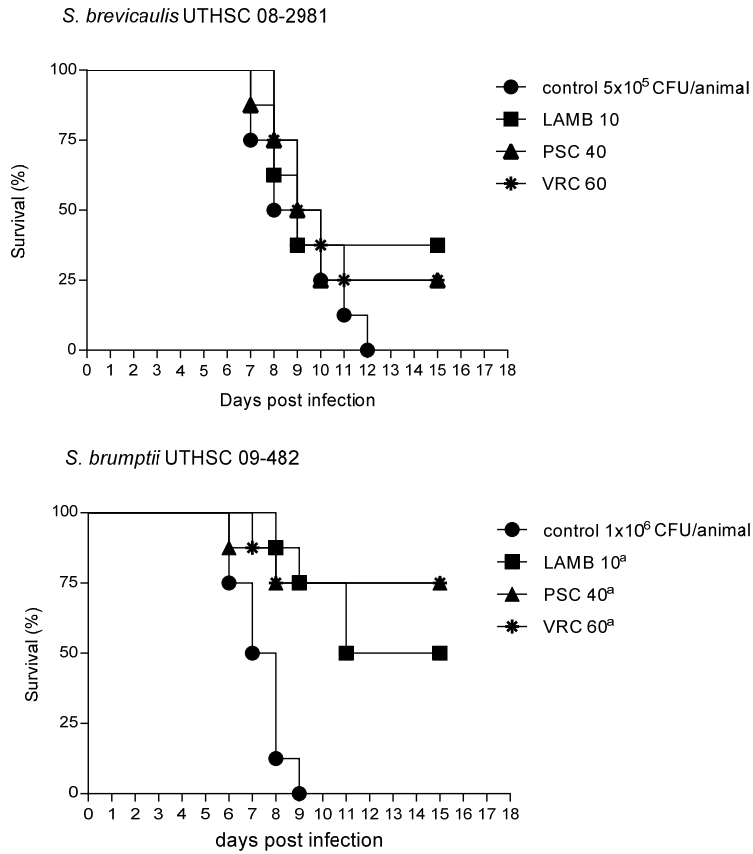
281

282 **Fig. 3.** Fungal load of different organs recovered from immunosuppressed mice infected with 1x10<sup>7</sup>, 1x10<sup>6</sup>, 5x10<sup>5</sup> and  
283 1x10<sup>5</sup> conidia/animal of *S. brevicaulis* (a, b) and *S. brumptii* (c, d).

284

285

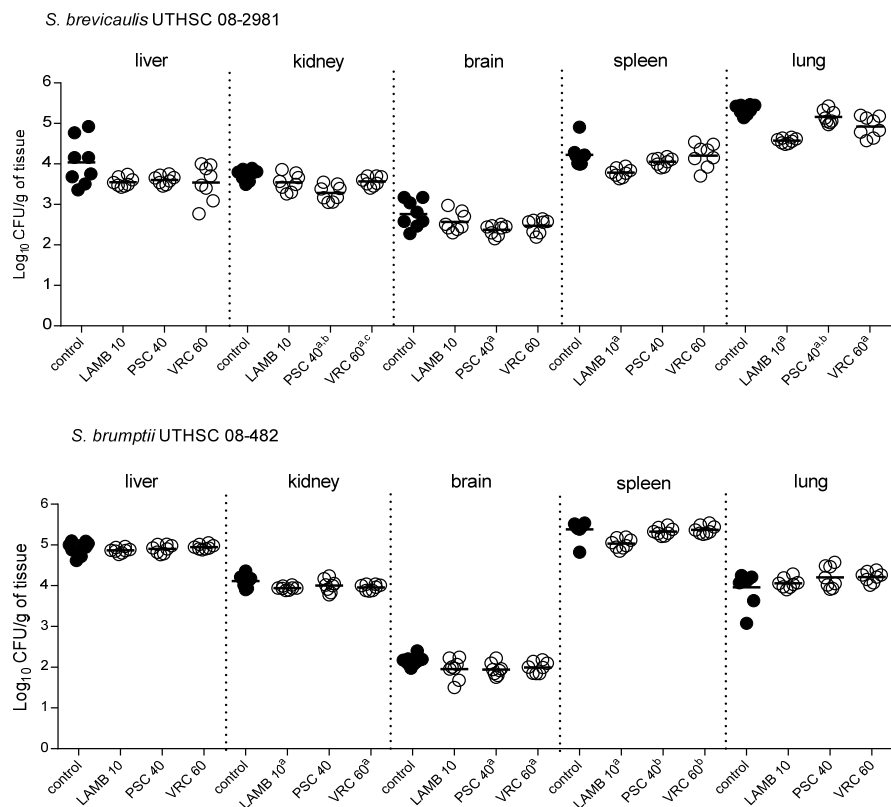
286



287

288 **Fig.4.** Cumulative mortality of immunosuppressed mice infected with the indicated strains. LAMB 10, liposomal  
289 amphotericin B at 10 mg/kg QD; PSC 40, posaconazole at 20 mg/kg BD; VRC 60, voriconazole at 60 mg/kg QD. <sup>a</sup>  $P <$   
290 0.05 versus control.

291



292

293 **Fig.5.** Effects of the antifungal treatments on colony counts in immunosuppressed mice infected with the indicated  
 294 strains. LAMB 10, liposomal amphotericin B at 10 mg/kg QD; PSC 40, posaconazole at 20 mg/kg BD; VRC 60,  
 295 voriconazole at 60 mg/kg QD <sup>a</sup>  $P < 0.05$  v/s control, <sup>b</sup>  $P < 0.05$  v/s LAMB 10, <sup>c</sup>  $P < 0.05$  v/s PSC 40.

## **5. DISCUSIÓN**





## 5. Discusión

### 5.1. Identificación y taxonomía del complejo *Candida rugosa*

Las principales levaduras implicadas en clínica, pueden ser fácilmente identificadas mediante técnicas convencionales basadas en una combinación de sus principales características fenotípicas. Sin embargo, desde la implantación de las técnicas moleculares en el diagnóstico microbiológico, una gran cantidad de nuevas especies han sido descritas, reportándose un aumento significativo en la incidencia y diversidad de las especies de levaduras de significado clínico, cuya identificación mediante técnicas fenotípicas plantea dificultades. Ello motiva que las bases de datos de los sistemas automatizados o semiautomatizados presentes en los laboratorios clínicos, se encuentren obsoletas, siendo útiles sólo para la identificación de las especies más comunes (Cendejas-Bueno *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2012).

Los esquemas de clasificación de los hongos han cambiado considerablemente, algunos estudios han demostrado que muchas especies caracterizadas fenotípicamente (morfoespecies), constituyen en realidad complejos de especies, en ocasiones sólo diferenciables molecularmente, como es el caso de *Candida dubliniensis* (Sullivan *et al.*, 1995) muy próxima a *C. albicans*; *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis* especies crípticas del complejo *C. parapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005); *Candida nivariensis* (Alcoba-Flores *et al.*, 2005) y *Candida bracarenis* (Correia *et al.*, 2006) especies gemelas de *C. glabrata*, entre otras.

La identificación incorrecta de hongos oportunistas, especialmente de las especies menos comunes o crípticas puede tener consecuencias clínicas y epidemiológicas importantes. Debido a la existencia de especies con perfiles de susceptibilidad antifúngica disminuida, es importante que el método de identificación utilizado tenga el mayor grado de precisión posible para optimizar el manejo de los pacientes utilizando la terapia adecuada. Por ello, hemos considerado de especial interés realizar la identificación molecular de las cepas de *Candida* que recibimos en nuestro laboratorio, durante el desarrollo de esta tesis para ser utilizadas en los diferentes trabajos de investigación. Para ello se amplificaron y secuenciaron las regiones correspondientes al dominio D1/D2 del gen 28S. De las 45 cepas de *Candida* estudiadas, sólo la identificación de 19 (42%) fue concordante por ambos métodos, obteniéndose los mayores

porcentajes de correspondencia para *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. kefyr*. Para las otras especies estudiadas los porcentajes de concordancia fueron muy bajos, debido al hecho de que sus características fenotípicas eran muy similares a las especies incluidas en las bases de datos, impidiendo su correcta identificación. Observamos especialmente que entre las cepas originalmente identificadas como *C. rugosa*, al realizar el BLAST con las secuencias disponibles en GenBank, dos de ellas, presentaron un bajo porcentaje de similitud (92.3%) con la cepa tipo de *C. rugosa*. El análisis filogenético de las secuencias D1/D2 de nuestras cepas y de cepas de referencia demostró la existencia de un complejo, formado por 3 clados: *C. rugosa*, *C. pseudorugosa* (Li *et al.*, 2006) y un tercero formado por dos cepas, que justificaron la propuesta de la nueva especie, *Candida neorugosa*. A su vez, los 3 grupos fueron diferenciables fenotípicamente, mientras que los estudios de sensibilidad *in vitro* mostraron que las tres especies, presentaban CMI dentro del rango de sensibilidad establecido para los azoles, la anfotericina B y las equinocandinas. El significado clínico que *C. neorugosa* pueda tener es desconocido, sin embargo su aislamiento a partir de lesiones en una mujer y en un caballo, la convierten en un potencial patógeno.

El análisis filogenético de las secuencias correspondientes a la región ITS, confirmó nuestros hallazgos y nos permitió observar una mayor variabilidad genética en el clado de *C. rugosa*. Se observó que la cepa UTHSC R-3412, presentaba una considerable distancia genética con la cepa tipo, sugiriendo que podría tratarse de una posible nueva especie. Posteriormente Chávez *et al.*, (2013) realizaron un análisis multigénico de 10 cepas de *C. rugosa* amplificando el dominio D1/D2, la región ITS, los genes que codifican la actina (*ACT1*), la subunidad 2 de la citocromo c oxidasa (*COX2*) y la subunidad larga de la ARN polimerasa (*RPB1*) demostrando la presencia de dos clados dentro de *C. rugosa*. La mayor variabilidad la obtuvieron mediante el análisis de la región ITS que mostraba claramente la divergencia de las cepas, proponiendo la nueva especie *Candida mesorugosa*.

En nuestro estudio, algo similar sucedió en el clado de *C. pseudorugosa* donde las cepas UTHSC 06-3641 y 08-707, presentaron un porcentaje de similitud con la cepa tipo de sólo 93.9 y 94.8%, respectivamente. El árbol filogenético obtenido muestra que estos aislados constituyen

dos posibles nuevas especies que se encuentran actualmente en estudio. Como en otras ocasiones ya se ha demostrado, la mayor variabilidad de las secuencias de la región ITS, la convierten en un marcador filogenético idóneo para la identificación de especies crípticas de *Candida* (Ciardo *et al.*, 2006; Cendejas-Bueno *et al.*, 2010).

## 5.2. Candidiasis invasora

La terapia antifúngica y la epidemiología de las infecciones por *Candida* han cambiado con el tiempo. El aumento del uso de los azoles en los 90' produjo un cambio en la distribución de las especies, donde *C. albicans* preveleía, aumentado el aislamiento de especies menos sensibles a los azoles como *C. glabrata* (Berrouane *et al.*, 1999; Trick *et al.*, 2002). Actualmente, la European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) recomienda el uso de caspofungina y micafungina como terapia de primera línea para el tratamiento de candidiasis invasivas en pacientes neutropénicos, mientras que el fluconazol, el voriconazol y la anfotericina B liposomal son recomendados como alternativas (Ullmann *et al.*, 2012). La anidulafungina, el itraconazol y el posaconazol no están recomendados principalmente por los escasos datos clínicos reportados (Ullmann *et al.*, 2012). No obstante, el excesivo uso de las equinocandinas puede a su vez aumentar la incidencia de especies menos sensibles *in vitro* como *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* (Forrest *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2008, Diekema *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a la baja frecuencia de infecciones por *C. guilliermondii*, existen pocos estudios concluyentes que demuestren una clara asociación entre los resultados de los estudios que indican una menor sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas y el fluconazol, y el fracaso terapéutico. Debido a ello, decidimos investigar la relación entre la actividad *in vitro*, evidenciada por el estudio de las CMI's de anfotericina B, fluconazol y anidulafungina, y de las curvas de mortalidad, y la efectividad *in vivo* en modelos experimentales con ratones neutropénicos. Los estudios *in vitro* mostraron que si bien las dos cepas estudiadas presentaban CMI's dentro de los rangos de susceptibilidad para los tres antifúngicos utilizados, sólo anfotericina B liposomal a la dosis de 10mg/kg fue capaz de reducir de manera significativa la carga fúngica en los riñones de los ratones infectados con

ambas cepas de *C. guilliermondii*, lo cual se correlaciona con las curvas de mortalidad. Fluconazol se mostró invariablemente fungistático, mientras que anidulafungina tuvo un comportamiento cepa dependiente. No existen estudios experimentales previos en los que se haya evaluado la eficacia de la anidulafungina frente a infecciones causadas por *C. guilliermondii*, si bien Barchiesi *et al.*, (2006) realizaron un estudio con caspofungina, no observaron una correlación entre la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo*. Cabe mencionar que nuestro estudio no es concluyente, debido a que se incluyeron muy pocos aislados de *C. guilliermondii* y que las cepas utilizadas se encontraban dentro del rango de sensibilidad.

Actualmente el CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing ha establecido puntos de cortes clínicos de sensibilidad para las especies de *Candida*, sin embargo, estos sólo son aplicables a las especies más comunes. Para otras especies como *C. guilliermondii*, se han definido los puntos de corte epidemiológicos para detectar la emergencia de resistencia. No obstante, se necesitan resultados clínicos adicionales y estudios sobre mecanismos de resistencia entre las especies menos comunes para poder establecer una terapia efectiva.

### 5.3. Infecciones por hongos dematiáceos

Las infecciones por hongos dematiáceos son poco frecuentes, sin embargo se ha observado un aumento en su incidencia, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, asociada a una elevada mortalidad (Kontoyiannis *et al.*, 2010), aunque también han sido reportadas infecciones invasivas en pacientes inmunocompetentes. Actualmente no existen tratamientos de elección para este tipo de infecciones. Tradicionalmente, los fármacos utilizados han sido la anfotericina B y el itraconazol. Sin embargo la toxicidad de la anfotericina B limita su uso en terapias prolongadas y la administración de itraconazol puede inducir la aparición de resistencia.

### 5.3.1. *Curvularia*

*Curvularia* es uno de los principales agentes causantes de la sinusitis fúngica alérgica. No existen terapias recomendada para este tipo de enfermedades, siendo las más usuales la cirugía, el uso de corticosteroides y tratamiento con itraconazol (Schubert, 2009). Sin embargo, en algunos casos el tratamiento es ineficaz y la infección se extiende a las estructuras adyacentes (Fryen *et al.*, 1999; Ambrosetti *et al.*, 2006; Viola & Sutton, 2010) o se produce infiltración pulmonar (Bozeman *et al.*, 2011). A pesar de la disponibilidad de nuevos triazoles como el posaconazol y el voriconazol además de las equinocandinas, los datos publicados sobre su eficacia son limitados. Por ello consideramos de utilidad desarrollar modelos de infección experimental que permitieran reproducir en animales la infección humana con la finalidad de poder ensayar nuevas terapias.

Se han publicado diferentes procedimientos experimentales para la producción de sinusitis que incluyen la obstrucción mecánica del ostium por cirugía, la introducción de una esponja en la cavidad nasal, la instilación de mediadores de la inflamación, así como la inoculación directa de hongos bacterias o virus (Kara, 2004; Costa *et al.*, 2007). En nuestro estudio intentamos desarrollar un modelo de sinusitis fúngica utilizando ratones y ratas inmunodeprimidas e inmunocompetentes. Si bien en un estudio fue posible el establecimiento de la infección en una rata inmunocompetente, el experimento no pudo ser adecuadamente reproducido. La justificación de estos resultados podría radicar en que muchos de los pacientes afectados por este tipo de infección presentan hipersensibilidad tipo I. La inflamación, el edema y el aumento de las secreciones producidos por la rinitis alérgica, obstruyen el ostium, disminuyendo el drenaje, la ventilación y la actividad ciliar, volviéndose un ambiente adecuado para la proliferación de bacterias u hongos (Kara, 2004).

Este hecho ha sido demostrado en modelos animales donde el proceso inflamatorio se produce después de una sensibilización previa por vía intraperitoneal (Lindsay *et al.*, 2006; Khalid *et al.*, 2008). Así mismo, en algunos trabajos, los conejos son preferidos en este tipo de experimentos debido a la similitud anatómica del volumen de sus senos nasales con los humanos (Kara, 2004; Casteleyn *et al.*, 2010). Otros autores también han reportado la dificultad

para desarrollar este modelo en ratones (Chakrabarti *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de los inconvenientes que hemos mencionado se han publicado modelos de sinusitis fúngica en ratones (Ahn *et al.*, 2009) que nosotros no hemos conseguido reproducir. Si se pudieran desarrollar modelos de infecciones por *Curvularia* reproducibles serían muy útiles para el ensayo de posibles terapias. Ya que si bien los ratones no poseen senos frontales ni esfenoidales la anatomía de sus senos etmoidales y maxilares es similar a la de los humanos y además poseen el mismo tipo de epitelio respiratorio (Bomer *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2009).

Además de ser uno de los principales causantes de sinusitis alérgica fúngica, *Curvularia* ha sido reportada como agente causal de una gran variedad de infecciones (Bilu *et al.*, 2004; Bashir *et al.*, 2009) incluyendo infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos (Revankar *et al.*, 2002) e inmunocompetentes (Kobayashi *et al.*, 2008). Debido a la baja incidencia de este hongo en la infección humana existen escasos datos publicados sobre su virulencia y su respuesta a los antifúngicos. Debido a ello, desarrollamos un modelo experimental de infección diseminada utilizando dos de las especies más comunes en clínica, *C. spicifera* y *C. hawaiiensis*. Nuestro estudio reveló que ambas especies son capaces de producir infección sistémica en ratones inmunosuprimidos, presentando a su vez, una alta mortalidad. Los órganos más afectados fueron los pulmones debido tal vez al gran tamaño de los conidios de dichas especies, lo que motivaría que no fueran capaces de diseminar fácilmente a otros órganos, quedando así, gran parte de ellos, retenidos en los alvéolos pulmonares, tal como demostramos en nuestros estudios histológicos. Tradicionalmente, los fármacos de elección para tratar estas infecciones han sido la anfotericina B y el itraconazol. Sin embargo, generalmente, la anfotericina B, además de ser nefrotóxica, no es efectiva por si sola (Revankar *et al.*, 2002). La nueva generación de triazoles podría ser una alternativa, además el voriconazol dispone de una formulación intravenosa que podría ser usada para los pacientes más críticos. Recientes estudios indican una buena actividad *in vitro* de la anfotericina B, así como de las equinocandinas, del itraconazol, voriconazol y posaconazol frente a diversas especies de *Curvularia* (da Cunha *et al.*, 2012). En base a ello evaluamos la eficacia *in vivo* de la anfotericina B, el posaconazol y el voriconazol, observando una escasa efectividad de la primera

en comparación con los azoles. Estudios previos en modelos animales han demostrado una mayor eficacia del posaconazol frente a otros hongos dematiáceos tales como *Ramichloridium obovoideum* (Al-Abdely *et al.*, 2000), *Cladophialophora bantiana* (Al-Abdely *et al.*, 2005) *Fonsecaea* spp., (Calvo *et al.*, 2010a) y *Exophiala* spp., (Graybill *et al.*, 2004; Rivard *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2010b). Sin embargo, los datos clínicos son escasos debido, como hemos indicado, a la baja frecuencia de este tipo de infecciones. Se han descrito casos de infección por *Curvularia* tratados satisfactoriamente con voriconazol (Kobayashi *et al.*, 2008; Rosow *et al.*, 2011; Skovrlj *et al.*, 2013), como así mismo algunos datos asociados a la eficacia del posaconazol frente a otros hongos dematiáceos como *Exophiala* (Negróni *et al.*, 2004) y *Alternaria* (Mullane *et al.*, 2007). Las equinocandinas han demostrado ser activas frente a cepas clínicas de *Curvularia* (da Cunha *et al.*, 2012), aunque por desgracia los datos publicados son muy limitados (Ben-Ami *et al.*, 2009). Combinaciones de anfotericina B con un triazol, o una equinocandina; o triazoles con equinocandinas han sido sugeridas para tratar infecciones producidas por diferentes especies de hongos pigmentados (Ben-Ami *et al.*, 2009). Sin embargo, los datos disponibles hasta la fecha son todavía muy escasos. Con el fin de obtener datos más concluyentes, son necesarios nuevos estudios *in vitro* e *in vivo* incluyendo un mayor número de cepas.

### 5.3.2. *Scopulariopsis*

*Scopulariopsis* ha sido asociado tradicionalmente a onicomicosis, sin embargo dicho hongo puede producir una gran variedad de infecciones con capacidad para diseminar tanto en pacientes inmunodeprimidos como inmunocompetentes (Iwen *et al.*, 2012). Las infecciones invasivas por *Scopulariopsis* alcanzan altas tasas de mortalidad, las condiciones subyacentes de los pacientes, el diagnóstico tardío, la poca experiencia clínica en el tratamiento de infecciones por este hongo y el elevado nivel de resistencia mostrado en estudios *in vitro* frente a la mayoría de los antifúngicos disponibles (Sandoval-Denis *et al.*, 2013) son las causas principales. Se han realizado alternativas complementarias tales como el debridamiento quirúrgico (Sellier *et al.*,



2000; Gluck *et al.*, 2011), aunque no ha demostrado ser satisfactoria, lo cual plantea importantes problemas para el manejo de estas infecciones.

Debido a ello, hemos evaluado la virulencia experimental de las especies de *Scopulariopsis* mayoritariamente involucradas en clínica, como son *S. brevicaulis* y *S. brumptii*, con el fin de poder conocer mejor su patogenicidad y si existen diferencias entre ellas lo que incrementaría el valor del diagnóstico diferencial. El estudio reveló que indistintamente del inóculo utilizado, ambas especies son capaces de diseminar sistémicamente en animales inmunocomprometidos produciendo una elevada mortalidad. Se observó una elevada carga fúngica en todos los órganos evaluados, siendo el bazo y los pulmones, los más afectados en los animales infectados con *S. brumptii* y *S. brevicaulis*, respectivamente. Los altos recuentos obtenidos fueron confirmados por los estudios histológicos que revelaron la infiltración masiva de células fúngicas, sin evidencia de una respuesta inflamatoria.

Si bien los casos de infecciones sistémicas por *Scopulariopsis* no son frecuentes, estudios prospectivos multicéntricos han demostrado que la incidencia de enfermedad invasiva por *Scopulariopsis* en pacientes con trasplante de células madre hematopoyéticas o trasplante de órgano sólido, alcanza hasta el 8% en ambos casos llegando a un 20% en receptores de trasplante de pulmón (Kontoyiannis *et al.*, 2010; Pappas *et al.*, 2010). A pesar de esta situación actualmente, no existen terapias recomendadas para el tratamiento de este tipo de infecciones.

El establecimiento de un modelo de infección sistémica por *S. brumptii* y *S. brevicaulis* nos ha permitido evaluar *in vivo* la eficacia de anfotericina B liposomal, voriconazol y posaconazol observando escasa eficacia en ambas especies. Potentes actividades sinérgicas han sido descritas *in vitro* para terbinafina o caspofungina mas azoles (Cuenca-Estrella *et al.*, 2006), sin embargo no existen datos experimentales que confirmen tales afirmaciones. En este sentido el uso de este modelo murino para el estudio de la eficacia de una terapia combinada nos permitiría avanzar en la búsqueda de un tratamiento eficaz.

## **6. CONCLUSIONES**



## 6. Conclusiones

6.1. Hemos caracterizado 45 cepas clínicas de *Candida* mediante técnicas fenotípicas y moleculares, concluyendo que:

- Existe una correlación del 42% entre los resultados obtenidos por ambos métodos.
- Las secuencias correspondientes a la región ITS fueron las más adecuadas para la correcta identificación y discriminación entre especies estrechamente relacionadas.
- Se ha propuesto la nueva especie *Candida neorugosa*, en base a un estudio polifásico que incluyó la secuenciación del dominio D1/D2 del 28S y la región ITS del ADN ribosómico, además de un detallado estudio morfológico y fisiológico.
- El complejo *Candida rugosa* está formado por cuatro especies filogenéticamente cercanas y fisiológicamente similares.
- Las cepas del complejo *C. rugosa* investigadas fueron sensibles *in vitro* a todos los antifúngicos ensayados.

6.2. Evaluamos la actividad *in vitro* y la eficacia en un modelo murino de la anidulafungina, la anfotericina B y el fluconazol frente a diversos aislados de *Candida guilliermondii*, concluyendo que:

- Los tres antifúngicos mostraron una buena actividad *in vitro* frente a todas las cepas estudiadas.
- La anidulafungina y el fluconazol, no han sido efectivos frente a las dos cepas de *C. guilliermondii* ensayadas.
- La anfotericina B liposomal ha demostrado la mayor eficacia en dicho modelo, correlacionándose con los resultados *in vitro*.
- La pobre eficacia del fluconazol y la anidulafungina sugiere que estos fármacos deben ser utilizados con precaución en el tratamiento de infecciones causadas por *C. guilliermondii*.

6.3. Evaluamos la virulencia de *Curvularia spicifera* y *Curvularia hawaiiensis* en un modelo murino de sinusitis y otro de infección diseminada y concluimos que:

- No hemos conseguido desarrollar una sinusitis reproducible por *Curvularia* en ratones ni en ratas a pesar de los diferentes métodos ensayados.
- Hemos desarrollado un modelo reproducible de infección diseminada por *Curvularia* en ratones inmunodeprimidos.
- Ambas especies de *Curvularia* han demostrado una gran virulencia, produciendo una elevada mortalidad, siendo los pulmones el órgano más afectado.

6.4. Evaluamos la eficacia *in vivo* de la anfotericina B, el voriconazol y el posaconazol frente a *Curvularia spicifera* y *Curvularia hawaiiensis* en un modelo de infección diseminada en el ratón inmunocomprometido, concluyendo que:

- El posaconazol ha mostrado una buena actividad *in vivo* frente a ambas especies de *Curvularia*. Estos resultados sugieren el potencial uso del posaconazol como primera opción terapéutica en el tratamiento de infecciones causadas por *Curvularia*.

6.5. Evaluamos la virulencia de *Scopulariopsis brumptii* y *Scopulariopsis brevicaulis* en un modelo animal de infección diseminada, concluyendo que:

- Hemos desarrollado un modelo reproducible de infección diseminada por *Scopulariopsis* en ratones inmunodeprimidos.
- Ambas especies han demostrado ser altamente virulentas, asociadas a una elevada mortalidad, siendo el bazo y los pulmones los órganos más afectados.

6.6. Evaluamos la eficacia *in vivo* de la anfotericina B liposomal, el voriconazol y el posaconazol frente a *Scopulariopsis brumptii* y *Scopulariopsis brevicaulis* en un modelo de infección diseminada en el ratón inmunocomprometido, concluyendo que:

- La limitada eficacia *in vivo* del posaconazol, el voriconazol y la anfotericina B liposomal sugiere que estos fármacos deben ser utilizados con precaución en el tratamiento de infecciones causadas por *Scopulariopsis*.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**





## 7. Bibliografia:

- Aguilar C, Pujol I, Guarro J.** 1999. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Scopulariopsis* isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43:1520-1522.
- Al-Abdely HM, Najvar L, Bocanegra R, Fothergill A, Loebenberg D, Rinaldi MG, Graybill JR.** 2000. SCH 56592, amphotericin B, or itraconazole therapy of experimental murine cerebral phaeohyphomycosis due to *Ramichloridium obovoideum* ("*Ramichloridium mackenziei*"). *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1159-1162.
- Al-Abdely HM, Najvar LK, Bocanegra R, Graybill JR.** 2005. Antifungal therapy of experimental cerebral phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1701-1707.
- Alcoba-Flórez J, Méndez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, del Pilar Arévalo M.** 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J. Clin. Microbiol.* 43:4107-4111.
- Allevato MA, Negroni R, Galimberti R.** 2007. Antifúngicos ayer, hoy y mañana. *Act. Terap. Dermatol.* 30:8-17.
- Ahn BH, Park YH, Shin SH.** 2009. Mouse model of *Aspergillus* and *Alternaria* induced rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx.* 36:422-426.
- Ambrosetti D, Hofman V, Castillo L, Gari-Toussaint M, Hofman P.** 2006. An expansive paranasal sinus tumour-like lesion caused by *Bipolaris spicifera* in an immunocompetent patient. *Histopathology.* 49: 653–664.
- Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N.** 2002. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection.* 30:286-291.
- Baginski M, Resat H, McCammon JA.** 1997. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Molec. Pharmacol.* 52:560-570.
- Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, Scalise G.** 2006. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50:2719-2727.

- Barrett JP, Vardulaki KA, Conlon C, Cooke J, Daza-Ramirez P, Evans EG, Hawkey PM, Herbrecht R, Marks DI, Moraleda JM, Park GR, Senn SJ, Viscoli C, Amphotericin B Systematic Review Study Group.** 2003. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin. Ther.* 25:1295-1320.
- Bashir G, Hussain W, Rizvi A.** 2009. *Bipolaris hawaiiensis* keratomycosis and endophthalmitis. *Mycopathologia.* 167:51-53.
- Bava AJ, Fayad A, Céspedes C, Sandoval M.** 2003. Fungal peritonitis caused by *Bipolaris spicifera*. *Med. Mycol.* 41:529-531.
- Ben-Ami R, Lewis RE, Raad II, Kontoyiannis DP.** 2009. Phaeohyphomycosis in a tertiary care cancer center. *Clin. Infect. Dis.* 48:1033-1041.
- Berrouane YF, Herwaldt LA, Pfaller MA.** 1999. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J. Clin. Microbiol.* 37:531-537.
- Bilu D, Movahedi-Lankarani S, Kazin RA, Shields C, Moresi M.** 2004. Cutaneous *Bipolaris* infection in a neutropenic patient with acute lymphoblastic leukemia. *J. Cutan. Med. Surg.* 8:446-449.
- Blackwell M.** 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98: 426-438.
- Blum G, Perkhofer S, Haas H, Schrettl M, Würzner R, Dierich MP, Lass-Flör C.** 2008. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1553-1555.
- Bomer K, Brichta A, Barody F, Boonlayangoor S, Li X, Naclerio RM.** 1998. A mouse model of acute bacterial rhinosinusitis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 124:1227-1232.
- Bonifaz A, Cruz-Aguilar P, Ponce RM.** 2007. Onychomycosis by molds. Report of 78 cases. *Eur. J. Dermatol.* 17:70-72.
- Bozeman S, deShazo R, Stringer S, Wright L.** 2011. Complications of allergic fungal sinusitis. *Am. J. Med.* 124:359-368.

- Bunya VY, Hammersmith KM, Rapuano CJ, Ayres BD, Cohen EJ.** 2007. Topical and oral voriconazole in the treatment of fungal keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 143:151-153.
- Buzina W, Braun H, Schimpl K, Stammberger H.** 2003. *Bipolaris spicifera* causes fungus balls of the sinuses and triggers polypoid chronic rhinosinusitis in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4885-4887.
- Calvo E, Pastor FJ, Guarro J.** 2010b. Antifungal therapies in murine disseminated phaeohyphomycoses caused by *Exophiala* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1455-1459.
- Calvo E, Pastor FJ, Rodriguez MM, Mayayo E, Salas V, Guarro J.** 2010a. Murine model of a disseminated infection by the novel fungus *Fonsecaea monophora* and successful treatment with posaconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:919-923.
- Cano J, Guarro J, Gené J.** 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* 42:2450-2454.
- Cantón E, Martín E, Espinel-Ingroff A.** 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). En: Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Rev. Iberoam. Micol. Bilbao, pp:15a-1-15a-17.
- Cantón E, Pemán J, Sastre M, Romero M, Espinel-Ingroff A.** 2006. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50:2829-2832.
- Capilla J, Clemons KV, Stevens DA.** 2007. Animal models: an important tool in mycology. *Med. Mycol.* 45:657-684.
- Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Cárdenes C, Hernández-Molina JM, Eraso E, Quindós G, Guardia C, del Valle O, Tur-Tur C, Guarro J.** 2008. Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 31:540-543.
- Carrillo-Muñoz AJ, Pemán J, Gobernado M.** 1999. Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Rev. Esp. Quimioter.* 12:181-204.

- Casteleyn C, Cornillie P, Hermens A, Van Loo D, Van Hoorebeke L, van den Broeck W, Simoens P.** 2010. Topography of the rabbit paranasal sinuses as a prerequisite to model human sinusitis. *Rhinology*. 48:300-304.
- Castelnuovo P, De Bernardi F, Cavanna C, Pagella F, Bossolesi P, Marone P, Farina C.** 2004. Invasive fungal sinusitis due to *Bipolaris hawaiiensis*. *Mycoses*. 47:76–81.
- Cendejas-Bueno E, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M.** 2010. Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. *J. Clin. Microbiol.* 48:1895-1899.
- Chakrabarti A, Jatana M, Sharma SC.** 1997. Rabbit as an animal model of paranasal sinus mycoses. *J. Med. Vet. Mycol.* 35:295-297.
- Chaves GM, Terçarioli GR, Padovan AC, Rosas RC, Ferreira RC, Melo AS, Colombo AL.** 2013. *Candida mesorugosa* sp. nov., a novel yeast species similar to *Candida rugosa*, isolated from a tertiary hospital in Brazil. *Med. Mycol.* 51:231-242.
- Chowdhary A, Randhawa H, Singh V, Khan Z, Ahmad S, Kathuria S, Roy P, Khanna G, Chandra J.** 2011. *Bipolaris hawaiiensis* as etiologic agent of allergic bronchopulmonary mycosis: first case in a pediatric patient. *Med. Mycol.* 49:760-765.
- Ciardo DE, Schär G, Böttger EC, Altwegg M, Bosshard PP.** 2006. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 44:77-84.
- Clemons KV, Stevens DA.** 2005. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Med. Mycol.* 43:S101-S110.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. M38-A2, 2nd ed. CLSI, Wayne, PA.

- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008c. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved standard M44-A2, 2nd ed. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; proposed guideline. M51-P. CLSI, Wayne, PA.
- Correia A, Sampaio P, James S, Pais C.** 2006. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:313-317.
- Costa HO, Ruschi e Luchi GE, Augusto AG, Castro M, de Souza FC.** 2007. Comparative study of several sinusitis experimental modelling techniques in rabbits. Braz. J. Otorhinolaryngol. 73:627-631.
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Mellado E, Garcia-Effron G, Rodriguez-Tudela JL.** 2006. *In vitro* activities of 10 combinations of antifungal agents against the multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. Antimicrob. Agents Chemother. 50:2248-2250.
- da Cunha KC, Sutton DA, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Madrid H, de Hoog S, Crous PW, Guarro J.** 2012. Prevalence of *Bipolaris* spp. in clinical samples in the USA and their antifungal susceptibility profiles. J. Clin. Microbiol. 50:4061-4066.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené F, Figueras MJ.** 2011. Atlas of Clinical Fungi. Electronic version 3.1 CBS Knaw, Utrecht, NL.
- Dick JD, Rosengard BR, Merz WG, Stuart RK, Hutchins GM, Saral R.** 1985. Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida guilliermondii*. Ann. Intern. Med. 102:67-68.
- Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M.** 2012. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 73:45-48.
- Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, Pfaller MA.** 2009. *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large

- global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J. Clin. Microbiol.* 47:3170–3177.
- Durkin SR, Henderson T, Raju R, Ellis D.** 2008. Successful treatment of phaeohyphomycotic keratitis caused by *Bipolaris australiensis*. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 36:697–699.
- Dyer ZA, Wright RS, Rong IH, Jacobs A.** 2008. Back pain associated with endobronchial mucus impaction due to *Bipolaris australiensis* colonization representing atypical allergic bronchopulmonary mycosis. *Med. Mycol.* 46:589-594.
- El Khizzi N, Bakheshwain S, Parvez S.** 2010. *Bipolaris*: a plant pathogen causing human infections: an emerging problem in Saudi Arabia. *Res. J. Microbiol.* 5: 212-217.
- Espinel-Ingroff A.** 1998. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2950-2956.
- Espinel-Ingroff A.** 2001. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 39:954-958.
- Espinel-Ingroff A.** 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:101-106.
- Filizzola MJ, Martinez F, Rauf SJ.** 2003. Phaeohyphomycosis of the central nervous system in immunocompetent hosts: report of a case and review of the literature. *Int. J. Infect. Dis.* 7:282-286.
- Forrest GN, Weekes E, Johnson JK.** 2008. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J. Infect.* 56:126-129.
- Fryen A, Mayser P, Glanz H, Füssle R, Breithaupt H, de Hoog GS.** 1999. Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris (Drechslera) hawaiiensis*. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 256:330-334.
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 43:4930-4942.

- Gluck O, Segal N, Yariv F, Polacheck I, Puterman M, Greenberg D Benharroch D. 2011.** Pediatric invasive sinonasal *Scopulariopsis brevicaulis*—A case report and literature review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 75: 891-893.
- Graybill JR, Najvar LJ, Johnson E, Bocanegra R, Loebenberg D. 2004.** Posaconazole therapy of disseminated phaeohyphomycosis in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2288-2291.
- Guarro J. 2011.** Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1447-1466.
- Hart AP, Sutton DA, McFeeley PJ, Kornfeld M. 2001.** Cerebral phaeohyphomycosis caused by a dematiaceous *Scopulariopsis* species. *Clin. Neuropathol.* 20:224–228.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten H, Lutzoni F, Matheny PB, Mclaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miądlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reebg V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schübler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007.** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509-547.
- Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J, Valentin A, Magnaval JF, Berry A, Cassaing S. 2012.** Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *J. Clin. Microbiol.* 50:2107-2110.
- Issakainen J, Heikkla H, Vainio E, Koukila-Kähkölä P, Castren M, Liimatainen O, Ojanen T, Koskela M, Meurman O. 2007.** Occurrence of *Scopulariopsis* and



- Scedosporium* in nails and keratinous skin. A five-year retrospective multi-center study. Med. Mycol. 45:201-209.
- Issakainen J, Salonen JH, Anttila VJ, Koukila-Kähkölä P, Castren M, Liimatainen O, Vuento R, Ojanen T, Koivula I, Koskela M, Meurman O.** 2010. Deep, respiratory tract and ear infections caused by *Pseudallescheria (Scedosporium)* and *Microascus (Scopulariopsis)* in Finland. A 10-year retrospective multi-center study. Med. Mycol. 48:458-465.
- Iwen PC, Schutte SD, Florescu DF, Noel-Hurst RK, Sigler L.** 2012. Invasive *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an immunocompromised patient and review of prior cases caused by *Scopulariopsis* and *Microascus* species. Med. Micol. 50:561-569.
- Johnson EM.** 2008. Issues in antifungal susceptibility testing. J. Antimicrob. Chemother. 61:i13-i18.
- Kara CO.** 2004. Animal models of sinusitis: relevance to human disease. Curr. Allergy Asthma Rep. 4:496-499.
- Khalid AN, Woodworth BA, Prince A, Quraishi SA, Antunes MB, Long FH, Bolger WE, Chiu AG, Palmer JN, Cohen NA.** 2008. Physiologic alterations in the murine model after nasal fungal antigenic exposure. Otolaryngol. Head Neck Surg. 139:695-701.
- Kleinberg M.** 2006. What is the current and future status of conventional amphotericin B? Int. J. Antimicrob. Agents. 27:12-16.
- Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA.** 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1207-1212.
- Kobayashi H, Sano A, Aragane N, Fukuoka M, Tanaka M, Kawaura F, Fukuno Y, Matsuishi E, Hayashi S.** 2008. Disseminated infection by *Bipolaris spicifera* in an immunocompetent subject. Med. Mycol. 46:361-365.
- Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, Ito J, Andes DR, Baddley JW, Brown JM, Brumble LM, Freifeld AG, Hadley S, Herwaldt LA, Kauffman CA, Knapp K, Lyon GM, Morrison VA, Papanicolaou G, Patterson TF,**

- Perl TM, Schuster MG, Walker R, Wannemuehler KA, Wingard JR, Chiller TM, Pappas PG.** 2010. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin. Infect. Dis.* 50:1091-1100.
- Kuse ER, Chetchotisakd P, da Cunha CA, Ruhnke M, Barrios C, Raghunadharao D, Sekhon JS, Freire A, Ramasubramanian V, Demeyer I, Nucci M, Leelarasamee A, Jacobs F, Decruyenaere J, Pittet D, Ullmann AJ, Ostrosky-Zeichner L, Lortholary O, Koblinger S, Diekmann-Berndt H, Cornely OA, Micafungin Invasive Candidiasis Working Group.** 2007. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet.* 369:1519-1527.
- La Hoz RM, Baddley JW.** 2012. Subcutaneous fungal infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 14:530-539.
- Lass-Flörl C, Perkhofers S, Mayr A.** 2010. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses.* 53:1-11.
- Li J, Xu YC, Bai FY.** 2006. *Candida pseudorugosa* sp. nov., a novel yeast species from sputum. *J. Clin. Microbiol.* 44:4486-4490.
- Lindsay R, Slaughter T, Britton-Webb J, Mog SR, Conran R, Tadros M, Earl N, Fox D, Roberts J, Bolger WE.** 2006. Development of a murine model of chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 134:724-730.
- Macêdo DP, Oliveira NT, Farias AM, Silva VK, Wilhelm AB, Couto FM, Neves RP.** 2010. Esophagitis caused by *Candida guilliermondii* in diabetes mellitus: first reported case. *Med. Mycol.* 48:862-865.
- Malecha MA.** 2004. Fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* treated successfully with natamycin. *Cornea.* 23:201-203.

- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EH, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas RG, Tan YP, Hyde KD.** 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. *Fungal Divers.* 56:131–144.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG.** 2009. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 47:2912-2917.
- McGinnis MR, Pasarell L, Sutton DA, Fothergill AW, Cooper CR Jr, Rinaldi MG.** 1998. *In vitro* activity of voriconazole against selected fungi. *Med. Mycol.* 36:239-242.
- Miossec C, Morio F, Lepoivre T, Le Pape P, Garcia-Hermoso D, Gay-Andrieu F, Haloun A, Treilhaud M, Leclair F, Miegville M.** 2011. Fatal invasive infection with fungemia due to *Microascus cirrosus* after heart and lung transplantation in a patient with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 49:2743-2747.
- Moore ML, Collins GR, Hawk BJ, Russell TS.** 2001. Disseminated *Bipolaris spicifera* in a neonate. *J. Perinatol.* 21:399-401.
- Mullane K, Toor AA, Kalnicky C, Rodriguez T, Klein J, Stiff P.** 2007. Posaconazole salvage therapy allows successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory invasive mold infections. *Transpl. Infect. Dis.* 9: 89–96.
- Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M.** 2003. *In vitro* antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47:1376-1381.
- Negroni R, Helou SH, Petri N, Robles AM, Arechavala A, Bianchi MH.** 2004. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeohyphomycosis due to *Exophiala spinifera*. *Clin. Infect. Dis.* 38:e15-20.
- O'Brien BL, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R.** 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5544–5550.

- Odds FC, Bernaerts R.** 1994. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 32:1923-1929.
- Odds FC, Brown AJ, Gow NA.** 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11:272-279.
- O'Donnell K.** 1993. *Fusarium* and its near relatives. En: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Reynolds R and Taylor JW eds. CAB International, Wallingford, pp 225-233.
- Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martinez JA, Lopez J, Pitart C, Mensa J.** 2011. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J. Hosp. Infect.* 77:157-161.
- Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH.** 2010. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9:719-727.
- Oura M, Sternberg TH, Wright ET.** 1955. A new antifungal antibiotic, amphotericin B. *Antibiot. Annu.* 3:566-573.
- Pang KR, Wu JJ, Huang DB, Tyring SK.** 2004. Subcutaneous fungal infections. *Dermatol. Ther.* 17:523-531.
- Paniz AE, Stavropoulos C, Gelanew T, Loucas E, PerezAlvarez AM, Benaim G, Polsky B, Schoenian G, Sordillo EM.** 2011. Successful treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* with posaconazole. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55:1774-1776.
- Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, Anaissie EJ, Brumble LM, Herwaldt L, Ito J, Kontoyiannis DP, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA, Park BJ, Patterson TF, Perl TM, Oster RA, Schuster MG, Walker R, Walsh TJ, Wannemuehler KA, Chiller TM.** 2010. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin. Infect. Dis.* 50:1101-1111.

- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr., Calandra TF, Edwards JE Jr., Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD.** 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 48:503–535.
- Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A.** 2009. Antifungal drug resistance mechanisms. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. 7:453-460.
- Pemán J, Cantón E, Miñana JJ, Florez JA, Echeverria J, Ortega DN, Alarcón JM, Fontanals D, Sard BG, Moreno BB, Torroba L, Ayats J, Pérez MA, Fernández MA, Reus FS, Natal IF, García GR, Ezpeleta G, Martín-Mazuelos E, Iglesias I, Rezusta A, de Ocariz IR, Nieto AG; el grupo de estudio FUNGEMYCA.** 2011. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad al fluconazol de los aislamientos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. Rev. Iberoam. Micol. 28:91-99.
- Pfaller MA.** 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am. J. Med. 125: S3-S3.
- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ.** 2008. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. J. Clin. Microbiol. 46:150-156.
- Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, Diekema D.** 2011a. Comparison of the broth microdilution methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical and Laboratory Standards Institute for testing itraconazole, posaconazole, and voriconazole against *Aspergillus* isolates. J. Clin. Microbiol. 49:1110-1112.
- Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN.** 2011b. Triazole and echinocandin MIC distributions with epidemiological cutoff values for differentiation of

- wild-type strains from non-wild-type strains of six uncommon species of *Candida*. J. Clin. Microbiol. 49:3800-3804.
- Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN.** 2010a. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 48:1592-1599.
- Pfaller MA, Diekema DJ.** 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 42:4419-4431.
- Pfaller MA, Diekema DJ.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin. Microbiol. Rev. 20:133-163.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA, the Global Antifungal Surveillance Group.** 2010b. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J. Clin. Microbiol. 48: 1366-1377.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, Gibas DL, Newell VA.** 2006. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. J. Clin. Microbiol. 44:3551-3556.
- Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ.** 2011c. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. J. Clin. Microbiol. 49:845-850.

- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN; SENTRY Participants Group.** 2002. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1032–1037.
- Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH.** 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:268-280.
- Pfaller MA, Woosley L, Messer SA, Jones RN, Castanheira M.** 2012. Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeast and moulds in a Global Antifungal Surveillance Programme. *Mycopathologia.* 174: 259-271.
- Pimentel J, Mahadevan K, Woodgyer A, Sigler L, Gibas C, Harris OC, Lupino M, Athan E.** 2005. Peritonitis due to *Curvularia inaequalis* in an elderly patient undergoing peritoneal dialysis and a review of six cases of peritonitis associated with other *Curvularia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 43:4288-4292.
- Pirofski LA, Casadevall A.** 2002. The meaning of microbial exposure, infection, colonization and disease in clinical practice. *Lancet. Infect. Dis.* 2:628-635.
- Pontón J.** 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:78-82.
- Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J, Quindós G.** 2002. Hongos y actinomicetos alérgicos. *Rev. Iberoam. Micol. Bilbao,*
- Queiroz-Telles F, Berezin E, Leverger G, Freire A, Van der Vyver, Chotpitayasunondh T, Konja J, Diekmann-Berndt H, Koblinger S, Groll AH, Arrieta A; Micafungin Invasive Candidiasis Study Group.** 2008. Micafungin versus liposomal amphotericin B for pediatric patients with invasive candidiasis: substudy of a randomized double-blind trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27:820–826.

- Ragge N, Hart J, Easty D, Tyers A.** 1990. A case of fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* treatment with antifungal agent and penetrating keratoplasty. Br. J. Ophthalmol. 74:561–562.
- Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, Pullen R, Rinaldi MG.** 2002. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. Clin. Infect. Dis. 34:467-476.
- Revankar SG, Sutton DA.** 2010. Melanized fungi in human disease. Clin. Microbiol. Rev. 23:884-928.
- Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG.** 2004. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases. Clin. Infect. Dis. 38:206-216.
- Rivard RG, McCall S, Griffith ME, Hawley JS, Ressler RA, Borra H, Moon JE, Beckius ML, Murray CK, Hospenthal DR.** 2007. Efficacy of caspofungin and posaconazole in a murine model of disseminated *Exophiala* infection. Med. Mycol. 45:685-689.
- Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Denning DW, Donnelly JP, Fegeler W, Lass-Flörl C, Moore C, Richardson M, Gaustad P, Schmalreck A, Velegraki A, Verweij P. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** 2008. EUCAST definitive document EDef 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID\\_Library/3Publications/EUCAST\\_Documents/Other\\_Documents/EUCAST\\_moulds\\_DEFINITIVE\\_document\\_V\\_ISO\\_April\\_08%20final.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Other_Documents/EUCAST_moulds_DEFINITIVE_document_V_ISO_April_08%20final.pdf)
- Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Fegeler W, Lass-Flörl C, Moore C, Richardson M, Sandven P, Velegraki A, Verweij P. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** 2008.



- EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:398-405.
- Rosow L, Jiang JX, Deuel T, Lechpammer M, Zamani AA, Milner DA, Folkerth R, Marty FM, Kesari S.** 2011. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris spicifera* after heart transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 13:419-423.
- Rubio MC, Gil J, Benito R, Ramírez I, Navarro M.** 2007. Micosis más frecuentes en nuestro medio. En: Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica 2ª ed. . Rev. Iberoam. Micol. Bilbao.
- Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M.** 2009. Antifúngicos para uso sistémico. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27:353-362.
- Saha R, Das S.** 2005. *Bipolaris* keratomycosis. *Mycoses.* 48:453-455.
- Sandoval-Denis M, Sutton DA, Fothergill AW, Cano-Lira J, Gené J, Decock CA, de Hoog GS, Guarro J.** 2013. *Scopulariopsis*, a poorly known opportunistic fungus: spectrum of species in clinical samples and *in vitro* responses to antifungal drugs. *J. Clin. Microbiol.* 51:3937-3943.
- Savini V, Catavittello C, Di Marzio I, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, Pompilio A, Di Bonaventura G, D'Amario C, D'Antonio D.** 2010. Pan-azole-resistant *Candida guilliermondii* from a leukemia patient's silent funguria. *Mycopathologia.* 169:457-459.
- Savini V, Catavittello C, Onofrillo D, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Febbo F, D'Amario C, D'Antonio D.** 2011. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses.* 54:434-41.
- Schubert MS.** 2009. Allergic fungal sinusitis: pathophysiology, diagnosis and management. *Med. Mycol.* 47:S324-S330.
- Sellier P, Monsuez JJ, Lacroix C, Feray C, Evans J, Minozzi C, Vayre F, Del Giudice P, Feuilhade M, Pinel C, Vittecoq D, Passeron J.** 2000. Recurrent subcutaneous

- infection due to *Scopulariopsis brevicaulis* in a liver transplant recipient. Clin. Infect. Dis. 30:820-823.
- Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G.** 1986. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. J. Infect. Dis. 154:76-83.
- Schubert MS.** 2009. Allergic fungal sinusitis: pathophysiology, diagnosis and management. Med. Mycol. 47:S324-S330.
- Skovrlj B, Haghghi M, Smethurst ME, Caridi J, Bederson JB.** 2013. *Curvularia* abscess of the brainstem: a case report. World Neurosurgery. doi: 10.1016/j.wneu.2013.07.014.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC.** 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology. 141:1507-1521.
- Taguchi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Kawabata T, Wakayama M, Ogoshi T, Iwabuchi S, Shibuya K, Nishimura K, Takahashi K.** 2007. Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris spicifera* and *Schizophyllum commune*. Med. Mycol. 45: 559-564.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739.
- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC.** 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J. Clin. Microbiol. 43:284-292.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:4876-4882.
- Tietz HJ, Czaika V, Sterry W.** 1999. Case Report. Osteomyelitis caused by high resistant *Candida guilliermondii*. Mycoses. 42:577-580.
- Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP; National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals.** 2002. Secular trend of hospital-acquired

candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. Clin Infect Dis. 35:627-630.

**Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Donnelly JP, Garbino J, Groll AH, Hope WW, Jensen HE, Kullberg BJ, Lass-Flörl C, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, ESCMID Fungal Infection Study Group.** 2012. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). Clin. Microbiol. Infect. 18: 53-67.

**Unda F, Agüero J, Fariñas MC, Martínez-Martínez L.** 2011. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 29:282-285.

**Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D.** 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH-56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob. Agents. Chemother. 42:1771-1777.

**Viola GM, Sutton R.** 2010. Allergic fungal sinusitis complicated by fungal brain mass. Int. J. Infect. Dis. 14:299-301.

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

**Walsh TJ, Tepler H, Donowitz GR, Maertens JA, Baden LR, Dmoszynska A, Cornely OA, Bourque MR, Lupinacci RJ, Sable CA, de Pauw BE.** 2004. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. N. Engl. J. Med. 351:1391-1402.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR protocols: a guide to the methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. New York. Academic Press, pp 315-322.
- Wingard JR, Kubilis P, Lee L, Yee G, White M, Walshe L, Bowden R, Anaissie E, Hiemenz J, Lister J.** 1999. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. Clin. Infect. Dis. 29:1402-1407.
- Yang Q, Wei J, Chen Z.** 2012. Fatal bronchial invasion of *Scopulariopsis brevicaulis* in an acute monocytic leukemia patient. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 73:369-371.
- Yarrow D.** 1998. Methods for isolation, maintenance and classification of yeasts. En: Kurtzman CP., Fell JW. The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. Elsevier Science BV, Amsterdam, NL, p 77-100.
- Zaragoza R, Pemán J.** 2012. Opciones terapéuticas para el tratamiento antifúngico en el paciente crítico. Rev. Iberoam. Micol. 29:108-113.