

Actividad in vitro de anidulafungina, caspofungina y micafungina contra especies crípticas de *Candida*: curvas de letalidad, efecto postantifúngico y modelización farmacocinética/farmacodinámica

Tesis doctoral

Sandra Gil Alonso

2015



# *Agradecimientos*



La realización de este trabajo de Tesis de doctorado ha sido posible gracias a la beca de investigación predoctoral concedida por la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea y ha sido parcialmente financiado por los proyectos de investigación *Unidad de formación e investigación multidisciplinar sobre enfermedades microbianas para la promoción de una vida y un envejecimiento saludables*, UFI 11/25 (Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea), *Grupo de Investigación Consolidado del Sistema Universitario Vasco*, GIC07 123-IT-222 y GIC12 210-IT-696-13 (Consejería de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritzza), *Desarrollo de modelos Farmacocinéticos/Farmacodinámicos in vitro de fármacos antifúngicos contra especies emergentes de Candida*, S-PR12UN002 (Proyectos de Investigación Estratégica SAIOTEK 2012. Departamento de Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritzza), *Estudio in vitro de la actividad antifúngica de las estatinas frente a especies emergentes de Candida*, S-PE13UN025 (Proyectos de Investigación Estratégica SAIOTEK 2013. Departamento de Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritzza) y *Modelos in vivo para el estudio de la patogenicidad de Candida y su sensibilidad a fármacos antifúngicos: modelo experimental en Caenorhabditis elegans* (PI11/00203) Acción Estratégica de Salud 2011, Instituto de Salud Carlos III (FIS). Ministerio de Ciencia e Innovación.



Pues parece que se acerca el final de esta etapa, una etapa en la que he logrado hacer cosas que nunca pensé que podría haber hecho y por ello debo dar las gracias a un montón de personas que han estado ahí para que lo consiguiese.

Me faltan líneas para agradecer a mis directores de Tesis, Nerea y Guillermo, el esfuerzo que han hecho para que este trabajo salga adelante.

Nerea, gracias por estar, por enseñarme, por creer que podía hacerlo, por coger aquel artículo de “Venisse” y decidir empezar una nueva línea de trabajo conmigo. Gracias por empujarme a coger aquel avión que tanto temía y por haber llegado a ser algo más que la directora de esta Tesis.

Guillermo, gracias por aportar la tranquilidad, tu actitud hace más fáciles las cosas. Gracias por habernos recibido hace ya unos años con los brazos abiertos, haciendo que esta Tesis sea posible. Sencillamente gracias por cómo eres, que es lo que te hace grande.

Elena Eraso, gracias por el apoyo que me has brindado durante estos años y por tu disponibilidad para ayudarme siempre en todo, resolviendo cada una de las dudas. Especialmente te agradezco la voluntad para echarme una mano en estos últimos días de tanto cansancio.

Gracias Nacho, por las horas dedicadas en este trabajo, me has ayudado muchísimo, no solo con los modelos, sino también con esos consejitos que tengo guardados.

Emilia, gracias por tu atención, por estar siempre disponible al otro lado del teléfono y hacer esas conversaciones tan amenas, a pesar de su denso contenido, gracias por todas tus correcciones, de las que tanto he aprendido.

Elena Suárez, también quiero dedicarte unas líneas a tí, gracias por los ánimos en estos últimos días, que son tan necesarios y por haber sido la brújula que indica el norte.

Cristina, gracias por las largas conversaciones y por cada una de las risas dentro y fuera del labo, por la complicidad y por esos discursos que he buscado y he encontrado, cuando me he sentido sobrecargada.

Marcelo y Aketza, me encontré con vosotros desde el principio, y siempre voy a recordar aquellos buenísimos momentos en el labo que pasábamos los tres, cuando todavía defender la Tesis nos quedaba muy lejos. Marsselo, tienes casa aquí, que no se te olvide.

A los que llegasteis después, también os tengo que agradecer lo fácil que ha sido compartir con vosotros las horas en el labo, gracias por aportarme la energía que me quitaban los medios de cultivo y aquellas placas de petri interminables. Iker, Camino, Ainara y Juandí gracias por la ayuda prestada cuando lo he necesitado, y también por los momentos fuera del labo. Raquel, Naia y Desiré, gracias por la colaboración en esta Tesis, que ha acompañado a vuestro trabajo de Máster. Janire y Katherine os agradezco la ayuda desinteresada.

Janire de la Torre, gracias por tu buen humor. Pablo, fue una gozada conocerte aquel día con la Gangoiti, gracias por las charlas.

Esti, gracias por tus sabios consejos y por tu capacidad para hacerme ver que no era tan difícil, y que las cosas al final salen. Rocío y Carmen, gracias por los ratos compartidos, sois unas grandes personas. Guillermo Ezpeleta, muchas gracias por tener siempre un rato para resolver cualquier cuestión.

Gracias a las chicas del labo de arriba, Arantza e Inés, vosotras también habéis estado conmigo desde el principio, os agradezco cada rato juntas, vuestra amistad y los ánimos cuando poner a punto aquel sistema dinámico era de locos. Gracias Giulia, por transmitirme tu optimismo.

A mis chicas que tanto quiero, Lu, Hain y Elen, la distancia nunca ha sido una barrera entre nosotras, con vosotras empecé la licenciatura y junto a vosotras terminé el doctorado. Gracias.

A las amigas y amigos de siempre y de ahora, gracias por escucharme y por comprenderme, aunque muchas veces no entendáis muy bien de qué va todo esto. Habéis hecho, sin saberlo, que los ratos sean mejores.

Por último y de la forma más especial quiero agradecer a mi familia por haber sido el pilar que me ha mantenido y me mantiene en pie.

Tata, tú siempre has confiado en mí, gracias por estar siempre a mi lado con cada decisión y por contagiarme tu alegría, tu optimismo, tu bondad y tu fuerza para comerte el mundo. Recuerda que soy yo la que tiene mucho que aprender de tí. Jon, tu humor y tu tranquilidad han sido muy importantes en esta recta final, gracias por tu presencia.

Gracias a mis padres por enseñarme las cosas importantes, por sentir ese orgullo por mí, y por estar siempre y para todo, si he conseguido llegar hasta aquí ha sido por vosotros, esta Tesis es vuestra. Aita, gracias por no cuestionarme y simplemente estar conmigo, por tu fe en mí y por esa forma de ser tan bonita de la que quiero seguir aprendiendo. Dicen que madres no hay más que una y tú eres la mejor, ama, gracias por ser el motor de mi vida, por preocuparte tanto porque cada una de las cosas esté lista, por guiar mis pasos y por envolverme en paz cuando lo necesito.

Gracias al tío, por mostrarme un mundo alejado y a la vez muy cercano a la ciencia, donde las cosas con importancia son las fases lunares, la dirección del viento y la cantidad de lluvia, gracias por traer a Panchita, que me regala tantas alegrías y buenos momentos y donde junto a ella, en La Riba, encuentro la tranquilidad.

Joseba, ¿recuerdas cómo empezó todo...?. Tú has sido el mejor compañero que se puede tener, sabes mejor que nadie el esfuerzo y el cansancio que está suponiendo llegar a la meta. En esta aventura has estado muy cerca de mí, siempre me has animado y has creído que podía con todo. Gracias por la comprensión, la empatía, por ocuparte de todo en la recta final de esta carrera, por no dejarme sola y por tu calma, que hace que consiga seguir.



*A mis padres, por dármele todo*



# ÍNDICE





<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Candidiasis y candidemias.....	3
1.1.1. Especies crípticas.....	6
1.2. Fármacos antifúngicos de uso sistémico.....	8
1.2.1. Polienos o macrólidos poliénicos.....	9
1.2.2. Azoles.....	10
1.2.2.1. Fluconazol.....	11
1.2.2.2. Itraconazol.....	11
1.2.2.3. Posaconazol.....	12
1.2.2.4. Voriconazol.....	12
1.2.3. Equinocandinas.....	13
1.2.3.1. Origen.....	14
1.2.3.2. Química.....	14
1.2.3.3. Mecanismo de acción.....	15
1.2.3.4. Espectro antifúngico.....	16
1.2.3.5. Aspectos farmacológicos.....	16
1.2.3.6. Poblaciones especiales.....	17
1.2.3.7. Descripción de anidulafungina, caspofungina, micafungina.....	18
1.2.3.7.1. Anidulafungina.....	18
1.2.3.7.2. Caspofungina.....	18
1.2.3.7.3. Micafungina.....	20
1.2.4. Otros fármacos antifúngicos de uso sistémico.....	20
1.3. Farmacocinética y farmacocinética/farmacodinamia.....	21
1.3.1. Farmacocinética.....	22
1.3.2. Farmacodinamia.....	24
1.3.3. Análisis farmacocinético poblacional y modelado farmacocinético/farmacodinámico.....	24
1.3.4. Simulaciones.....	25

1.4. Estudio de la farmacocinética/farmacodinamia de los fármacos antifúngicos.....	26
1.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	26
1.4.1.1. Índices farmacocinéticos/farmacodinámicos basados en la CMI.....	27
1.4.1.2. Desventajas de la aproximación basada en la CMI.....	29
1.4.2. Curvas de tiempo-letalidad in vitro ( <i>time-kill curves</i> ).....	31
1.4.2.1. Curvas de letalidad in vitro estáticas.....	32
1.4.2.2. Curvas de letalidad in vitro dinámicas.....	33
1.4.2.3. Limitaciones de las curvas de letalidad.....	34
1.5. Modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos basados en curvas de tiempo-letalidad.....	36
1.6. Efecto postantifúngico ( <i>postantifungal effect</i> , PAFE).....	37
<b>2. Justificación y objetivos.....</b>	<b>39</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>45</b>
3.1. Materiales.....	47
3.1.1. Material de laboratorio.....	47
3.1.2. Medios de cultivo y reactivos.....	48
3.1.3. Equipos y aparatos de laboratorio.....	48
3.1.4. Programas informáticos.....	49
3.2. Microorganismos.....	49
3.3. Fármacos antifúngicos.....	51
3.4. Determinación de la sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos.....	51
3.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	53
3.4.2. Efecto de arrastre ( <i>carryover</i> ).....	53
3.4.3. Curvas de letalidad mediante el sistema estático.....	54
3.4.4. Determinación del efecto postantifúngico (PAFE).....	57
3.4.5. Curvas de letalidad mediante el sistema dinámico.....	59
3.5. Modelización y simulaciones FC/FD a partir de las curvas de letalidad del sistema in vitro estático.....	62

3.6. Modelización y simulaciones FC/FD a partir de las curvas de letalidad del sistema in vitro dinámico.....	65
<b>4. Resultados.....</b>	<b>67</b>
Estudio 1.....	69
Estudio 2.....	91
Estudio 3.....	109
Estudio 4.....	135
Estudio 5.....	161
Estudio 6.....	187
Estudio 7.....	211
Estudio 8.....	231
<b>5. Discusión.....</b>	<b>251</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>267</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>271</b>





# 1

---

## INTRODUCCIÓN





## 1.1. Candidiasis y candidemias

---

La candidiasis invasiva es una causa de mortalidad destacada. Su presentación más habitual es la candidemia pero en más de un 30% de las candidiasis invasivas, los hemocultivos son negativos. Estas micosis invasivas son principalmente infecciones adquiridas en el hospital y aproximadamente dos tercios de ellas tienen su origen en diferentes áreas. En los últimos años, la candidiasis invasiva comunitaria está aumentando en asociación a un aumento de la asistencia sanitaria domiciliaria [1,2].

La incidencia de la candidiasis invasiva se ha mantenido similar en los últimos años e incluso ha disminuido ligeramente en Australia, Canadá, Europa y EEUU. Sin embargo, la incidencia está creciendo en América Latina y el resto del mundo [1,3,4]. Cabe destacar, que en Dinamarca y España, la incidencia actual de las candidiasis invasivas es mayor que en el resto de países europeos [5].

La mayor incidencia de candidiasis invasiva se presenta en varones (60%) de edades extremas (niños menores de un año y adultos mayores de 65 años), en pacientes con cáncer, con diabetes o con inmunodeficiencias [3,6-8]. Las neoplasias son enfermedades de base frecuentes en los pacientes que sufren candidemia, pero hay grandes diferencias según el tipo de cáncer. En aquellos pacientes con neoplasias hematológicas, la quimioterapia y la consiguiente neutropenia, las mucositis del tracto digestivo y el tratamiento con corticoides suponen claros factores de riesgo para la candidiasis invasiva [5]. Sin embargo, en los pacientes con tumores sólidos, la candidemia se asocia con frecuencia a complicaciones de la cirugía, a la estancia en la unidad de cuidados intensivos (UCI), unidades de reanimación (REA), la ventilación mecánica, la nutrición parenteral y la presencia de catéteres intravenosos [9].

La incidencia de candidemia en el paciente crítico sin neutropenia ha experimentado un crecimiento significativo en los últimos años [10,11]. En España la incidencia de candidemia se

estima en 9,2 episodios/100 habitantes [12], de los que entre un 33% y un 55% de los casos se localizan en las UCI.

El incremento de incidencia de las candidemias se acompaña de un cambio en la distribución de las distintas especies de *Candida*. *Candida albicans* continúa siendo la etiología más frecuente de las candidiasis invasivas y alrededor del 50% de todos los aislamientos de hemocultivos corresponden a esta especie. Sin embargo, se está observando un cambio epidemiológico, con un incremento notable de especies de *Candida* diferentes de *C. albicans*. Las razones de este cambio no se conocen bien, pero se han asociado varios factores según las especies implicadas. En el estudio SENTRY, llevado a cabo en los años 2008 y 2009, se incluyeron aislamientos de *Candida* de 79 centros médicos, entre el 90-95% de los aislamientos pertenecían a cinco especies: *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, en este orden de incidencia [13]. El estudio FUNGEMYCA, llevado a cabo en 44 hospitales españoles, muestra que la incidencia en 1357 episodios de fungemia evaluados, fue de 0,92 por 1000 ingresos; *C. albicans* fue la especie que más frecuentemente aislada (0,41 episodios/1000 ingresos) seguida de *C. parapsilosis sensu stricto* (0,22). *Candida orthopsilosis* fue la quinta causa de fungemia (0,02), superada por *C. glabrata* y *C. tropicalis*. En este estudio se describieron más episodios de fungemia en las UCI y en los servicios quirúrgicos que en el resto de las unidades y servicios hospitalarios. La resistencia microbiológica global a las equinocandinas fue muy baja: el 0,4% de los aislamientos de *Candida* eran resistentes in vitro a caspofungina, el 0,8% lo eran a anidulafungina y el 1,1% a micafungina [12]. Resultados similares encontraron en el estudio multicéntrico CANDIPOP, realizado en España entre 2010 y 2011, donde se detectaron 773 episodios de infecciones sistémicas producidas por *Candida*, esto correspondió a una incidencia de 0,89 episodios por 1000 ingresos; *C. albicans* fue la especie predominante (45,4%), seguida de *C. parapsilosis* (24,9%), *C. glabrata* (13,4%) y *C. tropicalis* (7,7%) [14].

La distribución de las candidemias causadas por especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* difiere según la población de pacientes estudiados y las características del hospital [15-18]. Además, las candidemias causadas por estas especies pueden ser más graves porque muchas son resistentes a fluconazol y otros fármacos antifúngicos, como *C. glabrata* y *C. krusei* [6,13,17,19-21]. Además de una importante carga económica para los sistemas sanitarios, la infección invasiva por *Candida*, en general, y la candidemia, en particular, se asocian con una importante tasa de mortalidad en los pacientes críticos. Así en Estados Unidos, la candidemia se asocia con un incremento del 14,5% de la mortalidad en adultos [22]. Por su parte, las tasas de mortalidad cruda y de mortalidad atribuible asociadas con la candidiasis invasiva se establecen, respectivamente, en el 40-78% y el 20-40% [21,23]. Desde 1989, la mortalidad asociada a la infección invasiva por *Candida*, se ha reducido en un 50%, tanto en pacientes con VIH como en pacientes sin esta infección. La explicación de esta reducción de mortalidad puede atribuirse al diagnóstico temprano o a la terapia antifúngica mejorada frente a las candidemias.

*C. parapsilosis* causa candidemias en recién nacidos y adultos jóvenes. Esta especie suele tener un origen exógeno y contamina instrumental y diferentes dispositivos médicos, por lo que induce candidemia asociada a catéteres [24]. Las candidemias por *C. parapsilosis* se asocian con una menor letalidad (23%) [8,19,20]. *C. parapsilosis* es sensible a la mayoría de los fármacos antifúngicos, pero se han descrito aislamientos clínicos con reducida sensibilidad a los azoles y a las equinocandinas [6-9,18,21,25-34].

*C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* se aíslan de hemocultivos de pacientes de mayor edad (> 65 años) con importantes factores de riesgo subyacentes, como cirugía abdominal, tumores sólidos y neoplasias hematológicas, trasplantes o tratamientos prolongados con corticoides [8,9,12,34].

También se han descrito diferencias geográficas importantes en la distribución de las especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* causantes de candidiasis invasiva: *C. parapsilosis* predomina en Australia, América Latina y los países de la cuenca mediterránea de África, Asia y Europa. Por el

contrario, *C. glabrata* desempeña un papel etiológico sustancial en los Estados Unidos y en los países nórdicos y de Europa central (Figura 1.1). Por último, un aspecto muy importante y preocupante es que la mortalidad atribuida a la candidiasis invasiva sigue siendo inaceptablemente alta [5].



**Figura 1.1:** Distribución de las especies más frecuentes diferentes a *Candida albicans*. Obtenida de [5]

### 1.1.1. Especies crípticas

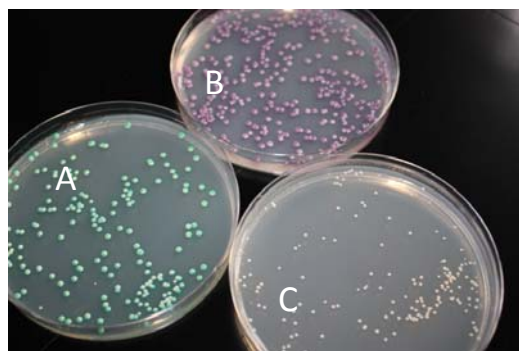
Las tres especies más prevalentes, *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* (Figura 1.2) son realmente complejos de especies con características clínicas y demográficas especiales, e incluyen a otras especies, denominadas crípticas [29,31,35-37].

El complejo de especies *C. albicans* incluye tres especies diferentes, *C. albicans sensu stricto*, *Candida dubliniensis* y *Candida africana*. En 1995, *C. dubliniensis* se describió como una nueva especie patógena oportunista que producía candidiasis oral en pacientes con infección por el VIH [38]. Sin embargo, esta especie se ha aislado también de sangre, muestras vaginales, fecales y orofaríngeas [35,39-41]. En un estudio de la epidemiología de las especies diferentes de *C. albicans*, se observó que *C. dubliniensis* suponía el 1,5% del total de las especies aisladas [42]. *C. africana* se propuso como nueva especie en 2001 [43] que causa vulvovaginitis [37,43-46].

Desde el año 1990 se ha demostrado que *C. parapsilosis* integraba realmente a tres especies, *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida metapsilosis* y *C. orthopsilosis* [47]. En un estudio realizado en

España, *C. orthopsilosis* era la quinta especie más frecuente aislada en los episodios de candidemia, por delante de *Candida krusei* [12,30]. Del mismo modo, en el estudio FUNGEMYCA se vio que de 364 los aislamientos del complejo *C. parapsilosis*, *C. parapsilosis sensu stricto* fue la más prevalente (90,7%), seguida de *C. orthopsilosis* (8,2%) y *C. metapsilosis* (1,1%). La mayoría de las candidemias en adultos y neonatos no se aislaron *C. metapsilosis* ni *C. orthopsilosis*. Cabe destacar que la distribución geográfica de estas especies no es uniforme [31]. La prevalencia de *C. orthopsilosis* es aparentemente mayor en países cálidos y húmedos, aunque otros factores como el hospital donde esté ingresado el paciente y las características del enfermo influyen [29] Diferenciar estas especies no solo tiene interés desde el punto de vista epidemiológico, sino también por la diferente sensibilidad a los fármacos antifúngicos que presentan, siendo *C. parapsilosis* más resistente que *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* [29,31] y por la virulencia, ya que se ha comprobado que *C. parapsilopsis* y *C. orthopsilosis* tienen un comportamiento similar mientras que *C. metapsilosis* posee un virulencia menor [48].

El complejo *C. glabrata* también incluye tres especies, *C. glabrata sensu stricto*, *Candida bracarensis* y *Candida nivariensis* [36,49]. En un estudio realizado por Lockhart y cols. [50], observaron que *C. bracarensis* y *C. nivariensis* constituían el 0,2% de los aislamientos de *C. glabrata sensu lato*. Sin embargo, estas especies podrían ser más prevalentes en algunas regiones. Se conoce poco acerca de la prevalencia y de la sensibilidad a los fármacos antifúngicos de estas especies. Aunque algunos estudios revelan la baja sensibilidad de *C. bracarensis* y *C. nivariensis* a los azoles [51,52].



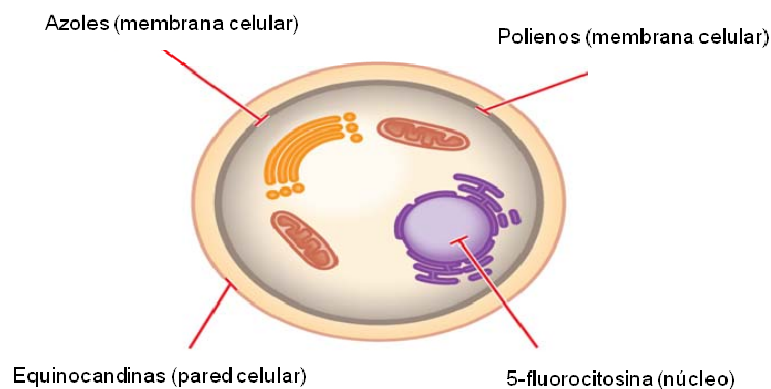
**Figura 1.2:** Aspecto de un cultivo de *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B) y *C. parapsilosis* (C) en medio cromógeno CHROMagar Candida

## 1.2. Fármacos antifúngicos de uso sistémico

El tratamiento de las candidiasis invasivas se realiza en función de diferentes criterios clínicos, microbiológicos y farmacológicos, del estado inmunológico del paciente, las características concretas de la candidiasis (etiología, sensibilidad antifúngica, localización orgánica, diseminación, etc.). Las características de los fármacos antifúngicos disponibles (administración, metabolismo, eliminación, interacciones con otros fármacos y toxicidad), son importantes para la toma de una decisión terapéutica.

Los fármacos antifúngicos más utilizados se clasifican en tres grandes grupos: los polienos o macrólidos poliénicos (anfotericina B y nistatina), las equinocandinas (anidulafungina, caspofungina y micafungina) y los azoles. Estos últimos forman el grupo más amplio e incluyen a los imidazoles (ketoconazol y miconazol) y los triazoles (fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol). Otros fármacos con diferentes acciones antifúngicas y de uso sistémico potencial son la 5-fluorocitosina, la griseofulvina y la terbinafina [53].

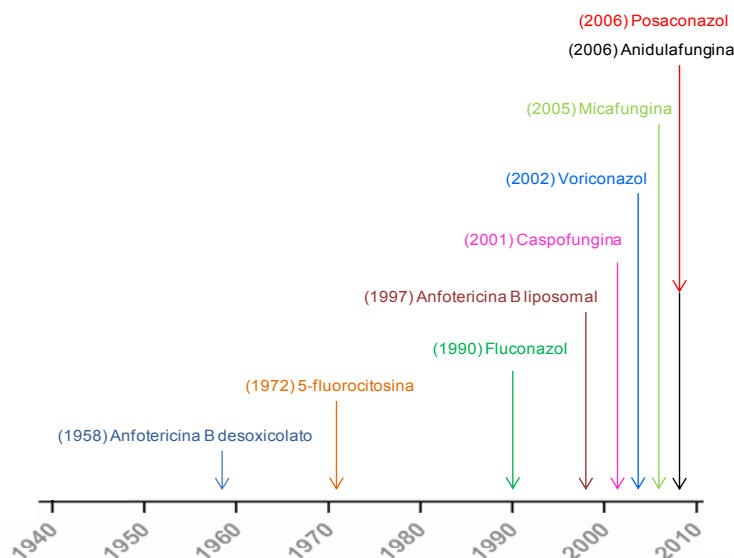
Los principales fármacos antifúngicos se pueden clasificar de acuerdo a su modo de acción (Figura 1.3): unión al ergosterol y ruptura de las membranas celulares fúngicas (polienos), inhibición de la síntesis de ergosterol (azoles), inhibición de la síntesis de 1,3- $\beta$ -D-glucano (equinocandinas) e inducción de síntesis incorrecta de ARN e interferencia con la replicación de ADN (5-fluorocitosina) [54].



**Figura 1.3:** Dianas de acción de los principales fármacos antifúngicos. Modificada de [54]



En la Figura 1.4 se muestra el año en el que se comenzaron a emplear los principales fármacos antifúngicos.



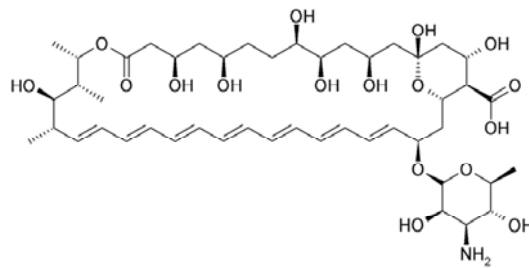
**Figura 1.4:** Año en el que se comenzaron a emplear los principales fármacos antifúngicos

### 1.2.1. Polienos o macrólidos poliénicos

En este grupo están incluidos anfotericina B y nistatina. La anfotericina B se obtuvo a partir del actinomiceto *Streptomyces nodosus* (Figura 1.5). La anfotericina B actúa sobre las membranas celulares de los hongos, en las que interfiere en las funciones de permeabilidad y transporte. Su característica más importante es crear grandes poros en la membrana. La relativa especificidad por los hongos se debe a la mayor afinidad del fármaco por el ergosterol. La anfotericina B es activa frente a la mayoría de los hongos y levaduras y es el tratamiento de elección para las infecciones diseminadas por *Candida* o *Aspergillus*. Administrada por vía oral, la anfotericina B se absorbe muy poco. En las micosis sistémicas se suele administrar en liposomas u otros preparados que contienen lípidos mediante una inyección intravenosa lenta. Con estas formulaciones se mejora la farmacocinética y se reducen los importantes efectos adversos que

causa, como la nefrotoxicidad. Este fármaco se une más del 90% a proteínas séricas; la mayor parte se degrada, pero se eliminan pequeñas cantidades en orina durante varios días.

La nistatina tiene el mismo mecanismo de acción y su estructura es similar a la de la anfotericina B. Su uso se limita a las candidiasis de la piel, las mucosas y del aparato digestivo [55].



**Figura 1.5:** Estructura química de la anfotericina B

### 1.2.2. Azoles

Los azoles son uno de los principales grupos de fármacos antifúngicos utilizados. Actúan inhibiendo la síntesis de ergosterol, mediante la inhibición de la 14- $\alpha$ -desmetilasa del lanosterol, enzima acoplada al citocromo P-450, que transforma el lanosterol en ergosterol por escisión de un grupo metilo del lanosterol [56]. La inhibición de la síntesis del ergosterol produce una alteración en la fluidez de la membrana, aumentando su permeabilidad e inhibiendo el crecimiento celular y su multiplicación.

Los azoles son útiles tanto para el tratamiento de las candidiasis vaginales y de la piel como el de las micosis invasivas en pacientes con inmunodeficiencia. Los triazoles más recientes, posaconazol y voriconazol, han demostrado gran eficacia en el tratamiento de candidiasis invasivas, orofaríngeas y esofágicas refractarias al tratamiento con otros fármacos antifúngicos. Además, son eficaces en el tratamiento de las aspergilosis y otras micosis invasivas por hongos filamentosos [57-60].

### 1.2.2.1. Fluconazol

---

El fluconazol pertenece al grupo de los azoles de segunda generación, como el itraconazol, posaconazol y voriconazol (Figura 1.6). El fluconazol tiene actividad fungistática de amplio espectro contra *C. albicans* pero es menos activo contra *C. glabrata* y *C. krusei* [61-63].

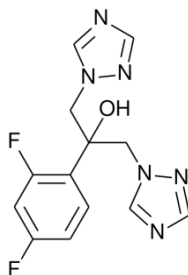


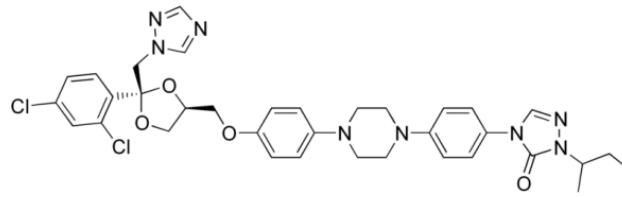
Figura 1.6: Estructura química del fluconazol

El fluconazol se absorbe muy bien por vía oral. Se metaboliza por las enzimas del citocromo P-450 en el hígado y se elimina principalmente por vía renal [64]. Su semivida de eliminación es de 27-37 h [65]. El fluconazol es uno de los fármacos antifúngicos más utilizados tanto en el tratamiento de las candidiasis [14], como en la profilaxis antifúngica en pacientes con neutropenia. Además, este fármaco da lugar a pocos efectos adversos.

### 1.2.2.2. Itraconazol

---

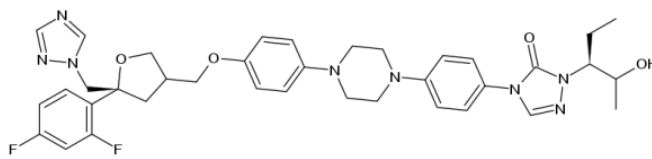
El itraconazol es un fármaco lipófilo de amplio espectro (Figura 1.7). El itraconazol es una alternativa en el tratamiento de pacientes infectados por *Candida* resistentes a fluconazol, aunque su actividad es menor contra las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* [66,67]. Es eficaz en el tratamiento de las micosis superficiales y en candidiasis orofaríngeas de pacientes infectados con el VIH [68,69]. El itraconazol está disponible en formulaciones oral e intravenosa. Para el tratamiento de las micosis invasivas se utiliza la formulación intravenosa, ya que por vía oral la absorción es errática [70].



**Figura 1.7:** Estructura química del itraconazol

### 1.2.2.3. Posaconazol

El posaconazol es un triazol lipófilo que posee el mayor espectro antifúngico de los triazoles (Figura 1.8), que incluye a la mayoría de las especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* y otros hongos filamentosos [71]. El posaconazol es fungistático contra *Candida* y fungicida contra *Aspergillus*. Este fármaco tiene baja solubilidad en medios acuosos, debido a esto su absorción oral está limitada por la dosis y depende de la ingesta de alimentos. La concentración plasmática máxima se alcanza entre 5 y 8 horas después de su administración oral. El posaconazol se une a la albúmina sérica en > 98%, se distribuye de forma amplia y se elimina lentamente [72]. Atraviesa la barrera hematoencefálica en mayor grado que el itraconazol [73,74].

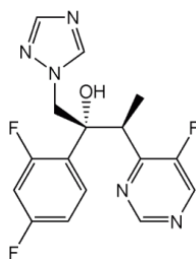


**Figura 1.8:** Estructura química del posaconazol

### 1.2.2.4. Voriconazol

El voriconazol, triazol de segunda generación que deriva del fluconazol, posee un amplio espectro y tiene muy buena actividad in vitro contra especies fúngicas resistentes al fluconazol, como *C. krusei* y *C. glabrata* (Figura 1.9) [75]. La acción del voriconazol contra *Candida* y otras levaduras es fungistática, mientras que contra *Aspergillus* y *Fusarium* es fungicida. Además, se ha

observado una acción sinérgica frente a otros hongos filamentosos cuando el voriconazol se combina con una equinocandina [76-78]. El voriconazol se puede administrar tanto por vía oral como intravenosa para adaptarse a las diferentes necesidades terapéuticas, con baja toxicidad, y excelente biodisponibilidad.

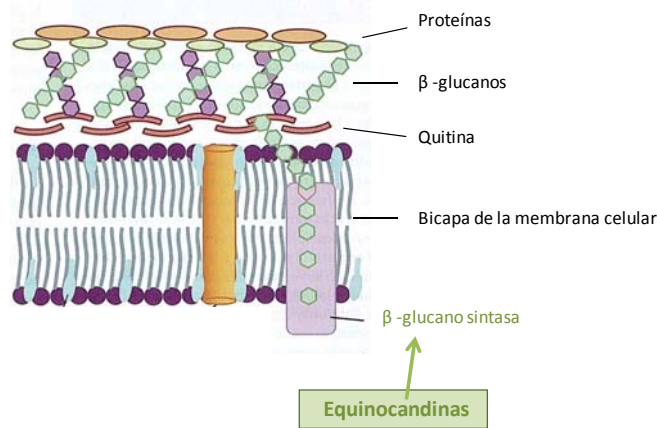


**Figura 1.9:** Estructura química del voriconazol

### 1.2.3. Equinocandinas

---

Las equinocandinas, anidulafungina, caspofungina y micafungina, son una familia de fármacos antifúngicos lipopéptidos semisintéticos, de estructura compleja, capaces de inhibir la biosíntesis de 1,3- $\beta$ -D-glucano, un componente esencial de la pared fúngica, mediante la inhibición de la enzima 1,3- $\beta$ -D-glucano sintasa (Figura 1.10). Su uso es únicamente intravenoso. Son activas contra *Candida* y *Aspergillus*. Muestran escasas interacciones pocos efectos adversos. No atraviesan la barrera hematoencefálica. Las equinocandinas son útiles tanto en monoterapia como combinadas con anfotericina B, posaconazol o voriconazol para el tratamiento de las micosis sistémicas [79,80].



**Figura 1.10:** Membrana y pared celular fúngica. Mecanismo de acción de las equinocandinas. Modificada de [81]

### 1.2.3.1. Origen

La micafungina proviene de *Coleophoma empetri* [82], la anidulafungina de *Aspergillus nidulans* y la caspofungina es sintetizada a partir de *Glearea lozoyensis* [83]. La primera equinocandina en ser aislada fue la anidulafungina en 1974. Posteriormente, las investigaciones llevaron en 1989 al descubrimiento de la caspofungina, siendo la micafungina la última, sintetizada en 1990. En el año 2001, la caspofungina se comenzó a emplear en el tratamiento de las micosis, seguida de la micafungina en 2005 y finalmente de la anidulafungina en 2006, las tres aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) [84].

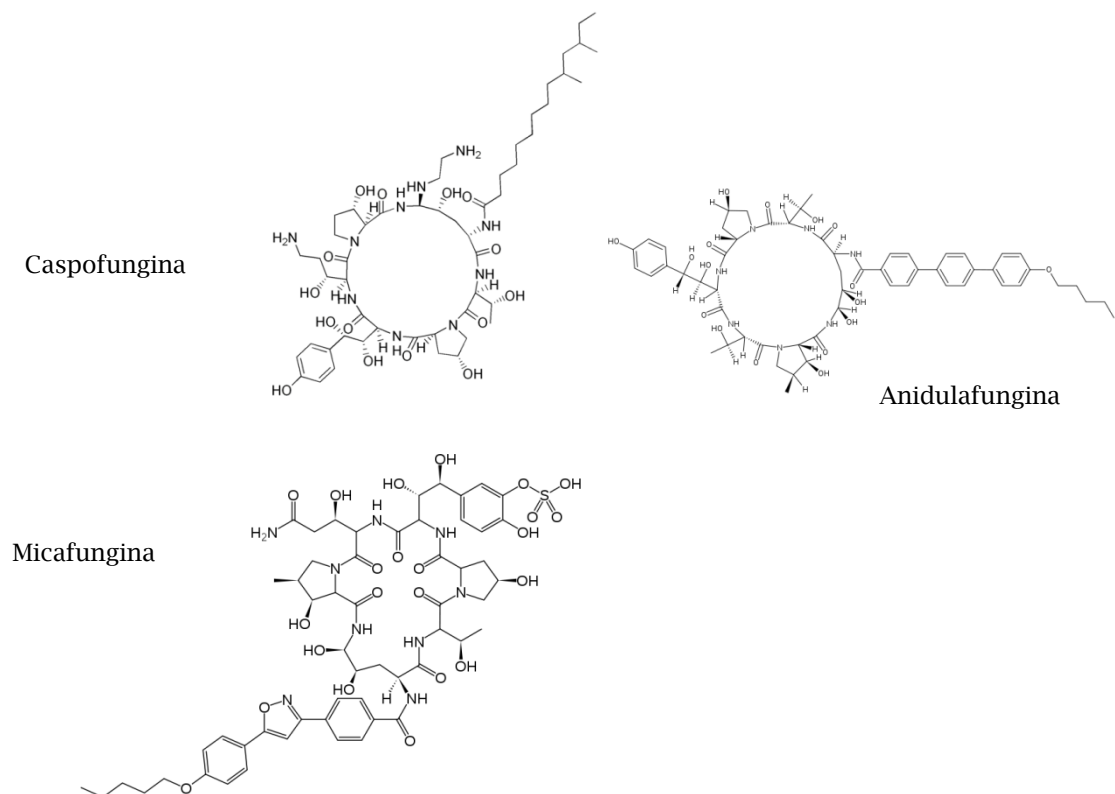
### 1.2.3.2 Química

Las equinocandinas son un grupo de lipopéptidos semisintéticos de gran tamaño, productos de la fermentación de varios hongos, poseen un anillo de seis aminoácidos unidos a una cadena lateral lipófila (Figura 1.11) [85].

La caspofungina tiene un ácido graso como cadena lateral, micafungina una complejo aromático 3,5-difenilisoaxazol sustituido, y anidulafungina una cadena alcoxitrifenilo. Se cree que esta cadena lateral se introduce en la bicapa lipídica de la membrana celular fúngica.

### 1.2.3.3. Mecanismo de acción

Las equinocandinas son lipopéptidos de alto peso molecular que actúan inhibiendo de forma no competitiva la 1,3- $\beta$ -D-glucano sintasa, provocando así una inestabilidad osmótica de las células fúngicas e impidiendo su crecimiento y reproducción. La ventaja de este mecanismo es que las células de los mamíferos no contienen 1,3- $\beta$ -D-glucano, lo que explicaría la escasa toxicidad de este grupo de fármacos [84]. La acción de la equinocandinas depende de la concentración y estas son fungicidas para todas las especies de *Candida* y fungistáticas contra *Aspergillus*, debido a que la 1,3- $\beta$ -D-glucano sintasa está sólo implicada en el crecimiento apical de las hifas, por lo cual sólo se lisan en fase activa de crecimiento [86].



**Figura 1.11:** Estructura química de las equinocandinas anidulafungina, caspofungina y micafungina

#### 1.2.3.4. Espectro antifúngico

---

El espectro de actividad de las equinocandinas se limita a aquellos hongos en los que los 1,3-β-D-glucanos son uno de los componentes principales de su pared celular, como *Aspergillus* y *Candida*. Los hongos en los que estas moléculas no son tan relevantes o están ausentes, como *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Fusarium* y los mucorales, son resistentes a la acción de este grupo de fármacos. Tienen acción contra las biopelículas fúngicas porque el 1,3-β-D-glucano es una molécula esencial en la adhesión de los hongos a las superficies abióticas y celulares. También son activos contra las formas quísticas de *Pneumocystis jirovecii*. Se han descrito algunos aislamientos clínicos de *Candida famata*, *Candida guilliermondii* y *C. parapsilosis* con una sensibilidad reducida a las candinas. Entre los hongos más resistentes se encuentran *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Purpureomyces*, *Lomentospora prolificans* y *Trichosporon* [53].

#### 1.2.3.5. Aspectos farmacológicos

---

Las equinocandinas tienen una biodisponibilidad oral muy limitada (< 10%) y su uso clínico es exclusivamente intravenoso. Se caracterizan por su elevada unión a proteínas plasmáticas (> 95%) y su amplia distribución en órganos y tejidos. Sin embargo, su penetración en líquido cefalorraquídeo es escasa y es prácticamente nula en el humor vítreo. Las tres equinocandinas presentan una actividad antifúngica dependiente de la concentración [87]. Su perfil de seguridad y sus escasas interacciones farmacológicas convierten a este grupo de fármacos en los fármacos antifúngicos de primera elección para el tratamiento y profilaxis de la candidiasis invasiva en pacientes con inmunodeficiencias, enfermos críticos o con una posibilidad alta de interacciones medicamentosas [53].



### 1.2.3.6. Poblaciones especiales

---

- *Pacientes con disfunción hepática*

No es necesario realizar ajuste posológico de anidulafungina ni de micafungina en pacientes con disfunción hepática. Con caspofungina, se recomienda disminuir la dosis de mantenimiento [88].

- *Pacientes con disfunción renal*

Debido a que las equinocandinas prácticamente no se eliminan por orina, no es necesario realizar ajuste posológico en casos de insuficiencia renal. Asimismo, debido a que no son moléculas dializables, no es necesario ajustar la dosificación en pacientes tratados con técnicas de depuración extrarrenal [88].

- *Ancianos y niños*

En los pacientes de edad avanzada no es necesario modificar la pauta posológica de las equinocandinas [88]. La experiencia clínica con equinocandinas en la población pediátrica es mucho más limitada que en adultos. Caspofungina ha sido aprobada por la Agencia Europea del Medicamento para su administración en pacientes pediátricos. Anidulafungina no se debe administrar en pacientes menores de 18 años. Micafungina también tiene indicación pediátrica y es la única indicada en neonatos. Es preciso dosificar en función del peso corporal estimado del niño [89].

- *Embarazadas*

Son fármacos de categoría C en el embarazo y deben evitarse si existe otra alternativa terapéutica, así como durante la lactancia [90].

### 1.2.3.7. Descripción de anidulafungina, caspofungina y micafungina

---

#### 1.2.3.7.1. Anidulafungina

La anidulafungina se administra por vía intravenosa con una dosis de carga de 200 mg en infusión de tres horas, seguida de dosis diarias de 100 mg. Su fijación a proteínas plasmáticas es de > 99% [91]. Con 100 mg diarios de anidulafungina se obtiene una  $C_{\max}$  de 3,44 - 7,5  $\mu\text{g/ml}$  y una  $ABC_{24\text{h}}$  de 44,4 - 104,5  $\text{mg} \times \text{h/l}$ . Su semivida de eliminación es de 25,6 h y su volumen de distribución de 33,4 l [88]. Se distribuye en el organismo siguiendo un modelo bicompartimental. No se metaboliza en el hígado y experimenta una degradación química espontánea, dando lugar a un péptido carente de actividad antifúngica que se elimina por vía biliar (eliminación: renal < 1%, fecal > 90%). No se dializa y no requiere ajuste de la dosis en caso de insuficiencia renal o hepática. En su metabolismo no interviene ni CYP450, ni la P-glicoproteína, debido a esto, las interacciones con otros medicamentos son muy poco frecuentes. Sin embargo, se ha visto que la ciclosporina eleva las concentraciones plasmáticas de anidulafungina. Los efectos adversos más frecuentes son flebitis en el lugar de la administración, alteraciones de la coagulación, elevación transitoria de las transaminasas, fiebre, cefalea y trastornos gastrointestinales. La administración con otros fármacos antifúngicos, como anfotericina B, itraconazol, posaconazol o voriconazol, puede ser aditiva e incluso sinérgica frente a *Candida*, *Aspergillus* y otros hongos filamentosos. La anidulafungina está indicada para el tratamiento de la candidemia en pacientes con y sin neutropenia así como en el de la candidiasis esofágica [53].

#### 1.2.3.7.2. Caspofungina

La caspofungina se administra por vía intravenosa, en forma de acetato en infusión lenta con una dosis de carga de 70 mg, seguida de dosis diarias de 50 mg. En caso de pacientes con más de 80 kg de peso, se recomienda seguir con dosis diarias de 70 mg. Su fijación a proteínas plasmáticas es del 96% [91]. Con 50 mg intravenosos diarios de caspofungina se obtienen una  $C_{\max}$  de

10-12,1  $\mu\text{g/ml}$  y una  $\text{ABC}_{24\text{h}}$  de 93,5 - 100,5  $\text{mg} \times \text{h/l}$ . Presenta una semivida de eliminación de 10 -14 h y un volumen de distribución de 9,5 l [88]. Se metaboliza en el hígado mediante hidrólisis peptídica lenta, N-acetilación y degradación, generando metabolitos sin actividad antifúngica. El 41% se elimina por orina en forma de metabolitos inactivos, (1,4% inmodificado) y el 35% por vía fecal [92]. Debido a que se elimina lentamente por las heces y la orina, puede detectarse más de 20 días después de la administración de una dosis. No se dializa y no se requiere el ajuste de la dosis en caso de insuficiencia renal. Se recomienda una reducción de la dosis en pacientes con insuficiencia hepática moderada. Aunque es un sustrato débil del CYP450, se han descrito algunas interacciones medicamentosas de la caspofungina que deben tenerse en cuenta en enfermos polimedicados. Las concentraciones de tacrolimus pueden reducirse hasta un 20%, por lo que sus concentraciones plasmáticas deben monitorizarse cuando se administra con caspofungina. El uso concomitante de caspofungina y fármacos inductores enzimáticos, como la fenitoína, rifampicina, carbamacepina y efavirenz, puede producir una reducción en los valores séricos de esta candina. Los efectos adversos son infrecuentes y de escasa gravedad, siendo los más habituales los gastrointestinales. También se han descrito alteraciones reversibles de las enzimas hepáticas (aumento de transaminasas y fosfatasa alcalina), cefalea, exantema, prurito y, con menor frecuencia, hipocaliemia, hipoalbuminemia, hipercalcemia, trombocitopenia y leucocitopenia. La caspofungina está indicada en el tratamiento de la candidiasis invasiva, y en el de las candidiasis orofaríngeas y esofágicas, cuando son refractarias a otros tratamientos antifúngicos. Caspofungina también está indicada la caspofungina en la terapia de la aspergilosis invasiva en aquellos pacientes que no toleran otros fármacos antifúngicos o no responden al tratamiento. Se recomienda su uso en el tratamiento empírico de los pacientes con neutropenia febril. Además puede resultar útil en el tratamiento combinado con anfotericina B, itraconazol, voriconazol o posaconazol de las mucormicosis y de las infecciones por hongos multirresistentes, como *Lomentospora prolificans* [53].

### **1.2.3.7.3. Micafungina**

La micafungina se administra en dosis de 100 mg/día en infusión intravenosa y no requiere dosis de carga. Su fijación a proteínas plasmáticas es del 99,8% [91]. Con 100 mg intravenosos diarios de micafungina se obtienen una  $C_{max}$  de 7,1 - 10  $\mu\text{g/ml}$  y una  $ABC_{24h}$  de 59,9 - 111,3  $\text{mg} \times \text{h/l}$ . Presenta una semivida de eliminación de 13 - 18 h y un volumen de distribución de 14 l [88]. Se distribuye siguiendo un modelo bicompartimental. Se metaboliza en el hígado por la vía de la catecol-O-metiltransferasa y mediante una arilsulfatasa, originando diferentes componentes inactivos que se eliminan por vía biliar. No se dializa y no es necesario ajustar la dosis en caso de insuficiencia renal o hepática. Micafungina es un inhibidor leve de CYP450 y se ha observado un incremento en la concentración plasmática de sirolimus y nifedipina en un 21% y un 18%, respectivamente, cuando se administran conjuntamente con micafungina. Los efectos adversos más frecuentes son leucopenia, neutropenia, anemia y trastornos gastrointestinales. La micafungina está indicada en el tratamiento de la candidiasis invasiva, en el de la esofagitis candidiásica y en el de aquellas candidiasis orofaríngeas que son recalcitrantes a otros tratamientos antifúngicos [53].

### **1.2.4. Otros fármacos antifúngicos de uso sistémico**

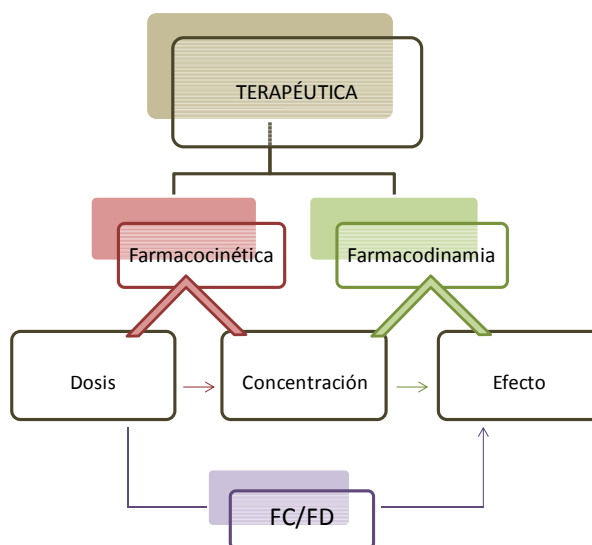
---

En este grupo estarían incluidos la 5-fluorocitosina, la griseofulvina y la terbinafina. Su utilización se limita al tratamiento de las micosis cutáneas, aunque de forma ocasional se pueden administrar en combinación con otros fármacos antifúngicos más potentes, como la anfotericina B, caspofungina o voriconazol, para el tratamiento de algunas micosis invasivas, como aspergilosis, criptococosis o mucormicosis refractarias a los tratamientos de primera elección [53].

### 1.3. Farmacocinética y farmacocinética/farmacodinamia

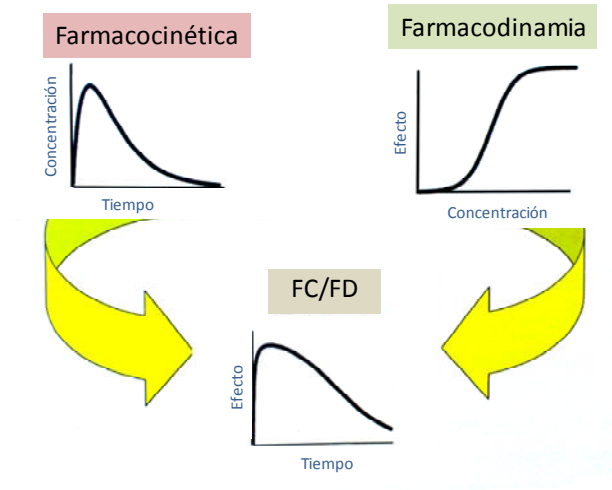
La dosis administrada a un paciente se relaciona con el efecto a través de dos procesos globales, la farmacocinética (FC) y la farmacodinamia (FD). La FC relaciona la dosis de un fármaco con la concentración que alcanza en plasma o en los tejidos. La FD relaciona la concentración alcanzada con el efecto farmacológico (Figura 1.12). Mientras que FC se define como “de qué manera influye el paciente sobre el fármaco”, la FD se define como “de qué manera influye el fármaco sobre el paciente” [93]. FC y FD son componentes clave en el desarrollo moderno de fármacos.

Una vez que la FC y la farmacocinética/farmacodinamia (FC/FD) se han caracterizado, se puede determinar la concentración que produce el efecto deseado y es posible obtener el régimen de dosificación que va a dar lugar a las concentraciones deseadas [94].



**Figura 1.12:** Relación dosis-efecto de un fármaco

En el modelado FC/FD se describe y cuantifica la relación entre la dosis, la concentración y los efectos de un fármaco [94]. El modelado y la simulación FC/FD pueden ser herramientas muy útiles en la selección de regímenes de dosificación, pudiendo obtener un perfil de concentración-tiempo que podría dar lugar al resultado deseado (Figura 1.13).



**Figura 1.13:** Integración de la relación concentración versus tiempo (farmacocinética) y efecto versus concentración (farmacodinamia) en modelos FC/FD que describen la relación entre el efecto y el tiempo para cualquier dosis

### 1.3.1. Farmacocinética

La FC describe la relación entre la dosis de fármaco y el perfil de concentración a lo largo del tiempo en el que el fármaco está presente en el organismo. La concentración ( $C$ ) del fármaco es típicamente determinada en el plasma y el cambio a lo largo del tiempo ( $t$ ), puede aproximarse mediante una ecuación exponencial:

$$C = C_0 \cdot e^{-K_e \cdot t}$$

Esta ecuación representa un modelo FC monocompartimental, siendo  $C_0$  la concentración inicial y  $K_e$  la constante de velocidad de eliminación del fármaco. El perfil FC dependerá de la dosis, la administración, la formulación, la frecuencia de la dosis y de la distribución y eliminación del fármaco [94].

Los principales parámetros FC son:

- *Aclaramiento o depuración*

Por aclaramiento (CL) de un fármaco se entiende el volumen de sangre que es limpiado o eliminado de fármaco por unidad de tiempo; como parámetro, aclaramiento es la relación entre la velocidad de eliminación y la concentración del fármaco.

- *Volumen de distribución*

El volumen de distribución ( $V_d$ ) es el volumen teórico en el que se debe distribuir un fármaco para que, con una dosis concreta, se alcance una concentración plasmática determinada. Es un concepto de equilibrio y se calcula como la relación entre la cantidad de fármaco administrado y la concentración plasmática alcanzada.

- *Tiempo de vida media*

El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) se define como el tiempo que tarda la concentración plasmática de fármaco en disminuir a la mitad; es la inversa de la constante de eliminación,  $K_e$ .

$$t_{1/2} = 0,693/K_e$$

Para fármacos con una inmediata distribución y un aclaramiento independiente de la concentración, la  $K_e$  se describe como:

$$K_e = CL/V_d$$

Muchos fármacos se unen a las proteínas en el plasma, principalmente a la albúmina y a  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida. Esta unión tanto en plasma como en los tejidos tendrá consecuencias sobre la distribución y eliminación de fármacos. La fracción libre del fármaco es capaz de distribuirse, eliminarse y interactuar con el receptor y otros lugares efectores.

### 1.3.2. Farmacodinamia

---

La FD describe la relación entre la concentración y los efectos de un fármaco. En el modelado FC/FD se establece un enlace entre la FC y un efecto mediante una función matemática. La variable efecto puede ser una medición tal como los niveles de glucosa, la presión arterial o las UFC/ml. La medida del efecto en cualquier momento dado ( $t$ ) está determinada por una función de su valor sin fármaco ( $E_0$ ) y la concentración de fármaco ( $C$ ). Frecuentemente, la función matemática que describe la relación FC/FD es un modelo  $E_{\max}$  sigmoide:

$$E(t) = E_0 + \frac{E_{\max} \cdot C(t)^h}{EC_{50}^h + C(t)^h}$$

Donde  $E_{\max}$  es el efecto máximo que puede alcanzar un fármaco en un determinado sistema,  $EC_{50}$  es la concentración necesaria para producir el 50% del efecto máximo y  $h$  es el factor de Hill o sigmoicidad que determina la pendiente de la relación entre efecto y concentración [94].

### 1.3.3. Análisis farmacocinético poblacional y modelado farmacocinético/farmacodinámico

---

Los modelos poblacionales son herramientas que permiten, por un lado, describir las observaciones y, por otro, predecir y explicar el comportamiento de los fármacos en una población determinada, para poder, aplicar los resultados obtenidos para la población a un determinado individuo. Los modelos poblacionales FC y FC/FD se desarrollan y aplican para caracterizar las concentraciones y efectos a lo largo del tiempo y para optimizar los regímenes de dosificación [94].

El análisis FC y FC/FD poblacional de un fármaco se realiza mediante el desarrollo de modelos matemáticos. Un modelo de población típicamente incluye (i) un modelo estructural que describe los perfiles de concentración-tiempo y/o los efectos-tiempo en la población objeto del estudio,



(ii) un modelo estadístico que cuantifica y diferencia los tipos de variabilidad (interindividual y residual) y (iii) en ocasiones incluye un modelo de covariables.

Así, estos modelos estiman los valores típicos de los parámetros FC y/o FD del fármaco, junto con su variabilidad interindividual y residual. Además, también permiten estudiar la influencia de diversos factores (covariables) en los parámetros FC y/o FC/FD.

El desarrollo de estos modelos FC y FC/FD requiere de programas basados en la modelización no lineal de efectos mixtos, denominado de esta forma ya que incluye efectos fijos (parámetros estructurales del modelo) y efectos aleatorios (variabilidad interindividual de los parámetros y variabilidad residual). El programa más comúnmente empleado para llevar a cabo la modelización no lineal de efectos mixtos es NONMEM (*Nonlinear Mixed Effect Model*), [95].

#### **1.3.4. Simulaciones**

---

Una vez desarrollado un modelo FC/FD, es posible estudiar el resultado de diferentes escenarios terapéuticos, como puede ser, diversos regímenes de dosificación. Las simulaciones se emplean en diferentes ámbitos de la farmacología, como en el diseño de los ensayos clínicos [96,97]. Sheiner et al. presentaron la aplicación de las simulaciones con el fin de explorar diferentes asunciones o escenarios, como en los estudios de dosis escalonadas [98]. Las simulaciones también se utilizan en la evaluación de modelos, mediante la comparación de datos observados y simulados por el modelo [99]. Dado que la pauta de administración y la vía de administración afectan al perfil de concentración-tiempo, el efecto predicho también será dependiente de la pauta de dosificación.

## 1.4. Estudio de la farmacocinética/farmacodinamia de los fármacos antifúngicos

---

El término FD al tratarse de fármacos antimicrobianos, hace referencia a “cómo el fármaco afecta al microorganismo” [94]. Eagle et al. [100] mostraron la influencia del régimen de dosificación de los antimicrobianos sobre la resolución de la infección y por tanto la importancia de la FC/FD para los antibióticos, al observar que la actividad de la penicilina era dependiente del tiempo y la de la estreptomicina de la concentración. Las relaciones FC/FD se estudian de manera rutinaria para ayudar a establecer guías de regímenes de dosificación [94].

La adecuación de la dosis en los fármacos antifúngicos se ha basado clásicamente en la concentración mínima inhibitoria (CMI) y, en menor medida, en la concentración mínima fungicida (CMF) y hace referencia al resultado neto bien de la inhibición del crecimiento del microorganismo o de su muerte en un periodo de tiempo seleccionado. Sin embargo, no reflejan la realidad in vivo, en la que la concentración del fármaco varía en el tiempo [101,102].

### 1.4.1. Concentración mínima inhibitoria, (CMI)

---

La CMI es la concentración más baja de un compuesto antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. Debido al gran número de factores que pueden influir en la evolución clínica de una infección fúngica, una CMI baja no predice necesariamente el éxito terapéutico, mientras que la resistencia in vitro podría indicar una alta probabilidad de fracaso terapéutico [103].

La CMI de un microorganismo se puede determinar por diferentes métodos, estandarizados (CLSI y EUCAST) o comerciales (*Sensititre YeastOne* y *Etest*).

- *Métodos estandarizados:* CLSI y EUCAST

Un método estandarizado de estudio de la sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos, es el que se describe en los documentos M27-A3 y M27-A3 S4 del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI [104,105]. En estos documentos se incluyen los puntos de corte interpretativos para los azoles, las equinocandinas y la 5-fluorocitosina, permitiendo clasificar a las cepas de *Candida* en sensibles, resistentes o sensibles dependientes de la dosis. El *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST) también ha desarrollado una metodología estandarizada para el estudio de sensibilidad a los fármacos antifúngicos [106].

- *Métodos comerciales:* Sensititre YeastOne y Etest

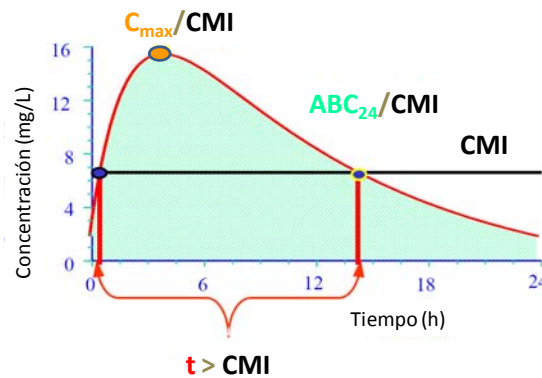
El Sensititre YeastOne es un sistema en placas de microtitulación basado en el método M27-A3, con un indicador colorimétrico de crecimiento (azul de Alamar). El color del pocillo azul indica ausencia de crecimiento y el color rojo o púrpura indica el crecimiento celular. Este método permite una interpretación más objetiva de las CMI. El Etest es un método que emplea tiras de plástico con un gradiente continuo de las concentraciones de un antifúngico, que se depositan sobre placas de agar RPMI 1640 cultivadas con el hongo. En este caso, la CMI se lee como la concentración más baja a la cual el borde elíptico de la zona de inhibición de crecimiento interseca la escala en la tira.

#### **1.4.1.1. Índices farmacocinéticos/farmacodinámicos basados en la CMI**

---

Los índices FC/FD basados en la CMI, dan idea del grado de eficacia que va a tener un antimicrobiano frente a un microorganismo patógeno. Los más utilizados son el tiempo en el que las concentraciones de fármaco permanecen por encima de la CMI ( $t > CMI$ ), el cociente entre la concentración máxima y la CMI ( $C_{max}/CMI$ ) y el cociente entre el área bajo la curva a las 24 h ( $ABC_{24}$ ) y la CMI ( $ABC_{24}/CMI$ ) (Figura 1.14). Existe una incertidumbre importante sobre qué

índice correlaciona mejor con la eficacia de determinados fármacos antifúngicos. Aunque estos índices FC/FD son predictores útiles para valorar la potencia de la interacción fármaco-microorganismo, también presentan desventajas tanto FC como FD [102].



**Figura 1.14:** Índices FC/FD basados en la CMI

Desde el punto de vista de la actividad FD, los antibióticos se clasifican en función del tipo de actividad antimicrobiana que puede ser:

- *Concentración-dependiente*

La eficacia del fármaco se relaciona con su concentración: al aumentar la concentración de antibiótico, se produce mayor eliminación del microorganismo. Para este grupo de antibióticos (aminoglucósidos, fluoroquinolonas, metronidazol o daptomicina) los índices relacionados con la eficacia son  $C_{max}/CMI$  y  $ABC_{24}/CMI$ .

- *Concentración-independiente*

Al aumentar la concentración de antibiótico, la eliminación del microorganismo aumenta solo ligeramente, aunque se consigue una inhibición prolongada del crecimiento. Para este grupo de antibióticos (vancomicina, linezolid, tetraciclinas, clindamicina, azitromicina) los índices relacionados con la eficacia son  $C_{max}/CMI$  y  $ABC_{24}/CMI$ .

- *Tiempo-dependiente*

La eficacia se relaciona con el tiempo. El objetivo de la terapia es conseguir una larga exposición al antibiótico. Para los antibióticos incluidos en este grupo (betalactámicos y macrólidos), el índice relacionado con la erradicación microbiana es  $t > \text{CMI}$  que hace referencia al tiempo durante el cual las concentraciones plasmáticas de fármaco están por encima de la CMI para un microorganismo en particular ( $t > \text{CMI}$ ) [107].

Los índices FC/FD para los fármacos antifúngicos no están tan bien establecidos como para los fármacos antibacterianos; sin embargo, estos índices de eficacia basados en la CMI, se han estudiado en varios trabajos [108-110]. Para fluconazol, ravuconazol, posaconazol y voriconazol se ha visto que el parámetro  $\text{ABC}_{24\text{h}}/\text{CMI}$  se correlaciona con la eficacia [108,111-115]. Este índice también se correlaciona con la eficacia de la caspofungina y la micafungina en un modelo murino de candidiasis sistémica [116,117]; sin embargo, en otros trabajos se ha demostrado que el índice que se correlacionaba mejor con la eficacia de las equinocandinas era  $C_{\text{max}}/\text{CMI}$  [109,118]. Por otra parte, se ha propuesto que los índices que mejor se correlacionan con la eficacia de la anidulafungina son  $\text{ABC}_{24\text{h}}/\text{CMI}$  y  $C_{\text{max}}/\text{CMI}$  [119].

#### **1.4.1.2. Desventajas de la aproximación basada en la CMI**

---

La CMI es un parámetro perfectamente establecido que se determina de forma rutinaria en microbiología. Es el parámetro FD que más se emplea para evaluar la eficacia de los agentes antiinfecciosos. Sin embargo, a pesar de que la CMI predice la potencia de la interacción fármaco-microorganismo, este parámetro presenta muchos inconvenientes, tanto FC como FD [120].

Desde el punto de vista FC/FD, la CMI proporciona información limitada sobre la cinética de acción del fármaco. Así, factores importantes, como la unión a las proteínas y su distribución, tisular son pasados por alto mediante esta aproximación. Después de la absorción, la mayoría de los fármacos se unen a las proteínas plasmáticas. También pueden abandonar el plasma y entrar

en los tejidos. La unión a proteínas es relevante debido a que sólo el medicamento que no está unido a las proteínas del plasma estará disponible para ejercer un efecto farmacológico. La distribución tisular es importante porque las infecciones afectan a los diferentes tejidos. En este sentido, la CMI es un parámetro fijo que aporta información en un único tiempo determinado. La CMI no informa sobre la velocidad de la actividad fungicida ni de si los incrementos de la concentración del fármaco pueden conllevar un aumento de esta velocidad. Debido a que la determinación de la CMI depende del número de microorganismos en un tiempo determinado, diferentes velocidades de crecimiento y muerte del microorganismo pueden tener el mismo valor de CMI. Estas diferencias cinéticas pueden ser de relevancia terapéutica [120]. La CMI tampoco proporciona información de la actividad del fármaco que puede permanecer después de la exposición al mismo [121].

Otro inconveniente adicional muy importante es que las CMI se obtienen con concentraciones constantes de fármaco, representando, por lo tanto, concentraciones umbrales. Esto implica una relación concentración-efecto del tipo “todo o nada”. Todas las concentraciones por debajo de la CMI se tratan por igual, y tampoco para las concentraciones por encima de la CMI se hacen distinciones cuantitativas. Sin embargo, las concentraciones justo por debajo de la CMI pueden mostrar una actividad antiinfecciosa. De la misma manera, las concentraciones por encima de la CMI no tienen por qué mostrar un efecto máximo que solamente se alcanza con las concentraciones más altas.

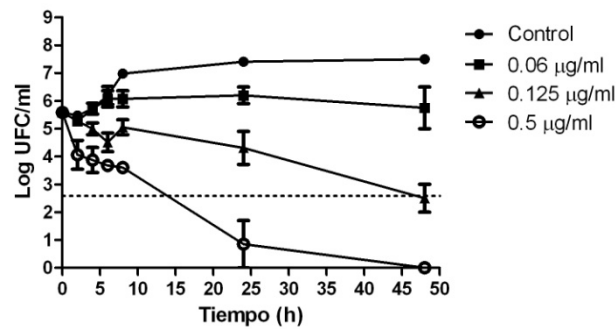
Por lo tanto, las aproximaciones de la CMI no reflejan el escenario in vivo, en el que los microorganismos no se exponen a concentraciones constantes de fármaco, sino a concentraciones cambiantes [120].

### 1.4.2. Curvas de tiempo-letalidad *in vitro* (*time-kill curves*)

---

Otra aproximación para evaluar la actividad antifúngica consiste en emplear curvas de tiempo-letalidad (*time-kill curves*) o curvas de letalidad. Las curvas de letalidad proporcionan una información muy importante sobre la dinámica de la acción de un antimicrobiano y sobre la relación entre la concentración y la actividad de un fármaco, debido a que estas curvas contemplan el crecimiento y muerte del microorganismo en función del tiempo. Las curvas de letalidad se utilizan para estudiar los efectos de los fármacos contra los microorganismos, fundamentalmente en el caso de nuevos antimicrobianos, o para evaluar el sinergismo o antagonismo de la combinación de dos o más sustancias administradas conjuntamente. Tienen la ventaja de proporcionar información sobre la relación temporal del efecto del antimicrobiano contra el microorganismo. También proporcionan información acerca de si un fármaco es dependiente de la concentración, el tiempo o la especie, y podría dar una idea de si la acción del antimicrobiano es fungicida, fungistática o de si el microorganismo es resistente a dicho fármaco [122].

En la gráfica que proporcionan las curvas de letalidad se puede determinar: (i) la actividad fungicida (reducción de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml)  $\geq 3$  log) con respecto al inóculo inicial) o fungistática (reducción de UFC/ml  $< 3$  log con respecto al inóculo inicial) y la relación entre la concentración y la actividad; (ii) el tiempo en el que comienza la actividad fungicida; (iii) la mínima concentración estudiada de antifúngico con acción fungicida; (iv) el número de células viables a los diferentes tiempos de incubación; (v) el incremento máximo de UFC con respecto al número inicial; (vi) recrecimientos del microorganismo a lo largo del tiempo de exposición al fármaco; (vii) efecto paradójico, definido como la habilidad del hongo para crecer a altas concentraciones y no a concentraciones intermedias o bajas. En la Figura 1.15 se muestra un ejemplo con curvas de letalidad



**Figura 1.15:** Ejemplo gráfico de curvas de letalidad para distintas concentraciones de un antifúngico y crecimiento control (sin fármaco), contra *Candida*, Log UFC/ml frente al tiempo (h). La línea punteada indica el límite fungicida

La actividad antibacteriana ha sido ampliamente estudiada mediante curvas de letalidad. Sin embargo, a pesar de su reconocimiento y utilidad, en micología existen pocos trabajos que hayan estudiado la actividad antifúngica sobre hongos con esta metodología [122].

Para la obtención de las curvas de letalidad, la concentración del fármaco puede tratarse como constante o como cambiante, para simular un perfil de concentraciones in vivo. Así, estos experimentos in vitro clásicamente se dividen en dos categorías: curvas de letalidad estáticas y curvas de letalidad dinámicas [123]

#### 1.4.2.1. Curvas de letalidad in vitro estáticas

Estos estudios contemplan una concentración constante del fármaco, es decir, estudian los efectos de una concentración fija de fármaco sobre un microorganismo en función del tiempo. El principal inconveniente de esta aproximación es que no reflejan la situación in vivo en la que las concentraciones de fármaco fluctúan. Por lo tanto, aunque son buenos predictores del comportamiento antimicrobiano, tienen una menor capacidad de predicción y correlación con resultados clínicos que los modelos in vitro dinámicos (Nielsen et al, 2013).

La técnica consiste en inocular las levaduras en una serie de tubos o pocillos con concentraciones conocidas de antifúngico y recoger muestras de estos tubos o pocillos a tiempos determinados.



Las muestras se siembran e incuban y se procede al recuento de UFC. Por último, se representan las UFC/ml cuantificadas en función del tiempo.

El modelo matemático que mejor se ajusta a los datos de tiempo-letalidad, es aquel que sigue una cinética monoexponencial de primer orden, cuya fórmula es:

$$N_t = N_0 \cdot e^{K \cdot t}$$

Es un modelo que explica que la letalidad aumenta exponencialmente con el tiempo de incubación, donde  $N$  es el número de células viables a cada tiempo  $t$ ,  $N_0$  es el inóculo inicial,  $K$  es la constante de velocidad de muerte o de letalidad (valores de  $K$  negativos) o la constante de velocidad de crecimiento (valores de  $K$  positivos) y  $t$  es el tiempo de incubación.

La relación entre la concentración del fármaco antifúngico y la actividad del mismo, se establece, estimando el valor de  $K$ . Esta tasa, dependiente de la curva de letalidad, representa la velocidad de actividad antifúngica y se mide en UFC/tiempo.

#### **1.4.2.2. Curvas de letalidad in vitro dinámicas**

---

En estos experimentos la concentración de fármaco es variable a lo largo del experimento, bien por dilución o por difusión. Estos estudios tratan de simular el perfil concentración-tiempo in vivo y constituyen una metodología más apropiada para comparar diferentes esquemas de dosificación. Otra ventaja del sistema in vitro dinámico es que permite repetir la dosificación a intervalos predeterminados exponiendo a *Candida* a dosis repetidas del fármaco, pudiendo simular de esta forma concentraciones en estado estacionario [94].

Los modelos dinámicos son más complejos que los estáticos y requieren la utilización de bombas peristálticas (sistemas basados en dilución) o dializadores (sistemas basados en difusión), con el fin de diluir el fármaco antifúngico en el sistema, simulando así el aclaramiento del fármaco in

vivo. Se han desarrollado diferentes tipos de modelos dinámicos que permiten simular cinéticas mono o multicompartimentales (Nielsen et al, 2013).

Venisse et al. [120]. desarrollaron un modelo FC/FD basado en curvas de letalidad in vitro dinámicas para estudiar la actividad fungistática y fungicida de fármacos contra *C. albicans* Lignell et al. [124] caracterizaron el efecto de voriconazol frente a *C. albicans* en un modelo in vitro de concentraciones cambiantes en función de las características FC del fármaco Meletiadis et al. [125] desarrollaron un modelo FC/FD basado en curvas de letalidad dinámicas para fármacos antifúngicos contra especies de *Aspergillus* para posteriormente simular los efectos de diferentes dosis estándar. Li et al. [126] aplicaron un modelo FC/FD basado en curvas de letalidad tanto estáticas como dinámicas para describir la actividad de voriconazol frente a *Candida*. El modelo matemático se utilizó para simular efectos con varios regímenes de dosificación, obteniendo resultados acordes a los observados en clínica, por lo que se propuso este modelo como herramienta para predecir el efecto a otros regímenes de dosificación.

### **1.4.2.3. Limitaciones de las curvas de letalidad**

---

Los estudios in vitro estáticos y dinámicos a pesar de sus ventajas potenciales son simplificaciones de los escenarios reales y plantean desventajas que hay que tener en cuenta. La principal limitación es que se trata de una metodología que puede resultar poco práctica. La obtención de un set completo de curvas de letalidad que permita una correcta evaluación de la interacción fármaco-microorganismo es muy laboriosa y lleva mucho tiempo, especialmente con la metodología dinámica. Por otro lado, el posterior modelado matemático puede resultar complejo.

En general, las limitaciones de estos modelos se clasifican en factores dependientes del hospedador o del patógeno y factores FC [127].

- *Factores dependientes del hospedador*

Las condiciones experimentales no reflejan la situación in vivo, donde el sistema inmunológico es muy importante para el control de la infección. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las candidiasis invasivas ocurren en pacientes con el sistema inmunológico deficiente, como los pacientes infectados por el VIH o los que reciben un tratamiento con quimioterapia antineoplásica [128].

- *Factores dependientes del patógeno*

La velocidad de crecimiento del microorganismo puede variar entre un sistema in vitro y la situación in vivo. Esta velocidad va a depender en gran medida del medio en el que se encuentre el microorganismo, de la temperatura o del tamaño del inóculo microbiano. La eficacia antimicrobiana en los modelos in vitro depende en gran medida de la velocidad de crecimiento del agente infeccioso, es una variable muy importante a tener en cuenta [122].

- *Factores farmacocinéticos*

Los modelos in vitro dinámicos permiten obtener una aproximación de la eliminación de fármacos in vivo, pero puede suceder que el modelo no represente fielmente la distribución corporal del fármaco. La fijación a proteínas plasmáticas de los fármacos antimicrobianos pocas veces se contempla en los modelos in vitro. La presencia de suero no solo afecta a las equinocandinas por su unión a las proteínas, también afecta a otros factores como la afinidad del fármaco por la diana, la difusión del antimicrobiano, la velocidad de crecimiento del patógeno o la formación de hifas o micelios [129]. Por otro lado hay que tener en cuenta que la fijación de fármacos a proteínas es un proceso dinámico que puede verse alterado por factores fisiopatológicos o por la presencia de otros fármacos, esto resulta complicado simularlo in vitro.

## 1.5. Modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos basados en curvas de tiempo-letalidad

---

Las curvas de letalidad son una interesante herramienta para estudiar la FD de los fármacos antimicrobianos ya que proporcionan una información detallada sobre la eficacia antimicrobiana en función del tiempo y de la concentración. Aunque se pueden analizar las curvas de letalidad procedentes de estudios *in vivo* con modelos de infección en animales, los modelos *in vitro* proporcionan importantes ventajas tales como tiempo y coste, permitiendo el estudio directo de la interacción fármaco-microorganismo de una forma controlada y reproducible, sin necesidad de la experimentación animal.

Los resultados de los experimentos *time-kill* pueden ser descritos con gran precisión mediante modelos matemáticos FC/FD. Además, se pueden utilizar datos FC procedentes de literatura, pudiendo así, utilizar los modelos matemáticos desarrollados para simular curvas de letalidad para diferentes dosis y regímenes de dosificación de un determinado fármaco antimicrobiano. Por ello, el modelado FC/FD ha sido reconocido como una técnica potencialmente poderosa para definir estrategias óptimas de tratamiento antimicrobiano. Los modelos FC/FD basados en las curvas de letalidad tienen las siguientes utilidades: i) describir los datos existentes; ii) alcanzar una mayor comprensión de la complejidad de la interacción del fármaco y el microorganismo; iii) obtener predicciones de situaciones no ensayadas, por ejemplo, de diferentes dosis; iv) diseñar nuevos estudios. [94].

Los datos de tiempo-letalidad de estudios *in vitro* (estáticos o dinámicos) pueden ser analizados mediante modelos matemáticos de distinta complejidad, aunque comparten los mismos componentes básicos. Todos los modelos matemáticos que ajustan los datos de tiempo-letalidad constan de los siguientes submodelos [94].

- *Modelo del microorganismo*: caracteriza el crecimiento y la muerte natural de los microorganismos frente al tiempo. En este modelo se explican los parámetros referidos a la

levadura:  $K_g$  (constante del crecimiento del hongo en ausencia de fármaco) y  $N_{\max}$  (número máximo de células fúngicas, saturación del crecimiento).

- *Modelo farmacocinético*: caracteriza la concentración de fármaco frente al tiempo. Para un modelo estático, la concentración es constante, mientras que para un modelo dinámico la concentración cambia en el tiempo en función de las características FC del mismo. En los modelos experimentales dinámicos, generalmente se simula un descenso de concentraciones de fármaco gobernado por una velocidad de eliminación de primer orden predefinida. Adicionalmente, se pueden emplear diferentes condiciones experimentales para simular perfiles cinéticos más complejos.

- *Modelo farmacocinético/farmacodinámico*: en este modelo, se integran los dos modelos anteriores para caracterizar el efecto del fármaco sobre el microorganismo. El efecto del antimicrobiano se asume que es dependiente de la concentración de fármaco de forma no lineal y se describe utilizando, normalmente, un modelo  $E_{\max}$  o  $E_{\max}$  sigmoide. De esta forma se determinan los parámetros relacionados con el fármaco, como  $E_{\max}$  (máxima tasa de muerte celular que hace referencia al máximo efecto del fármaco antifúngico, es decir, máxima velocidad de muerte celular alcanzable inducida por el fármaco, en  $h^{-1}$ ) y  $EC_{50}$  (concentración de fármaco que produce el 50% del efecto máximo). Finalmente, es posible simular curvas de letalidad para diferentes dosis y regímenes de dosificación.

## **1.6. Efecto postantifúngico (*postantifungal effect, PAFE*)**

---

El término general efecto postantibiótico (PAE) se refiere al fenómeno de supresión del crecimiento microbiano que persiste tras una exposición limitada a un agente quimioterápico [130]. Esta supresión del crecimiento también se puede producir en hongos; de ahí el término

efecto postantifúngico o *postantifungal effect* (PAFE). El primer trabajo que evaluó el PAFE contra *C. albicans* se llevó a cabo en el año 1991 [131]. El término PAFE se refiere al tiempo que se requiere para que el patógeno recupere el crecimiento normal después de la exposición al agente antimicrobiano [132].

El PAFE es un fenómeno que se ha estudiado poco contra *Candida* in vitro [133-137] y muy poco en modelos animales [119,138].

El mecanismo de acción del PAFE no se conoce, pero se ha sugerido que podrían estar implicados varios factores, como la persistencia del fármaco en el lugar de acción o el tiempo que necesita el microorganismo para recuperar la síntesis de ergosterol en la membrana o la síntesis de  $\beta$ -D-glucano en la pared celular, tras la exposición y retirada del fármaco [139]. Se ha propuesto que la duración del PAFE y las diferencias de este parámetro entre especies dependen de las características de crecimiento de la célula, del tamaño del inóculo, de la afinidad del antifúngico por la diana de acción o la cantidad de glucano de la pared del hongo y de la concentración del antimicrobiano [119].

En este sentido, algunos estudios han determinado que el fluconazol apenas produce PAFE y que tanto la anfotericina B como las equinocandinas originan un PAFE prolongado y dependiente de la concentración contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* [133,139,140]. Esto también se ha podido determinar in vivo, contra *C. albicans*, observándose que la anidulafungina da lugar a altos valores de PAFE, mientras que isavuconazol origina bajos valores de este parámetro [119,138].

El interés de evaluar el PAFE se basa en la importancia clínica de este parámetro en el diseño del régimen de dosificación. Así, los fármacos antifúngicos con PAFE elevados podrían ser administrados con menor frecuencia que los de PAFE cortos, que requerirían administraciones más frecuentes.

# 2

---

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS







Las candidiasis son las micosis invasivas más frecuentes y una importante causa de morbilidad y mortalidad. *C. albicans* es la especie predominante pero el aislamiento cada vez más frecuente de otras especies de este género están modificando el patrón epidemiológico de las candidiasis invasivas. La gravedad de las candidiasis se incrementa con la presencia de resistencias microbiológicas en *C. glabrata*, *C. krusei* o *C. parapsilosis* y con la capacidad de muchas especies de desarrollar biopelículas microbianas en catéteres y prótesis. Por otro lado, el patrón de sensibilidad a los fármacos antifúngicos de las nuevas especies crípticas de los complejos de especies de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* no está bien establecido, haciéndose necesario el estudio del comportamiento de los fármacos contra estas especies.

Debido a la creciente importancia médica de las candidiasis invasivas y ante el grave problema que suponen los fracasos terapéuticos, muchos asociados a las resistencias a los fármacos antifúngicos, resulta imprescindible disponer de métodos de estudio *in vitro* adecuados, como las curvas de letalidad, que permitan evaluar y comparar la eficacia antifúngica de los fármacos. La aproximación basada en datos de tiempo-letalidad aporta información detallada sobre la eficacia antifúngica en función tanto del tiempo como de la concentración de fármaco antifúngico. Como valor añadido, se pueden utilizar los modelos matemáticos FC/FD basados en datos de letalidad, junto con datos FC de humanos, para simular el perfil de letalidad correspondiente a un régimen determinado de dosificación del fármaco. Además el estudio del PAFE, fenómeno dependiente del fármaco, la concentración y la especie, podría ser importante para el diseño de los regímenes de dosificación terapéutica, al permitir espaciar las dosis de los fármacos antifúngicos que han mostrado PAFE prolongado frente a determinadas especies o cepas.

En este trabajo se ha evaluado la eficacia *in vitro* de un grupo reciente de fármacos antifúngicos, las equinocandinas, que incluye a la anidulafungina, la caspofungina y la micafungina, contra las especies crípticas del género *Candida*.

Esta Tesis doctoral tiene tres objetivos principales:

**Objetivo 1.** Evaluar y comparar la actividad antifúngica in vitro de anidulafungina, caspofungina y micafungina contra las especies integradas en los complejos *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* mediante curvas de letalidad, con una metodología estática. Para lograr este objetivo, se han perseguido los siguientes objetivos parciales:

1.1. Obtener las CMI de anidulafungina, caspofungina y micafungina contra las especies crípticas de los complejos-especie *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

1.2. Determinar las tasas de letalidad de cada fármaco antifúngico contra las diferentes especies a determinadas concentraciones.

1.3. Establecer los tiempos medios necesarios para que los fármacos induzcan reducciones en la proporción de células viables del 50, 90, 99% y para alcanzar una actividad fungicida (99,9%).

Para conseguir el objetivo 1, se desarrollaron los siguientes estudios:

- Estudio 1: Comparación de la actividad in vitro de anidulafungina, caspofungina y micafungina contra *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* mediante curvas de letalidad
- Estudio 2: Comparación de la actividad in vitro de anidulafungina, caspofungina y micafungina contra *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* mediante curvas de letalidad
- Estudio 3: Comparación de la actividad in vitro de anidulafungina, caspofungina y micafungina contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* mediante curvas de letalidad

**Objetivo 2.** Estudiar y comparar el PAFE de anidulafungina, caspofungina y micafungina contra las especies crípticas de los complejos-especie *C. albicans* y *C. parapsilosis* mediante curvas de letalidad estática. Para ello, se persiguieron los siguientes objetivos secundarios:

2.1. Determinar los tiempos que requiere cada especie en recuperar el crecimiento normal después de una exposición limitada a las equinocandinas a determinadas concentraciones.

2.2. Analizar si en los experimentos de PAFE se obtiene actividad fungicida frente a las cepas de *Candida* estudiadas.

2.3. Analizar el ratio PAFE/*time-kill*, con el fin de conocer el porcentaje de *kill*ing o muerte celular que es atribuido al PAFE.

Para lograr el objetivo 2, se desarrollaron los siguientes estudios:

- Estudio 4: Evaluación del PAFE de anidulafungina contra los complejos de especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*
- Estudio 5: Evaluación del PAFE de caspofungina contra los complejos de especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*
- Estudio 6: Evaluación del PAFE de micafungina contra los complejos de especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*

**Objetivo 3.** Desarrollar modelos FC/FD basados en datos de tiempo/letalidad para anidulafungina, contra los complejos de especie *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, a partir de experimentos estáticos y dinámicos. Para lograr este objetivo se persiguieron los siguientes objetivos parciales:

3.1. Obtener datos de tiempo-letalidad en un modelo in vitro estático (concentración de anidulafungina constante) y en un modelo in vitro dinámico (concentraciones de anidulafungina cambiantes según su farmacocinética en humanos).

3.2. Ajustar los datos de tiempo-letalidad, obtenidos con los modelos estático y dinámico, mediante un modelo matemático y simular curvas de letalidad para un determinado régimen de dosificación de anidulafungina a partir del modelo in vitro desarrollado y de los datos de farmacocinética en humanos, obtenidos de la literatura.

Para conseguir el objetivo 3, se desarrollaron los siguientes estudios:

- Estudio 7: Modelización FC/FD de anidulafungina contra los complejos de especies *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* a partir de datos de tiempo-letalidad in vitro estáticos
- Estudio 8: Modelización FC/FD de anidulafungina contra los complejos de especies *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* a partir de datos de tiempo-letalidad in vitro dinámicos

# 3

---

## MATERIALES Y MÉTODOS





## 3.1. Materiales

---

### 3.1.1. Material de laboratorio

---

- Placas petri (Thermo Scientific, EEUU)
- Placas de microtitulación de 100 pocillos (Labsystem, Finlandia)
- Placas de microdilución de 96 pocillos (Sarstedt, Alemania)
- Microtubos 1,5 ml (Daslab, España)
- Tubos de 3 y 10 ml (Deltalab, España)
- Matraces de 1000 ml (Scharlab, España)
- Frascos translúcidos de 50, 100, 500 y 1000 ml Ilmabor (Scharlab)
- Frascos de topacio de 500 ml Ilmabor (Scharlab)
- Tapones de dos o tres entradas GL 45 Schott (Scharlab)
- Membranas de silicona (Fisher Scientific, España)
- Tubería de silicona Masterflex Plat de 0,89 mm de diámetro (Cole-Parmer, EEUU)
- Pipetas (Thermo Scientific)
- Puntas de pipetas (Sarstedt)
- Pipetas Pasteur (Thermo Scientific)
- Asas de extensión (Sarstedt)
- Asa de siembra (Thermo Scientific)
- Asas calibradas (Sarstedt)
- Jeringuillas de 1ml y 2 ml (Terumo, España)
- Tubos estériles cloruro sódico (Biomérieux, España)
- Filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Pall, EEUU)
- Filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sarstedt)

- Guantes de látex Naturflex (Scharlab)

### 3.1.2. Medios de cultivo y reactivos

---

- RPMI 1640 con L-glutamina y sin  $\text{NaHCO}_2$  (Sigma, España)
- Agar glucosado de Sabouraud (BD-Difco, EEUU)
- Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico (Sigma)
- Agua destilada
- Dimetilsulfóxido (Sigma)
- Solución salina tamponada (Sigma)
- Hidróxido sódico 5M (Panreac, España)

### 3.1.3. Equipos y aparatos de laboratorio

---

- Campana flujo laminar (Faster Two 30, Italia)
- Incubadora biológica (Mettler, España)
- Mechero Bunsen (Scharlab, España)
- Baño termostático Precistern (P Selecta, España)
- Microscopio CH-2 (Olympus, EEUU)
- Bomba peristáltica Masterflex L/S (Cole-Parmer)
- Agitador sumergible multipuestos Variomag Telesystem (Thermo Scientific)
- Autoclave (Sulzer, España)
- Balanza Mettler Toledo (Sul, España)
- Cámara de recuento (hemocitómetro Neubauer) (Brand, Alemania)
- Incubadora microbiológica Bioscreen C (Labsystems)
- Densitómetro Densimat (Biomérieux)



- Centrífuga Biofuge pico (Heraeus, España)
- pH-metro Basic 20 (Crison, España)
- Agitador Reax top (Heidolph, EEUU)
- Agitador magnético Agimatic-N (P Selecta)
- Analizador de imágenes ChemiDoc Imaging system (Bio-Rad, EEUU)
- Frigorífico Liebherr, Profi Line
- Congelador Liebherr, Comfort

### 3.1.4. Programas informáticos

---

- GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software, EEUU)
- Microsoft Office Excel versión 2007 (Microsoft, EEUU)
- Quantity one (Bio-Rad)
- Phoenix WinNonLin versión 6.1 (Certara, EEUU)
- NONMEM versión 7 (ICON Development solutions, EEUU)

## 3.2. Microorganismos

---

Se evaluó la sensibilidad in vitro a las equinocandinas de un total de 31 cepas pertenecientes a nueve especies diferentes del género *Candida*. En la Tabla 3.1 se muestra la procedencia y el origen anatómico de las mismas.

**Tabla 3.1:** Listado de cepas de *Candida* evaluadas en los diferentes estudios de sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos

Especie	Procedencia	Origen anatómico
<i>C. albicans</i>	NCPF 3153	Desconocido
<i>C. albicans</i>	NCPF 3156	Desconocido
<i>C. albicans</i>	UPV/EHU 99-101	Sangre
<i>C. albicans</i>	UPV/EHU 99-102	Sangre
<i>C. albicans</i>	UPV/EHU 99-103	Sangre
<i>C. albicans</i>	UPV/EHU 99-104	Sangre
<i>C. albicans</i>	UPV/EHU 99-105	Sangre
<i>C. dubliniensis</i>	NCPF 3949	Boca
<i>C. dubliniensis</i>	UPV/EHU 00-131	Sangre
<i>C. dubliniensis</i>	UPV/EHU 00-132	Sangre
<i>C. dubliniensis</i>	UPV/EHU 00-133	Sangre
<i>C. dubliniensis</i>	UPV/EHU 00-135	Sangre
<i>C. africana</i>	ATCC 2669	Pene
<i>C. africana</i>	UPV/EHU 97-135	Vagina
<i>C. glabrata</i>	NCPF 3203	Desconocido
<i>C. glabrata</i>	ATCC 90030	Sangre
<i>C. glabrata</i>	UPV/EHU 03-282	Sangre
<i>C. glabrata</i>	UPV/EHU 03-285	Sangre
<i>C. glabrata</i>	UPV/EHU 03-287	Sangre
<i>C. nivariensis</i>	CECT 11998	Sangre
<i>C. nivariensis</i>	CBS 9984	Lavado broncoalveolar
<i>C. nivariensis</i>	UPV/EHU 11-284	Sangre
<i>C. bracarensis</i>	NCYC 3133	Catéter
<i>C. bracarensis</i>	NCYC 3397	Sangre
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	Biberón
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 90018	Sangre
<i>C. parapsilosis</i>	UPV/EHU 09-378	Sangre
<i>C. metapsilosis</i>	ATCC 96143	Desconocido
<i>C. metapsilosis</i>	UPV/EHU 07-045	Sangre
<i>C. orthopsilosis</i>	ATCC 96139	Catéter
<i>C. orthopsilosis</i>	UPV/EHU 07-035	Sangre

NCPF: *National Collection of Pathogenic Fungi*; ATCC: *American Type Culture Collection*; CECT: *Colección Española de Cultivos Tipo*; CBS: *Centraal Bureau voor Schimmelcultures*; NCYC: *National Collection of Yeast Cultures*; UPV/EHU: *Colección de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea*

### 3.3. Fármacos antifúngicos

Los fármacos antifúngicos estudiados fueron anidulafungina, caspofungina y micafungina (Tabla 3.2). Estos productos se obtuvieron en forma de polvo valorado, con una pureza > 80%.

**Tabla 3.2:** Fármacos antifúngicos evaluados

Antifúngico	Laboratorio farmacéutico	Pureza	Solvente
Anidulafungina	Pfizer SLU, España	82,4%	DMSO
Caspofungina	Merck Sharp & Dohme, España	91,2%	Agua/DMSO
Micafungina	Astellas Pharma, España	93,7%	Agua/DMSO

DMSO: Dimetilsulfóxido

### 3.4. Determinación de la sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos

En la Tabla 3.3 se muestran las cepas que se han ensayado en esta Tesis doctoral y los métodos empleados. Las curvas de letalidad obtenidas en los experimentos estáticos se han empleado para la evaluación de todas las cepas, al igual que el estudio de la CMI. El estudio del PAFE se ha realizado con las cepas de los complejos de especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*. También se obtuvieron los datos de letalidad de nueve cepas de referencia de nueve especies diferentes con experimentación dinámica. Por último se llevó a cabo la modelización FC/FD de nueve cepas de referencia pertenecientes a diferentes especies de *Candida*.

**Tabla 3.3:** Relación de cepas estudiadas y los métodos empleados

Cepa	CMI	Curvas de letalidad			Modelización FC/FD	
		Estático	Dinámico	PAFE	Estático	Dinámico
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	•	•	•	•	•	•
<i>C. albicans</i> NCPF 3156	•	•		•		
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-101	•	•		•		
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-102	•	•		•		
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-103	•	•		•		
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-104	•	•		•		
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-105	•	•		•		
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	•	•	•	•	•	•
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-131	•	•		•		
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-132	•	•		•		
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-133	•	•		•		
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-135	•	•		•		
<i>C. africana</i> ATCC 2669	•	•	•	•	•	•
<i>C. africana</i> UPV/EHU 97-135	•	•		•		
<i>C. glabrata</i> NCPF 3203	•	•				
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	•	•	•		•	•
<i>C. glabrata</i> UPV/EHU 03-282	•	•				
<i>C. glabrata</i> UPV/EHU 03-285	•	•				
<i>C. glabrata</i> UPV/EHU 03-287	•	•				
<i>C. nivariensis</i> CECT 11998	•	•	•		•	•
<i>C. nivariensis</i> CBS 9984	•	•				
<i>C. nivariensis</i> UPV/EHU 11-284	•	•				
<i>C. bracarensis</i> NCYC 3133	•	•			•	
<i>C. bracarensis</i> NCYC 3397	•	•	•			•
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	•	•	•	•	•	•
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	•	•		•		
<i>C. parapsilosis</i> UPV/EHU 09-378	•	•		•		
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	•	•	•	•	•	•
<i>C. metapsilosis</i> UPV/EHU 07-045	•	•		•		
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	•	•	•	•	•	•
<i>C. orthopsilosis</i> UPV/EHU 07-035	•	•		•		

### 3.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

---

Las CMI de anidulafungina, caspofungina y micafungina se obtuvieron para todas las cepas por el método estandarizado de microdilución en caldo RPMI propuesto por el CLSI en los documentos M27-A3 y M27-A3 S4 [104,105]. Para las cepas del complejo especie *C. albicans*, los valores de CMI se obtuvieron también con el método de microdilución *Sensititre YeastOne*.

### 3.4.2. Efecto de arrastre (*carryover*)

---

Es importante determinar el efecto de arrastre o *carryover* antes de realizar las curvas de letalidad. De no determinarse, puede considerarse como fungicida a una concentración de antifúngico que es arrastrado con la muestra, si es suficiente para inhibir el crecimiento de la levadura. El *carryover* se determinó extendiendo en placas de agar glucosado de Sabouraud (SDA) un volumen de 100  $\mu$ l de fármaco antifúngico que se dejó secar durante 30 minutos. Posteriormente se sembraron  $1 - 5 \times 10^5$  UFC/ml. Las placas se incubaron durante 24 h a  $36 \pm 1$  °C y se comparó el número de UFC de las placas con fármaco antifúngico con las placas control (en lugar de antifúngico se extendió agua destilada). Se consideró que no había *carryover* si la diferencia de UFC entre la placa control y la que contenía el fármaco antifúngico era  $< 25\%$  [122].

### 3.4.3. Curvas de letalidad mediante el sistema estático

---

Estos estudios se llevaron a cabo en una incubadora microbiológica controlada por ordenador en microplacas de 100 pocillos de fondo plano (BioScreen C MBR). El medio de cultivo que se empleó fue RPMI, con un volumen final de 200  $\mu$ l por pocillo, a una temperatura de  $36 \pm 1$  °C sin agitación durante 48 h ( $30 \pm 1$  °C en el caso de *C. africana*) (Figura 3.1). El tamaño del inóculo final fue de  $1 - 5 \times 10^5$  UFC/ml. Las cepas de *Candida* fueron expuestas a concentraciones constantes de fármaco. Las concentraciones de fármaco empleadas para cada especie se detallan

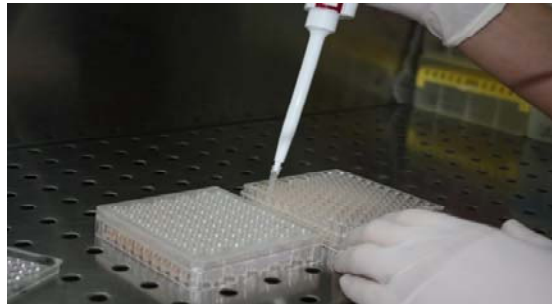
en la Tabla 3.4. Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta el rango de las CMI para cada complejo de especies. A las 0, 2, 4, 6, 24 y 48 h (para el complejo de especies *C. glabrata* también a las 8 h) se recogió una muestra de 6 o 10  $\mu$ l, dependiendo de la dilución, de los pocillos de control y de los que contenían fármaco (Figura 3.2) y se realizaron las pertinentes diluciones en tampón fosfato salino (PBS). De estas diluciones se recogieron 5, 10, 50 o 100  $\mu$ l, dependiendo de la dilución, y se sembraron en placas de SDA por triplicado (Figura 3.3). Cuando se estimaba que el número de UFC/ml fuese menor de 200, se recogían y sembraban 5  $\mu$ l directamente del pocillo. Las placas se incubaron a  $36 \pm 1$  °C durante 24 - 48 h, en el caso de *C. africana*,  $30 \pm 1$  °C, y se contó el número de UFC. El límite de detección fue de 200 UFC/ml. Las curvas de letalidad se obtuvieron por duplicado en diferentes días.

**Tabla 3.4:** Concentraciones de los fármacos antifúngicos ensayadas para cada complejo de especies

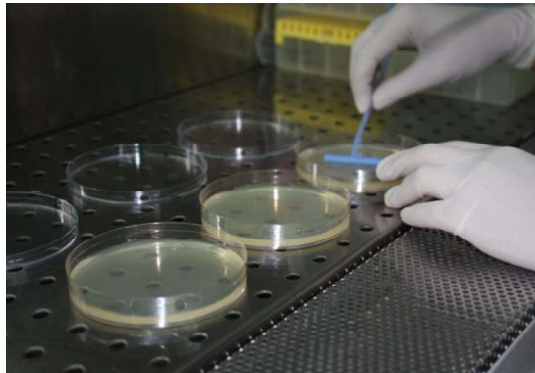
Antifúngico	Especie		
	<i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i> / <i>C. africana</i>	<i>C. glabrata</i> / <i>C. nivariensis</i> / <i>C. bracarensis</i>	<i>C. parapsilosis</i> / <i>C. metapsilosis</i> / <i>C. orthopsilosis</i>
Anidulafungina	0,125 / 0,5 / 2 $\mu$ g/ml	0,06 / 0,125 / 0,5 $\mu$ g/ml	0,25 / 2 / 8 $\mu$ g/ml
Casposfungina	0,125 / 0,5 / 2 $\mu$ g/ml	0,06 / 0,125 / 0,5 $\mu$ g/ml	0,25 / 2 / 8 $\mu$ g/ml
Micafungina	0,125 / 0,5 / 2 $\mu$ g/ml	0,06 / 0,125 / 0,5 $\mu$ g/ml	0,25 / 2 / 8 $\mu$ g/ml



**Figura 3.1:** Incubadora microbiológica BioScreen C MBR y microplacas



**Figura 3.2:** Recogida de las muestras a los diferentes tiempos programados



**Figura 3.3:** Siembra de las muestras por triplicado en agar glucosado de Sabouraud

A partir de los datos del número de UFC/ml para cada tiempo y concentración de fármaco, se obtuvieron las representaciones de las UFC/ml en función del tiempo para cada cepa.

○ *Análisis de datos*

La actividad fungistática o fungicida se analizó ajustando la siguiente ecuación exponencial a los datos medios del número de UFC/ml de cada tiempo y calculando las constantes de letalidad (*killing rates*) o crecimiento:

$$N_t = N_0 \cdot e^{K \cdot t}$$

Donde  $N_t$  es el número de células viables a cada tiempo  $t$ ;  $N_0$  es el inóculo inicial de células,  $K$  es la constante de velocidad de muerte o de crecimiento celular y  $t$  es el tiempo de incubación.

A continuación, se llevó a cabo una transformación logarítmica de los datos:

$$\log N_t = \log N_0 + K \cdot t$$

La relación entre la concentración y la actividad antifúngica se estableció calculando la  $K$  o constante de velocidad de actividad antifúngica para cada concentración. Esta tasa representa la pendiente de la recta obtenida tras relacionar las UFC/ml frente al tiempo y se mide en UFC/ml/h. La actividad fungicida o fungistática de los diferentes fármacos se comparó mediante el valor de la  $K$ , cuyo valor positivo indica crecimiento, mientras que los valores negativos de este parámetro son indicativos de muerte celular. La bondad de ajuste para cada aislamiento y fármaco se determinó por el valor del coeficiente de correlación  $R^2 > 0,8$ .

A partir del valor  $K$ , se calcularon y compararon los tiempos medios para alcanzar reducciones (del 50%, 90%, 99% y actividad fungicida) en la proporción de células viables, para los diferentes fármacos, concentraciones y cepas:

$$50\%: t_{50} = 0,030103/K$$

$$90\%: t_{90} = 1/K$$

$$99\%: t_{99} = 2/K$$

$$\text{Tiempo para alcanzar actividad fungicida: } t_{99,9} = 3/K$$

La actividad fungicida de un fármaco se define como una reducción en el número de las UFC/ml  $\geq 3 \log (99,9\%)$  con respecto del inóculo inicial, mientras que la actividad se considera fungistática cuando la reducción es  $< 3 \log (< 99,9\%)$ .

Se realizó un análisis de varianza para analizar diferencias significativas entre los valores de  $K$ , entre los fármacos, las diferentes concentraciones ensayadas y las cepas. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$  (GraphPad Prism 5.01).



### 3.4.4. Determinación del efecto postantifúngico (PAFE)

---

Este estudio, de forma similar a lo explicado en el apartado 3.4.3, se llevó a cabo en una incubadora microbiológica controlada por ordenador en microplacas de 100 pocillos de fondo plano (BioScreen C MBR). El medio del cultivo que se empleó fue RPMI, con un volumen final de 200 µl por pocillo, a una temperatura de  $36 \pm 1$  °C sin agitación durante 48 h ( $30 \pm 1$  °C, en el caso de *C. africana*) (Figura 3.1). El tamaño del inóculo final fue de  $1 - 5 \times 10^5$  UFC/ml. Las cepas de *Candida* fueron expuestas a concentraciones constantes de fármaco. Las concentraciones de fármaco empleadas para cada especie se detallan en la Tabla 3.4. Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta el rango de las CMI para cada complejo de especies. Sin embargo, tras una exposición de la levadura al fármaco antifúngico durante 1 h, a una temperatura de  $36 \pm 1$  °C, ( $30 \pm 1$  °C, en el caso de *C. africana*), el fármaco se retiró del cultivo mediante tres ciclos de centrifugación a 2.000 revoluciones por minuto, durante 10 minutos y lavados con PBS. Tras el último ciclo de centrifugación, las levaduras, sin fármaco, fueron resuspendidas con 600 µl de RPMI y los pocillos de la microplaca inoculados con dicha suspensión. Esto también se hizo para el control, donde las levaduras nunca habían sido expuestas a fármaco. A las 0, 2, 4, 6, 24 y 48 h se recogió una muestra de 6 o 10 µl, dependiendo de la dilución, de los pocillos de control y de los que habían contenido el fármaco antifúngico (Figura 3.2) y se realizaron las diluciones en PBS. De estas diluciones se recogieron 5, 10, 50 o 100 µl, dependiendo de la dilución, y se sembraron en placas de SDA por triplicado (Figura 3.3). Cuando se estimaba que el número de UFC/ml iba a ser menor de 200, se recogían y sembraban 5 µl directamente del pocillo. Las placas de agar se incubaron a  $36 \pm 1$  °C durante 24 - 48 h, en el caso de *C. africana*,  $30 \pm 1$  °C, y se contó el número de UFC. El límite de detección fue de 200 UFC/ml. Las curvas de letalidad se obtuvieron por duplicado en diferentes días.

La obtención de las curvas de letalidad del experimento estático y del PAFE se llevaron a cabo simultáneamente. Se representaron gráficamente los valores medios de las colonias en función del tiempo y se compararon con los crecimientos de control (sin fármaco).

○ *Análisis de datos*

El PAFE se calculó a partir de la siguiente relación:

$$\text{PAFE} = T - C$$

Donde  $T$  es el tiempo, medido en horas, necesario para que aumente 1 log el número de UFC/ml en los cultivos que habían sido expuestos al fármaco antifúngico, con respecto al inóculo inicial y  $C$  es el tiempo necesario para que aumente 1 log el número de UFC/ml en los cultivos de control (sin fármaco) respecto al inóculo inicial. De esta forma se obtuvo el dato de PAFE en horas.

En los cálculos del PAFE en horas, debido a que en algunos casos el incremento de 1 log en las UFC/ml con respecto al inóculo inicial ocurrió entre las 6 y las 24 h, intervalo en el que no se disponía de muestra (los tiempos de toma de muestra fueron 0, 2, 4, 6, 24 y 48 h), se llevó a cabo una regresión no lineal del número de UFC/ml frente al tiempo para posteriormente obtener por interpolación el dato de tiempo correspondiente al incremento de 1 log en las UFC/ml.

Después de tabular los datos de muerte *time-kill* y muerte PAFE, se calcularon las máximas reducciones logarítmicas respecto al inóculo inicial, para cada fármaco, concentración y cepa a lo largo de las 48 h del experimento. Finalmente se calculó el cociente  $\text{PAFE}/\text{time-kill}$  a partir de las máximas reducciones logarítmicas de los experimentos, con el fin de conocer el porcentaje de *killing* que es atribuido al PAFE.

La comparación de los PAFE de las tres equinocandinas contra las diferentes especies de *Candida* se llevó a cabo con un análisis de varianza. La existencia de significancia estadística se consideró cuando  $p < 0,05$  (GraphPad Prism 5.01).

### 3.4.5. Curvas de letalidad mediante el sistema dinámico

---

En el sistema dinámico, a diferencia del estático, la levadura se expuso a concentraciones cambiantes de fármaco, de acuerdo a las características FC del mismo. Para ello, se puso a punto un modelo in vitro de un compartimento para simular los cambios exponenciales de las concentraciones de anidulafungina, caspofungina y micafungina, en presencia de diferentes especies de *Candida*. Aunque la metodología in vitro dinámica haya sido desarrollada y llevada a cabo con las tres equinocandinas, en esta Tesis doctoral se va a mostrar la metodología y los resultados obtenidos con anidulafungina.

El experimento se llevó a cabo en un baño termostático, a una temperatura de  $36 \pm 1$  °C ( $30 \pm 1$  °C, en el caso de *C. africana*). El sistema in vitro dinámico consistió en un compartimento central (frasco de vidrio de topacio de 500 ml) que se llenó con 400 ml de medio RPMI. Este compartimento contuvo únicamente *Candida* y medio RPMI (caso control, sin fármaco) o *Candida*, medio RPMI y fármaco. El tamaño del inóculo inicial en todos los experimentos fue de  $1 - 5 \times 10^5$  UFC/ml y la concentración inicial de anidulafungina que se introdujo en el compartimento central, fue la  $C_{\max}$  alcanzada en clínica tras con una dosis de carga de 200 mg en infusión de tres horas, seguida de dosis diarias de 100 mg ( $C_{\max} = 5,47$  µg/ml) [88].

El compartimento central se mantuvo en continua agitación mediante un agitador magnético sumergible para múltiples puestos, con el fin de que la mezcla fuera homogénea. Una bomba peristáltica, suministró de forma continua caldo de cultivo (RPMI) al compartimento central desde un frasco con medio RPMI y, de forma simultánea, lo extrajo desde el frasco del compartimento central a otro frasco de desecho a una velocidad de flujo ajustada en función de la semivida de eliminación de anidulafungina (25,6 h) y del volumen del compartimento central (400 ml).

En la Figura 3.4 se muestran los componentes de este sistema. En este experimento, la concentración de fármaco antifúngico se diluyó continuamente, de acuerdo a la ecuación cinética

de primer orden:  $C = C_0 \cdot e^{-K_e \cdot t}$ , donde  $C_0$  es la concentración inicial de fármaco en el frasco,  $t$  es el tiempo al que se toma la muestra,  $C$  es la concentración de fármaco a  $t$  y  $K_e$  es la constante de eliminación (de dilución). Tras la introducción del fármaco antifúngico, a determinados tiempos, 0, 2, 4, 6, 24 y 48 h, se recogieron muestras del medio del compartimento central, tanto en los experimentos de control como en los experimentos con fármaco. La toma de las muestras se llevó a cabo con una jeringuilla de 1 ml a través de una membrana de silicona extremando las precauciones para evitar la contaminación (Figura 3.5). Posteriormente se realizaron las pertinentes diluciones en PBS. Se sembraron 100  $\mu$ l de cada una de estas diluciones por extensión, en tres placas de SDA (Figura 3.6). Cuando se esperaba que el número de UFC/ml iba a ser menor de 200, se sembraban 5  $\mu$ l directamente tomados del frasco central, sin diluir. Las placas de agar se incubaron a  $36 \pm 1$  °C ( $30 \pm 1$  °C, en el caso de *C. africana*) durante 24 - 48 h y se contó el número de UFC. El límite de detección fue de 200 UFC/ml. Las curvas de letalidad se obtuvieron por duplicado en diferentes días para cada cepa y concentración de anidulafungina estudiada.

Se ajustó un modelo FC/FD a los datos de efecto (recuento de UFC/ml en el tiempo) y concentración de fármaco a dichos tiempos. Dichas concentraciones de fármaco fueron simuladas para cada tiempo de muestreo a partir de la relación  $C = C_0 \cdot e^{-K_e \cdot t}$ , conociendo la concentración inicial de fármaco antifúngico y la constante de velocidad de eliminación ( $K$ ) del sistema. Dichas concentraciones simuladas fueron validadas por HPLC.

- *Cuantificación de las concentraciones de anidulafungina del sistema in vitro dinámico por HPLC-MS/MS*

Se guardaron a -80 °C alícuotas de todas las muestras que contenían fármaco, recogidas en cada una de las horas de muestreo para la determinación del número de UFC, con el fin de cuantificar mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la concentración de estas muestras. La cuantificación de las concentraciones de anidulafungina en las muestras de los experimentos

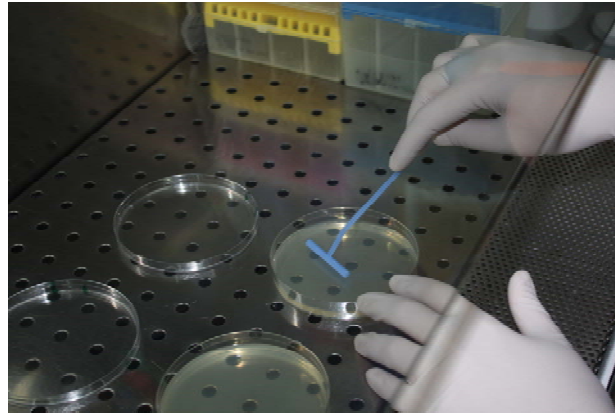
dinámicos se realizó en los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU. Tras la puesta a punto y validación de la técnica analítica para la cuantificación de las equinocandinas en las muestras de medio de cultivo, se llevó a cabo la cuantificación de fármaco en las muestras de RPMI mediante HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de tipo triple cuádruplo (HPLC-MS/MS) (modelo Quattro Micro, Micromass, Waters, España).



**Figura 3.4:** Modelo in vitro dinámico de *Candida*. A: Compartimento de desecho; B: Bomba peristáltica de múltiples canales; C: Compartimento central control; D: Compartimento central con fármaco; E: Recipiente que contiene el medio de cultivo para el suministro; F: Membrana de silicona a través del cual se introduce la levadura y/o el fármaco y desde donde se extrae la muestra; G: Baño termostático



**Figura 3.5:** Recogida de muestras del compartimento central, con la jeringuilla, a través de la membrana de silicona



**Figura 3.6:** Siembra de las muestras por triplicado en placas de agar glucosado de Sabouraud

### 3.5. Modelización y simulaciones FC/FD a partir de las curvas de letalidad del sistema in vitro estático

Se utilizó un modelo  $E_{\max}$  sigmoide adaptado [141] para ajustar los datos de UFC log transformados de los experimentos de tiempo-letalidad estáticos para la anidulafungina:

$$\frac{dN}{dt} = \left[ K_g \left( 1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) \cdot (1 - e^{-\alpha t}) - \left( \frac{E_{\max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \cdot (1 - e^{-\beta t}) \right] \cdot N$$

Donde,  $dN/dt$  es el cambio en el número de células de *Candida* en función del tiempo,  $K_g$  ( $h^{-1}$ ) es la constante de velocidad de crecimiento de *Candida* en ausencia de fármaco,  $E_{\max}$  es la máxima constante de velocidad de muerte (efecto máximo),  $EC_{50}$  ( $\mu g/ml$ ) es la concentración de fármaco necesaria para producir un 50% del efecto máximo,  $C$  ( $\mu g/ml$ ) es la concentración de fármaco a cualquier tiempo ( $t$ ) y  $N$  (UFC/ml) es el número de células viables de *Candida*. Debido a que la concentración de anidulafungina no cambió en todo el intervalo de tiempos estudiado en el experimento,  $C$  fue constante para todo el periodo de tiempos del ajuste.

Además contempló: i) El máximo número de células de *Candida* ( $N_{\max}$ ), corrigiendo una de las limitaciones del sistema in vitro estático; ii) Las células que no han alcanzado aun la fase de

crecimiento logarítmico a tiempo cero, es decir, un retraso en el crecimiento:  $(1 - e^{-\alpha t})$ ; iii) Retraso en el comienzo de la muerte celular causada por el fármaco  $(1 - e^{-\beta t})$ ; iv) Un factor Hill ( $b$ ) que modifica la pendiente de la curva.

El ajuste del modelo se llevó a cabo con el programa NONMEM 7, mediante un algoritmo de estimación condicional de primer orden (FOCE). Se ajustaron simultáneamente todos los datos de UFC/ml de las diferentes cepas de *Candida* expuestas a las diferentes concentraciones iniciales de anidulafungina (Tabla 3.5) En el modelo final no se incluyó la variabilidad interindividual de los parámetros del modelo porque los inóculos fúngicos se prepararon a partir de varias colonias de cada cultivo, asumiendo que todas las colonias eran genéticamente idénticas ya que pertenecían a la misma cepa de *Candida* (cultivo puro). La variabilidad residual se estimó mediante un modelo de error aditivo. La evaluación de la adecuación del modelo incluyó el análisis de gráficas de diagnóstico estándar (UFC observadas frente a UFC predichas por el modelo, gráficas de residuales, etc.), valor de la función objetiva y la precisión de estimación de los parámetros del modelo.

Por último se llevaron a cabo simulaciones de las curvas de letalidad a partir de datos FC de humanos. Para ello, se recogieron de la literatura parámetros FC de anidulafungina en estado estacionario (Tabla 3.6). A partir de éstos, se simularon las concentraciones para una pauta posológica estándar de anidulafungina, dosis de carga de 200 mg en infusión intravenosa durante tres horas y dosis de mantenimiento de 100 mg/día durante 6 días, con un intervalo de dosificación ( $\tau$ ) de 24 h, [88] con el programa Phoenix WinNonLin version 6.1. Finalmente, se obtuvieron los datos de tiempo-letalidad simulados para cada cepa, sustituyendo en la ecuación anteriormente descrita, en este apartado, el término de concentración. De esta forma, se obtuvieron los datos de efecto (UFC/ml) en el tiempo esperados para dicho régimen de dosificación.

Finalmente, se representaron en una misma gráfica las simulaciones de los perfiles de concentraciones plasmáticas de anidulafungina y las curvas de letalidad para la dosis y régimen posológico mencionados.

**Tabla 3.5** Concentraciones de anidulafungina ensayadas para cada cepa de referencia

Especie	Concentración de anidulafungina ( $\mu\text{g/ml}$ )								
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	0,015	0,03		0,125	0,5	2			
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949				0,125	0,5	2	8	32	
<i>C. africana</i> ATCC 2669	0,015	0,03		0,125	0,5	2			
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030			0,06	0,125	0,5	2			
<i>C. nivariensis</i> CECT 11998			0,06	0,125	0,5	2	8		
<i>C. braccarensis</i> NCYC 3133		0,03	0,06	0,125	0,5	2			
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019				0,25		2	4	8	
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143				0,25		2	4	8	16
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC96139				0,25		1	2	8	

**Tabla 3.6** Parámetros farmacocinéticos en humanos de anidulafungina [88]

Anidulafungina	Parámetros farmacocinéticos		
	$t_{1/2}$ (h)	$K_e$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$V_d$ (L)
	25,6	0,027	33,4



### 3.6. Modelización y simulaciones FC/FD a partir de las curvas de letalidad del sistema in vitro dinámico

Se utilizó un modelo  $E_{\max}$  sigmoide adaptado y modificado con respecto al de Li et al. [141] para ajustar los datos log transformados de los experimentos de tiempo-letalidad dinámicos para la anidulafungina:

$$\frac{dN}{dt} = \left[ K_g \left( 1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) \cdot (1 - e^{-\alpha t}) - \left( \frac{E_{\max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \cdot (1 - e^{-\beta t}) - K_e \right] \cdot N$$

Donde,  $dN/dt$  es el cambio en el número de células de *Candida* en función del tiempo,  $K_g$  ( $h^{-1}$ ) es la constante de velocidad de crecimiento de *Candida* en ausencia de fármaco,  $E_{\max}$  es la máxima constante de velocidad de muerte (efecto máximo),  $EC_{50}$  ( $\mu g/ml$ ) es la concentración de fármaco necesaria para producir un 50% del efecto máximo,  $C$  ( $\mu g/ml$ ) es la concentración de fármaco a cualquier tiempo ( $t$ ) y  $N$  (UFC/ml) es el número de células viables de *Candida*. Debido a que la concentración de anidulafungina cambió a lo largo del experimento dinámico,  $C$  fue sustituido por el correspondiente dato de concentración de anidulafungina cuantificado o predicho.

Además, este modelo contempló: i) El máximo número de células de *Candida* ( $N_{\max}$ ), corrigiendo una de las limitaciones del sistema in vitro estático; ii) Las células que no han alcanzado aun la fase de crecimiento logarítmico a tiempo cero es decir, un retraso en el crecimiento:  $(1 - e^{-\alpha t})$ ; iii) Retraso en el comienzo de la muerte celular causada por el fármaco  $(1 - e^{-\beta t})$ ; iv) Un factor Hill ( $h$ ) que modifica la pendiente de la curva; v) La pérdida de células en el compartimento central debido a la renovación del caldo de cultivo, incorporando la constante de velocidad de eliminación ( $K_e$ ) asociada a la dilución del caldo [142]. Esta  $K_e$  se fijó al valor de  $0,027 h^{-1}$ , que corresponde a 25,6 h de la semivida de eliminación de anidulafungina.

El ajuste del modelo se llevó a cabo con el programa NONMEM 7 mediante un algoritmo FOCE. Se ajustaron simultáneamente todos los datos de efecto (UFC/ml) de las diferentes cepas

de *Candida* y las concentraciones correspondientes de anidulafungina. En el modelo final no se incluyó la variabilidad interindividual de los parámetros del modelo porque los inóculos fúngicos se prepararon a partir de varias colonias de cada cultivo, asumiendo que todas las colonias eran genéticamente idénticas porque pertenecían a la misma cepa de *Candida* (cultivo puro). La evaluación de la adecuación del modelo incluyó el análisis de gráficas de diagnóstico estándar (número de UFC observado frente al número predicho por el modelo, gráficas de residuales, etc.), valor de la función objetiva y la precisión de estimación de los parámetros del modelo. Finalmente, para llevar a cabo las simulaciones de las curvas de letalidad a partir de datos FC de humanos, se procedió de la misma manera a la descrita en el apartado 3.5.

# 4

---

## RESULTADOS





- ESTUDIO 1 -

Comparación de la actividad in vitro de anidulafungina,  
caspofungina y micafungina contra *C. albicans*,  
*C. dubliniensis* y *C. africana* mediante curvas de letalidad

(Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2015; 82: 57-61)



Las CMI de anidulafungina, caspofungina y micafungina fueron similares para *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* (Tabla 1 del manuscrito). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en su actividad candidacida entre las tres equinocandinas ( $p < 0,05$ ). Las tres mostraron una actividad fungistática y candidacida en menos de 31 horas contra algunas de las cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* pero no contra *C. africana* (Tabla 4.1, y Figura 1 y Tabla 2 del manuscrito). La Figura 2 del manuscrito muestra las tasas de letalidad o crecimiento de las diferentes especies con las tres equinocandinas. La actividad antifúngica de anidulafungina, caspofungina y micafungina dependía tanto de la concentración de fármaco como de la equinocandina empleada ( $p < 0,05$ ) y aumentó con el tiempo. Anidulafungina fue más activa que caspofungina y micafungina contra *C. albicans* pero las tres mostraban una eficacia similar contra *C. africana* y *C. dubliniensis*.

**Tabla 4.1:** Tiempo (h) en el que anidulafungina, caspofungina y micafungina alcanzaron el 50% ( $t_{50}$ ), 90% ( $t_{90}$ ), 99% ( $t_{99}$ ) y 99,9% ( $t_{99,9}$ ) de la reducción de la concentración celular inicial a la concentración indicada ( $\mu\text{g/ml}$ ), en 7 cepas de *C. albicans*, 5 cepas de *C. dubliniensis* y 2 cepas de *C. africana*

	<i>C. albicans</i>			<i>C. dubliniensis</i>			<i>C. africana</i>		
	0,12	0,5	2	0,12	0,5	2	0,12	0,5	2
Anidulafungina									
$t_{50}$	19,11	7,62	4,97	NA	NA	37,75	NA	NA	NA
$t_{90}$	>48	25,3	16,5	NA	NA	>48	NA	NA	NA
$t_{99}$	>48	>48	33	NA	NA	>48	NA	NA	NA
$t_{99,9}$	>48	>48	49,5	NA	NA	>48	NA	NA	NA
Caspofungina									
$t_{50}$	NA	NA	9,84	NA	NA	>48	NA	NA	NA
$t_{90}$	NA	NA	32,7	NA	NA	>48	NA	NA	NA
$t_{99}$	NA	NA	>48	NA	NA	>48	NA	NA	NA
$t_{99,9}$	NA	NA	>48	NA	NA	>48	NA	NA	NA
Micafungina									
$t_{50}$	NA	16,73	5,34	NA	NA	>48	NA	NA	>48
$t_{90}$	NA	>48	17,8	NA	NA	>48	NA	NA	>48
$t_{99}$	NA	>48	35,5	NA	NA	>48	NA	NA	>48
$t_{99,9}$	NA	>48	>48	NA	NA	>48	NA	NA	>48

NA, no alcanzado





Contents lists available at ScienceDirect

## Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)

## Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves



Sandra Gil-Alonso <sup>a,b</sup>, Nerea Jauregizar <sup>b</sup>, Emilia Cantón <sup>c</sup>, Elena Eraso <sup>a</sup>, Guillermo Quindós <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar "Microbios y Salud" (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología, (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain

<sup>c</sup> Unidad de Microbiología Experimental, Instituto Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 November 2014

Received in revised form 14 January 2015

Accepted 24 January 2015

Available online 2 February 2015

#### Keywords:

*Candida albicans*

*Candida dubliniensis*

*Candida africana*

Time-kill

Echinocandins

### ABSTRACT

*Candida albicans* remains the most common fungal pathogen. This species is closely related to 2 phenotypically similar cryptic species, *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. This study aims to compare the antifungal activities of echinocandins against 7 *C. albicans*, 5 *C. dubliniensis*, and 2 *C. africana* strains by time-kill methodology. MIC values were similar for the 3 species; however, differences in killing activity were observed among species, isolates, and echinocandins. Echinocandins produced weak killing activity against the 3 species. In all drugs, the fungicidal endpoint (99.9% mortality) was reached at  $\leq 31$  h with  $\geq 0.5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  for anidulafungin in 4 *C. albicans* and 1 *C. dubliniensis*, for caspofungin in 1 *C. albicans* and 2 *C. dubliniensis*, and for micafungin in 4 *C. albicans* and 1 *C. dubliniensis*. None of echinocandins showed lethality against *C. africana*. Identification of these new cryptic species and time-kill studies would be recommendable when echinocandin treatment fails.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.



**Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana* by time-kill curves**

Sandra Gil-Alonso<sup>a,b</sup>, Nerea Jauregizar<sup>b</sup>, Emilia Cantón<sup>c</sup>, Elena Eraso<sup>a</sup> and Guillermo Quindós<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamentos de Inmunología, Microbiología y Parasitología, and <sup>b</sup>Farmacología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain, <sup>c</sup>Unidad de Microbiología Experimental, Instituto Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

**Running title:** Antifungal activities of echinocandins against *Candida albicans* complex

**\*Corresponding author:** Guillermo Quindós, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología (UFI 11/25 “Microbios y Salud”), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Apartado 699, E-48080 Bilbao, Spain. Phone: 34 94 601 2854. Fax: 34 94 601 3495. E-mail: guillermo.quindos@ehu.es

Abstract: 150 words

Text: 2,271 words

**E-mails of the rest of authors:** [sandra.gil@ehu.es](mailto:sandra.gil@ehu.es) (Sandra Gil-Alonso), [nerea.jauregizar@ehu.es](mailto:nerea.jauregizar@ehu.es) (Nerea Jauregizar), [canton\\_emi@gva.es](mailto:canton_emi@gva.es) (Emilia Cantón), [elena.eraso@ehu.es](mailto:elena.eraso@ehu.es) (Elena Eraso)

**Abstract**

*Candida albicans* remains the most common fungal pathogen. This species is closely related to two phenotypically similar cryptic species, *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. This study aims to compare the antifungal activities of echinocandins against 7 *C. albicans*, 5 *C. dubliniensis* and 2 *C. africana* strains by time-kill methodology. MIC values were similar for the three species; however, differences in killing activity were observed among species, isolates and echinocandins.

Echinocandins produced weak killing activity against the three species. In all drugs the fungicidal endpoint (99.9% mortality) was reached at  $\leq 31$  h with  $\geq 0.5$   $\mu\text{g/mL}$  for anidulafungin in 4 *C. albicans* and 1 *C. dubliniensis*; for caspofungin in 1 *C. albicans* and 2 *C. dubliniensis*; and for micafungin in 4 *C. albicans* and 1 *C. dubliniensis*. None of echinocandins showed lethality against *C. africana*. Identification of these new cryptic species and time-kill studies would be recommendable when echinocandin treatment fails.

**Keywords:** *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida africana*, time-kill, echinocandins

## 1. Introduction

Invasive candidiasis is a severe infection that causes high morbidity and mortality. The current incidence of invasive candidiasis has remained similar in the last years or even has decreased slightly in Australia, Canada, Europe and USA. However, incidence is continuously growing in Latin America and the rest of the world (Quindós, 2014); moreover, species distribution varies with hospital, hospitalization Unit and geographical area (Pemán et al., 2012). *Candida albicans* remains the most common fungal pathogen isolated from clinical samples (Pfaller and Diekema, 2007; Shao et al., 2007; Tortorano et al., 2006). However, this species is closely related to two phenotypically similar cryptic species, *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. *C. dubliniensis* is an opportunistic pathogen linked to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients (Sullivan et al., 1995), although it has also been recovered from blood and other anatomical sites (Gutiérrez et al., 2002; van Hal et al., 2008). *C. africana*, initially described as an atypical, chlamydospore-negative variant of *C. albicans*, is a cause of vaginitis (Alonso-Vargas et al., 2008; Romeo and Criseo, 2009). There is scarce information on the prevalence, antifungal susceptibility patterns, and clinical significance of these cryptic species of the *C. albicans* species complex.

The echinocandins, anidulafungin, caspofungin and micafungin, inhibit 1,3- $\beta$ -D-glucan synthesis, causing fungistatic as well as fungicidal effects. The three echinocandins are similar to each other in terms of mechanism of action and chemical structure; however, there are differences among the echinocandins in terms of in vitro activity, fungicidal activity, post-antifungal effect, paradoxical effect, and activity on biofilms (Mukherjee et al., 2011). Their fungicidal activities and killing rates have been evaluated against several species of *Candida*, usually including a low number of isolates (Cantón et al., 2010; Cantón et al., 2013; Ernst et al., 2002). This study aimed to determine and compare the anidulafungin, caspofungin and micafungin killing activities against *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* by time-kill curves.

## 2. Materials and methods

### 2. 1. Drugs

Caspofungin (Merck Sharp & Dohme, Madrid, Spain) and micafungin (Astellas Pharma Madrid, Spain) were dissolved in water, and anidulafungin (Pfizer SLU, Madrid, Spain) in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock solution of 5120 µg/mL. Further dilutions were prepared in RPMI 1640 medium with L-glutamine and without NaHCO<sub>2</sub> buffered to pH 7 with 0.165 M MOPS (RPMI) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Stock solutions were stored at – 80 °C until use.

### 2. 2. Test isolates

A total of 14 strains were selected for testing: 5 blood isolates (UPV/EHU 99-101, 99-102, 99-103, 99-104 and 99-105), and 2 reference strains of *C. albicans* (NCPF 3153 and 3156); 4 blood isolates (UPV/EHU 00-131, 00-132, 00-133, 00-135), and 1 reference strain of *C. dubliniensis* (NCPF 3949); and 1 vaginal isolate (UPV/EHU 97-135) and 1 reference strain of *C. africana* (ATCC 2669) (Table 1). Fungal strains were obtained from the fungal strain culture collection of the Laboratorio de Micología Médica, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Bilbao, Spain. Isolates were identified by metabolic properties (ATB ID 32C, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and molecular methods, as previously described (Miranda-Zapico et al., 2011; Pemán et al., 2012). They were stored in distilled sterile water until utilization. Prior to testing, clinical isolates and collection strains were sub-cultured onto Sabouraud dextrose agar (SDA) and onto Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) to ensure viability and obtain the required inoculum.

### 2. 3. Antifungal susceptibility testing

MICs were determined by Sensititre YeastOne 10 broth microdilution test (Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK), according to manufacturer's instructions (Miranda-Zapico et al., 2011; Pemán et al., 2012). Briefly, this test consists of a 96-well microtitre plate containing dried

5-fluorocytosine, amphotericin B, anidulafungin, caspofungin, fluconazole, itraconazole, micafungin, posaconazole and voriconazole with incorporated Alamar blue dye, which changes from blue to pink in the presence of microbial growth. The drug concentrations ranged from 0.008 to 8 µg/mL for caspofungin, micafungin, posaconazole and voriconazole, from 0.015 to 8 µg/mL for anidulafungin, from 0.125 to 256 µg/mL for fluconazole, from 0.12 to 8 µg/mL for amphotericin B, from 0.06 to 64 µg/mL for 5-fluorocytosine, and from 0.015 to 16 µg/mL for itraconazole. The panels were sealed and incubated in air at 35 °C and read at 24 h by comparing the color of the medium in each well with those of the reading mask provided by the manufacturer. *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258 were used as quality controls. MIC results for these two strains were within the acceptable range.

#### 2. 4. Time-kill curve studies

Before time-kill curve studies were performed, the antifungal carryover effect was determined as previously described by Cantón et al. (Cantón et al., 2009; Cantón et al., 2013). A reduction of  $\geq 25\%$  in CFU with respect to control was considered as antifungal carryover. Additionally, the aliquots were deposited as spots onto SDA plates and allowed to soak. After they had dried, streaking was performed to separate cells and remove them from the drug source. Time-kill studies were carried out on microtitre plates for the computer-controlled microbiological incubator (BioScreen C MBR, LabSystems, Helsinki, Finland) in RPMI (final volume 200 µL) by using an inoculum size of  $1-5 \times 10^5$  CFU/mL. Antifungal drug concentrations assayed were 0.125, 0.5 and 2 µg/mL. These concentrations were chosen taking into account the echinocandin MICs for the isolates. Additionally, these concentrations are reached in serum after standard doses (Catalán González and Montejo Gonzalez, 2008). Plates were incubated 48 h at  $36 \pm 1$  °C without agitation. At predetermined time points (0, 2, 4, 6, 24, and 48 h) 6-10 µL aliquots were removed from both the control well and each test solution well and serially diluted in Phosphate Buffered Saline (PBS) to determine the number of CFU/mL. Volumes of 5, 10, 50 or 100 µL

(depending on the dilution and concentration of the drug) were plated onto SDA and incubated at  $36 \pm 1$  °C for 24 to 48 h. When the colony counts were expected to be less than 200 CFU/mL, samples of 5  $\mu$ L were taken directly from the test solution and plated. The lower limit of accurate and reproducible detectable colony counts was 200 CFU/mL. The time-kill curve studies were conducted in duplicate and on two different days.

## 2. 5. Data analysis

The killing kinetics of the fungicidal activity were analyzed by fitting the time-kill data at each time point to the exponential equation  $N_t = N_0 \times e^{Kt}$ , which was transformed into a line by applying logarithms [ $\log N_t = \log N_0 + Kt$ ], where  $N_t$  is the number of viable yeast cells at time  $t$ ,  $N_0$  is the starting inoculum,  $K$  is the killing or growing rate, and  $t$  is the incubation time. Thus, the six time points on each killing curve were reduced to one value,  $K$ . The goodness of fit for each isolate/drug was assessed by the  $r^2$  value ( $>0.8$ ). The mean times to achieve reductions in viable cells of 50% ( $t_{50} = 0.30103/K$ ), 90% ( $t_{90} = 1/K$ ), and 99% ( $t_{99} = 2/K$ ), and the time to reach the fungicidal endpoint ( $t_{99.9} = 3/K$ ) were calculated from the  $K$  value. The fungicidal activities were compared by use of  $K$  values, positive values indicate growth and negative values indicate killing. Analysis of variance was performed to determine significant differences in killing kinetics among species, echinocandins and concentrations. A  $p$  value  $<0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3. 1. Antifungal susceptibility results

Anidulafungin MICs ranged  $< 0.015$ - $0.06$   $\mu$ g/mL for *C. dubliniensis*, and  $< 0.015$ - $0.03$   $\mu$ g/mL for *C. albicans* and *C. africana*. For caspofungin, MICs ranged  $0.06$ - $0.125$   $\mu$ g/mL for *C. albicans*,  $0.03$ - $0.125$   $\mu$ g/mL for *C. dubliniensis* and  $0.06$ - $0.5$   $\mu$ g/mL for *C. africana*. Micafungin MICs ranged  $< 0.008$ - $0.06$   $\mu$ g/mL for *C. albicans*,  $0.015$ - $0.03$   $\mu$ g/mL for *C. dubliniensis* and  $< 0.008$ - $0.03$   $\mu$ g/mL



for *C. africana* (Table 1). Anidulafungin and micafungin MICs were lower than those of caspofungin for the three species evaluated.

### 3. 2. Killing curve studies

No antifungal carryover effect was detected in time-kill studies. The mean time–kill curves and standard deviations of the three echinocandins against the isolates tested are depicted in Figure 1. The killing activities of anidulafungin, caspofungin and micafungin were species and isolate-dependent ( $p < 0.05$ ) and increased with concentration and time. All echinocandins were more active against *C. albicans* than against both *C. dubliniensis* and *C. africana*. For anidulafungin, the mean maximum log decrease in CFU/mL was achieved against *C. albicans* at 48 h with 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $3.01 \pm 2.48$  log [range 0 – 5.3 log]), but two strains reached the maximum log decrease with 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ( $>5$ log,) and for the strain NCPF 3153 it did not show lethality. Against *C. dubliniensis*, the mean maximum log reductions in CFU/mL were also reached with 2  $\mu\text{g/mL}$  but at 24 h ( $1.41 \pm 2.05$  log [range 0–5 log]) except for the strain UPV/EHU 00-135, which reached the highest log reduction ( $5.03 \pm 0.35$  log) with a lower concentration, 0.12  $\mu\text{g/mL}$ . Finally, although anidulafungin did not show lethality against *C. africana*, the CFU were always below those of control (Figure 1).

For caspofungin and *C. albicans*, the mean maximum log decrease was achieved at 48 h with 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $1.74 \pm 1.92$  log [range 0 – 5.14 log]), one strain reached the maximum log decrease ( $5.15 \pm 0.19$  log) with a lower concentration, 0.12  $\mu\text{g/mL}$ . For *C. dubliniensis* the mean maximum log decrease was achieved at 24 h with 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $2.27 \pm 2.53$  log [range 0 – 5 log]); for two of the five strains this log decrease was  $>4$  log. Caspofungin did not show lethality against *C. africana*, but with only 2  $\mu\text{g/mL}$  the CFU were below control (Figure 1).

Micafungin against *C. albicans* achieved the mean maximum log decrease in CFU/mL at 24 h with 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $2.49 \pm 2.58$  log [range 0 – 5.22 log]); 2 strains showed decreases in CFU/mL  $\geq 4$  log). The maximum decrease for *C. dubliniensis* was achieved with 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $1.41 \pm 2.05$  log [range

0.42– 5 log]) at 24 h; only against one strain was micafungin fungicidal ( $5 \pm 0.26$  log reduction). Against *C. africana*, it did not show lethality and the same as with anidulafungin the number of CFU was always below control (Figure 1).

Figure 2 shows that the killing rate of echinocandin concentrations for *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* was drug and concentration dependent for each of the three species ( $p < 0.001$ ). Anidulafungin and micafungin showed similar killing rates against *C. albicans* with 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , they being higher than those of caspofungin. Nevertheless, with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anidulafungin exhibited a higher killing rate than micafungin ( $p < 0.05$ ). Against *C. dubliniensis* and *C. africana* anidulafungin, caspofungin and micafungin showed similar killing rates.

Table 2 shows the mean times needed to reduce 99.9% of the initial inoculum for each strain and echinocandin concentration. Anidulafungin and micafungin required less than 31 h to reach the fungicidal endpoint with 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  against four of seven strains of *C. albicans*, and caspofungin only reached this point against one strain but with 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Against *C. dubliniensis*, the fungicidal endpoint was only reached for one strain at 30 h with 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of caspofungin and micafungin, and with 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of anidulafungin.

#### 4. Discussion

This study has made a head-to-head comparison of the killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and micafungin using clinical isolates and strains of *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* and is the first to report the MIC values of these echinocandins for *C. africana*. The MICs for *C. albicans* and *C. dubliniensis* were similar to those obtained by other authors (Espinel-Ingroff et al., 2013; Pfaller et al., 2014).

We have determined the time to reach the fungicidal endpoint at concentrations attained in human blood during echinocandin therapy. The lack of similar reports in the literature has

precluded comparisons. The same as other authors, we have also detected variability among strains (Szilagyí et al., 2012; Varga et al., 2008). Varga et al. evaluated the in vitro activity of caspofungin against 6 *C. dubliniensis* strains by time-kill methodology using RPMI-1640 medium and concentrations ranging from 0.06 to 16 µg/mL at starting inoculum of 10<sup>5</sup> CFU/mL and concluded that 5 strains were inhibited, but none were killed by any of the caspofungin concentrations used in the study (Varga et al., 2008). We have done microdilution, which differs only in the final volume; nevertheless, our results are in accordance with those reported by these authors. In 2012, Szilagyí et al. (Szilagyí et al., 2012) evaluated the activity of caspofungin against 6 *Candida* species with time-kill procedures and they found the fungicidal endpoint with 0.12 µg/mL for 1 *C. albicans* isolate and with 1 µg/mL for the other species. Against *C. dubliniensis* they obtained reductions in CFU of 1.48, 0.31 and 0.24 log<sub>10</sub> with 16, 1 and 0.12 µg/mL of caspofungin, respectively. On the contrary, in our study significant reductions were only detected with 2 µg/mL caspofungin and the fungicidal endpoints reached in 2 *C. albicans* isolates. The variability in fungicidal activity observed among strains is not only for echinocandins, but has also been described for other antifungal agents. For instance, Szabo et al., (Szabo et al., 2010) studied the killing activity of amphotericin B, 5-fluorocytosine and some triazoles against 6 *C. dubliniensis* clinical isolates and observed that some *C. dubliniensis* strains may require more time to be killed by amphotericin B than others.

One of the limitations of the current study is the scarce number of *C. africana* isolates tested due to the low frequency of isolation in the clinical setting (1.8%) (Borman et al., 2013). Nevertheless, the identification of *C. africana*, *C. albicans* and *C. dubliniensis* is important because these species show different susceptibility to echinocandins, even within the same species, for this reason, when an antifungal treatment fails, it may be due to the fact that different isolates of the same species do not respond equally to antifungals. Therefore, it would be recommendable to perform the corresponding killing kinetics studies when treatment with echinocandins fails, since killing curves are tools that provide much information about the action of antifungals. In summary,

while the MIC values of echinocandins were alike for the 3 species, differences in fungicidal activity were observed among species, isolates and echinocandins. Anidulafungin was the most active against *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* and caspofungin was the echinocandin that showed the least killing activity. Our study suggests that *C. albicans* is the most susceptible species for echinocandins, followed by *C. dubliniensis* and *C. africana*. However, the latter species is less pathogenic than *C. albicans* and *C. dubliniensis* in the *Galleria mellonella* systemic infection model, according to Borman et al. (Borman et al., 2013).

### Acknowledgements

SGA had a scholarship from the Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). This work was supported by Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (S-PR12UN002, S-PE13UN121) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI11/00203), and UPV/EHU (UFI 11/25). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

In the past 5 years, EE has received grant support from Astellas Pharma, and Pfizer SLU. GQ has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Pfizer SLU, Schering Plough and Merck Sharp and Dohme. He has been an advisor/consultant to Merck Sharp and Dohme, and has been paid for talks on behalf of Astellas Pharma, Esteve Hospital, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer SLU, and Schering Plough.

## References

- Alonso-Vargas R, Elorduy L, Eraso E, Cano FJ, Guarro J, Pontón J, Quindós G (2008) Isolation of *Candida africana*, probable atypical strains of *Candida albicans*, from a patient with vaginitis. *Med Mycol* 46:167-170.
- Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM (2013) Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 51:967-972.
- Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L (2010) In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2194-2197.
- Cantón E, Pemán J, Hervas D, Espinel-Ingroff A (2013) Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother* 68:864-868.
- Cantón E, Pemán J, Valentín A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M (2009) In vitro activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3108-3111.
- Catalán González M, Montejo Gonzalez JC (2008) Anidulafungin: a new therapeutic approach in antifungal therapy. Pharmacology of anidulafungin. *Rev Iberoam Micol* 25:92-100.
- Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME (2002) In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3846-3853.
- Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Cantón E, Chrystanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Fothergill A, Fuller J, Gaustad P, González GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Meis JF, Moore CB, Ostrosky-Zeichner L, Peláez T, Pukinskis SR, St-Germain G, Szeszs MW, Turnidge J (2013) Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother* 57:5836-5842.
- Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G (2002) *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol* 42:207-227.
- Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, Quindós G (2011) Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother* 66:2315-2322.
- Mukherjee PK, Sheehan D, Puzniak L, Schlamm H, Ghannoum MA (2011) Echinocandins: are they all the same? *J Chemother* 23:319-325.
- Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz-Pérez-de-Pipaón MT, Pérez-del-Molino L, Linares-Sicilia MJ, Marco F, García J, Roselló EM, Gómez-G-de-la-Pedrosa E, Borrell N, Porrás A, Yague G, FUNGEMYCA Study Group (2012) Epidemiology,

species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 67:1181-1187.

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

Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bustamante B, Cantón E, Diekema DJ, Fothergill A, Fuller J, González GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Martín-Mazuelos E, Meis JF, Ostrosky-Zeichner L, Peláez T, St-Germain G, Turnidge J (2014) Multicenter study of anidulafungin and micafungin MIC distributions and epidemiological cutoff values for eight *Candida* species and the CLSI M27-A3 broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 58:916-922.

Quindós G (2014) Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 31:42-48.

Romeo O, Criseo G (2009) Morphological, biochemical and molecular characterisation of the first Italian *Candida africana* isolate. *Mycoses* 52:454-457.

Shao PL, Huang LM, Hsueh PR (2007) Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* 30:487-495.

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 ( Pt 7):1507-1521.

Szabo Z, Borbely A, Kardos G, Somogyvari F, Kemeny-Beke A, Asztalos L, Rozgonyi F, Majoros L (2010) In vitro efficacy of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida dubliniensis* isolates using time-kill methodology. *Mycoses* 53:196-199.

Szilágyi J, Foldi R, Bayegan S, Kardos G, Majoros L (2012) Effect of nikkomycin Z and 50% human serum on the killing activity of high-concentration caspofungin against *Candida* species using time-kill methodology. *J Chemother* 24:18-25.

Table 1

MICs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of echinocandins for test isolates

Species	Isolate/Strain	Anidulafungin	Caspofungin	Micafungin
<i>C. albicans</i>	UPV/EHU 99-101	< 0.015	0.06	< 0.008
	UPV/EHU 99-102	< 0.015	0.06	< 0.008
	UPV/EHU 99-103	< 0.015	0.06	0.015
	UPV/EHU 99-104	< 0.015	0.06	< 0.008
	UPV/EHU 99-105	0.03	0.125	0.015
	NCPF 3153	< 0.015	0.06	< 0.008
	NCPF 3156	0.03	0.06	0.06
	GM/Median	0.02/0.02	0.07/0.06	0.01/0.01
<i>C. dubliniensis</i>	UPV/EHU 00-131	0.03	0.06	0.015
	UPV/EHU 00-132	0.03	0.06	0.03
	UPV/EHU 00-133	< 0.015	0.03	0.015
	UPV/EHU 00-135	< 0.015	0.06	0.015
	NCPF 3949	0.06	0.125	0.03
	GM/Median	0.03/0.03	0.06/0.06	0.02/0.02
<i>C. africana</i>	UPV/EHU 97-135	< 0.015	0.06	< 0.008
	ATCC 2669	0.03	0.5	0.03
	GM/Median	0.02/0.02	0.35/1.03	0.02/0.02

GM= geometric mean of MIC.

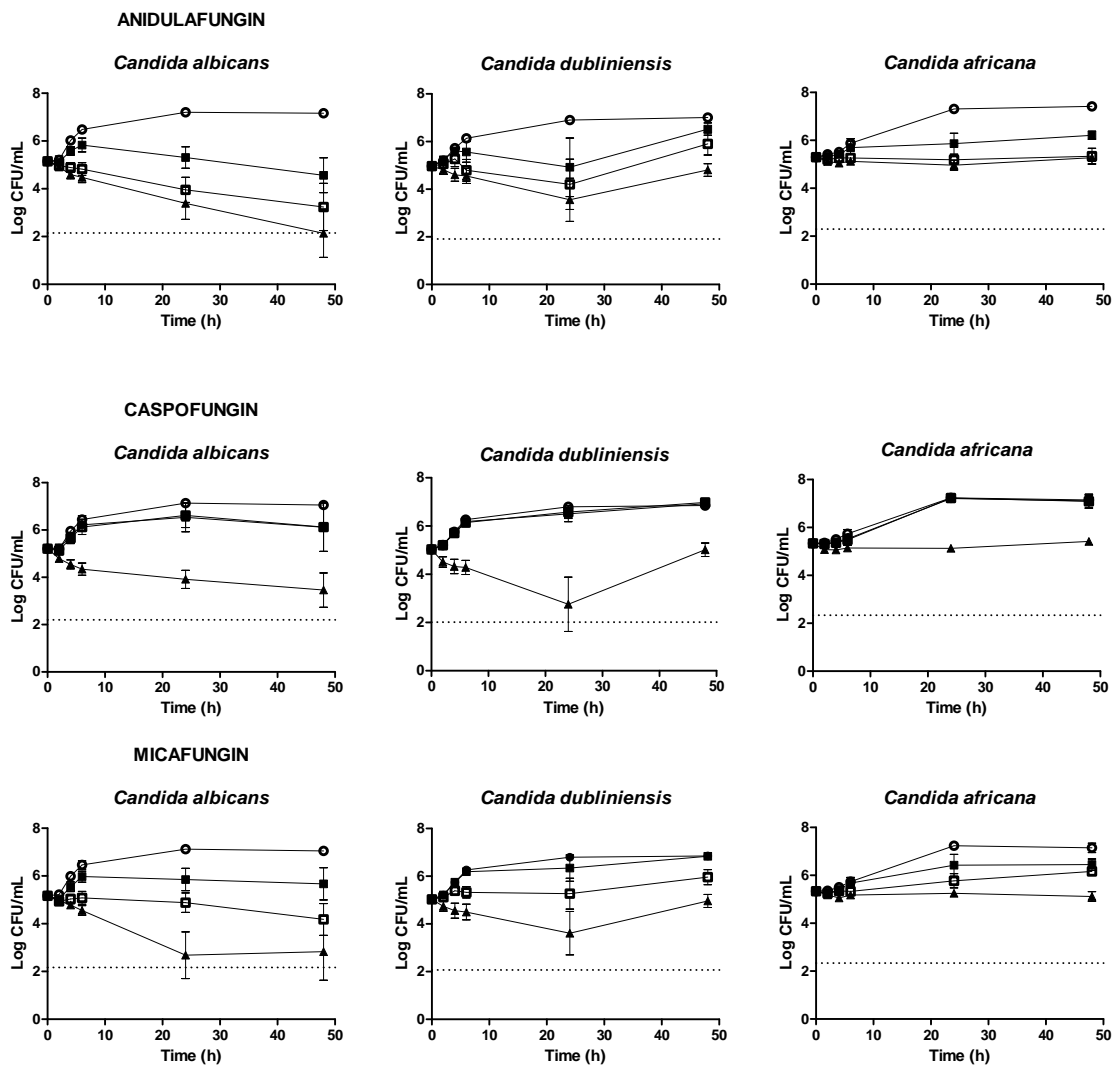
**Table 2**

Time (h) to achieve 99.9% ( $t_{99.9}$ ) growth reduction from the initial inocula at the indicated concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

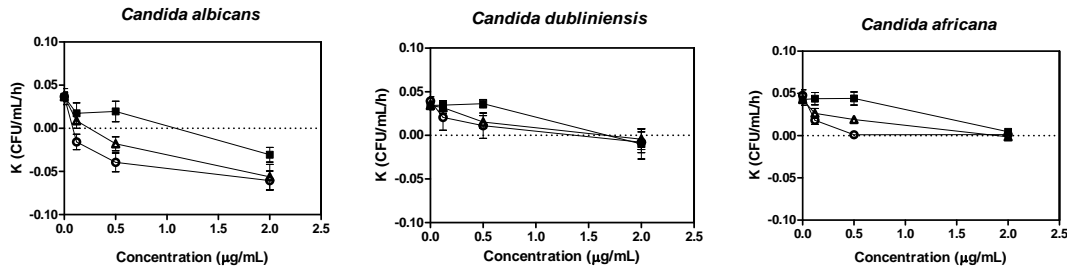
Drug Parameter Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Anidulafungin			Caspofungin			Micafungin		
	$t_{99.9}$			$t_{99.9}$			$t_{99.9}$		
	0.12	0.5	2	0.12	0.5	2	0.12	0.5	2
<i>C. albicans</i>									
UPV/EHU 99-101	>48	31	30.61	30.35	30.2	30	>48	>48	25
UPV/EHU 99-102	>48	>48	30	NA	NA	>48	>48	>48	31.4
UPV/EHU 99-103	NA	NA	>48	NA	NA	>48	NA	NA	>48
UPV/EHU 99-104	NA	NA	>48	NA	NA	>48	NA	NA	>48
UPV/EHU 99-105	>48	48.4	30.3	NA	NA	>48	NA	>48	25.5
NCPF 3153	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NCPF 3156	>48	27.4	26.27	NA	NA	>48	NA	>48	25.6
<i>C. dubliniensis</i>									
UPV/EHU 00-131	NA	NA	NA	NA	NA	28.7	NA	NA	NA
UPV/EHU 00-132	NA	NA	>48	NA	NA	>48	NA	NA	>48
UPV/EHU 00-133	NA	NA	>48	NA	NA	NA	NA	NA	>48
UPV/EHU 00-135	28.96	28.68	28.22	NA	NA	29.67	NA	>48	29.7
NCPF 3949	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>C. africana</i>									
UPV/EHU 97-135	NA	>48	>48	NA	NA	NA	NA	NA	>48
ATCC 2669	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA= not achieved





**Fig. 1.** Mean time-kill plots for anidulafungin, caspofungin and micafungin against seven *C. albicans*, five *C. dubliniensis* and two *C. africana* strains. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars) for the indicated number of isolates. Open circles ( $\circ$ ): control; filled squares ( $\blacksquare$ ): 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; open squares ( $\square$ ): 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; filled triangles ( $\blacktriangle$ ): 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The broken lines represent  $\geq 99.9\%$  growth reduction compared with that of the initial inoculum (fungicidal effect).



**Fig. 2.** Effect of concentration on killing rates of anidulafungin, caspofungin and micafungin. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars) for the indicated number of isolates. Open circles (○): anidulafungin; filled squares (■):caspofungin; open triangles (△): micafungin. Values above the broken lines indicate growth and values below the broken lines indicate killing.

- ESTUDIO 2 -

Comparación de la actividad in vitro de anidulafungina,  
caspofungina y micafungina contra *C. glabrata*,  
*C. nivariensis* y *C. bracarensis* mediante curvas de letalidad

(Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2015; 59: 3615-3618)



Las CMI de las tres equinocandinas (Tabla 1 del manuscrito) fueron similares para *C. glabrata*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis*; sin embargo se observaron diferencias significativas en las tasas de letalidad entre las especies, cepas y fármacos antifúngicos estudiados ( $p < 0,05$ ).

Anidulafungina, caspofungina y micafungina mostraron una actividad fungistática contra las tres especies, excepto micafungina contra *C. nivariensis* (Tabla 2 del manuscrito y Figura 1 del manuscrito). La anidulafungina fue la única equinocandina que mostró actividad fungicida contra *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* con 0,5 µg/ml ( $5,17 \pm 0,52$ ;  $3,62 \pm 2,78$  y  $5,58 \pm 0,04$  log, respectivamente). Contra *C. bracarensis* alcanzó este límite candidacida con una concentración más baja, de 0,125 µg/ml (Tabla 4.2 y Figura 1 del manuscrito). Micafungina fue fungicida contra *C. glabrata* y *C. bracarensis* a partir de 0,125 µg/ml ( $3,83 \pm 1,91$  y  $4,43 \pm 1,63$  log, respectivamente) pero no mostró este efecto contra *C. nivariensis* (Figura 1 y Tabla 2 del manuscrito). Las tasas de letalidad de anidulafungina, caspofungina y micafungina fueron dependientes del fármaco antifúngico y de la concentración del mismo ( $p < 0,05$ ) (Figura 2 del manuscrito). Contra *C. glabrata* la mayor tasa de letalidad la mostraron anidulafungina y micafungina con 0,5 µg/ml.

**Tabla 4.2 :** Tiempo (h) en el que anidulafungina, caspofungina y micafungina alcanzaron el 50% ( $t_{50}$ ), 90% ( $t_{90}$ ), 99% ( $t_{99}$ ) y 99,9% ( $t_{99,9}$ ) de la reducción de la concentración celular en las diferentes cepas ensayadas del complejo *C. glabrata*

Antifúngico	Anidulafungina			Caspofungina			Micafungina		
	$t_{99,9}$			$t_{99,9}$			$t_{99,9}$		
Parámetro									
Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,06	0,125	0,5	0,06	0,125	0,5	0,06	0,125	0,5
<i>C. glabrata</i>									
UPV/EHU 03-282	12,73	12,65	13,92	NA	NA	36,35	NA	12,45	12,68
UPV/EHU 03-285	NA	NA	11,52	NA	NA	> 48	NA	11,63	11,68
UPV/EHU 03-287	NA	NA	14,25	NA	NA	5,89	NA	30,31	5,58
ATCC 90030	NA	NA	14,1	NA	NA	28,54	NA	30,23	15,54
NCPF 3203	NA	24,73	12,79	NA	> 48	NA	NA	13,15	4,86
<i>C. nivariensis</i>									
UPV/EHU 11-284	NA	NA	> 48	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CBS 9984	NA	NA	25	NA	NA	> 48	NA	NA	NA
CECT 11998T	NA	NA	27,73	NA	NA	27,37	NA	NA	NA
<i>C. bracarensis</i>									
NCYC 3133	> 48	12,47	14,76	NA	28,24	15,16	NA	12,68	25,55
NCYC 3397	> 48	24,86	13,27	NA	> 48	29,59	NA	26,43	26,62

NA, no alcanzado

# ***In Vitro* Fungicidal Activities of Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* Evaluated by Time-Kill Studies**

Sandra Gil-Alonso,<sup>a,b</sup> Nerea Jauregizar,<sup>b</sup> Emilia Cantón,<sup>c</sup> Elena Eraso,<sup>a</sup>  Guillermo Quindós<sup>a</sup>

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología<sup>a</sup> and Departamento de Farmacología,<sup>b</sup> Unidad de Formación e Investigación Multidisciplinar Microbios y Salud (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain; Unidad de Microbiología Experimental, Instituto Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain<sup>c</sup>

**Anidulafungin, caspofungin, and micafungin killing activities against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* were evaluated by the time-kill methodology. The concentrations assayed were 0.06, 0.125, and 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , which are achieved in serum. Anidulafungin and micafungin required between 13 and 26 h to reach the fungicidal endpoint (99.9% killing) against *C. glabrata* and *C. bracarensis*. All echinocandins were less active against *C. nivariensis*.**

**Received** 6 October 2014 **Returned for modification** 12 December 2014

**Accepted** 18 March 2015

**Accepted manuscript posted online** 23 March 2015

**Citation** Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. 2015. *In vitro* fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3615–3618.

[doi:10.1128/AAC.04474-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04474-14).

Address correspondence to Guillermo Quindós, [guillermo.quindos@ehu.es](mailto:guillermo.quindos@ehu.es).

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

[doi:10.1128/AAC.04474-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04474-14)





**In vitro fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies**

Sandra Gil-Alonso,<sup>a,b</sup> Nerea Jauregizar,<sup>b</sup> Emilia Cantón,<sup>c</sup> Elena Eraso,<sup>a</sup> Guillermo Quindós<sup>a</sup>

Departamentos de Inmunología, Microbiología y Parasitología<sup>a</sup>, and Farmacología<sup>b</sup>, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain; Unidad de Microbiología Experimental<sup>c</sup>, Instituto Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

**Running title:** Fungicidal activities of echinocandins against *C. glabrata* complex

Address correspondence to Guillermo Quindós, [guillermo.quindos@ehu.es](mailto:guillermo.quindos@ehu.es)

**ABSTRACT**

Anidulafungin, caspofungin and micafungin killing activities against *Candida glabrata*, *Candida braccarensis* and *Candida nivariensis* were evaluated by time-kill methodology. Concentrations assayed were 0.06, 0.125 and 0.5 µg/ml, which are achieved in serum. Anidulafungin and micafungin required between 13 and 26 h to reach the fungicidal endpoint (99.9% killing) against *C. glabrata* and *C. braccarensis*; caspofungin needed 27.05 h against *C. braccarensis* and >48 h against *C. glabrata*. All echinocandins were less active against *C. nivariensis*.

*Candida glabrata* follows *Candida albicans* as the second or third most prevalent cause of candidemia worldwide (1). *C. glabrata* presents a decreased antifungal susceptibility to fluconazole and other current antifungal drugs and can rapidly acquire resistance (2). *Candida braccarensis* and *Candida nivariensis*, two species closely related to *C. glabrata*, have been recently described (3, 4), but there is scarce information on the prevalence, antifungal susceptibility patterns, and clinical significance of these cryptic species (1, 5-7). The current study aimed to determine the killing activity of echinocandins against *C. glabrata*, *C. braccarensis*, and *C. nivariensis* (Table 1). Strains were identified by metabolic properties (ATB ID 32C, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and molecular methods, as previously described (5, 7).

Caspofungin (Merck Sharp & Dohme, Madrid, Spain) and micafungin (Astellas Pharma Madrid, Spain) were dissolved in water, and anidulafungin (Pfizer SLU, Madrid, Spain) in dimethyl sulfoxide. Further dilutions were prepared in standard RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). MICs (defined as minimum concentrations that produce  $\geq 50$  growth reduction) were determined following the M27-A3 document (8). Time-kill studies were carried out on microtiter plates for the computer-controlled microbiological incubator BioScreen C MBR (LabSystems, Vantaa, Finland) in RPMI 1640 (final volume 200  $\mu$ l, inoculum  $1-5 \times 10^5$  CFU/ml). Echinocandin concentrations assayed were 0.06, 0.125 and 0.5  $\mu$ g/ml, which are achieved in serum after standard doses (9). Plates were incubated at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  without agitation. At 0, 2, 4, 6, 8, 24, and 48 h, aliquots of 6 or 10  $\mu$ l were removed from both the control and each test solution well, serially diluted in PBS and plated onto Sabouraud agar to determine the number of CFU/ml. Each experiment was performed twice for each isolate (10-13). The antifungal carryover effect was determined as formerly reported (12).

Time-kill data were fitted to an exponential equation:  $N_t = N_0 \times e^{kt}$  ( $t$ , incubation time;  $N_p$  viable yeasts at time  $t$ ;  $N_0$ , starting inoculum;  $k$ , killing or growing rate). The goodness of fit for each isolate/drug was assessed by the  $r^2$  value ( $> 0.8$ ). The time needed to achieve 50, 90, 99 and

99.9% reductions in growth ( $t_{50}$ ,  $t_{90}$ ,  $t_{99}$  and  $t_{99.9}$ , respectively) were calculated from the  $k$  value, as described previously (12). Analysis of variance was performed to determine significant differences in killing kinetics. A  $p$  value  $<0.05$  was considered significant.

Micafungin and anidulafungin MICs were lower than those of caspofungin against the three species evaluated (Table 1), and similar to those reported in previous studies; conversely, caspofungin MICs tended to be higher against *C. glabrata* (6, 7, 14-18) although the results of in vitro caspofungin MICs should be cautiously interpreted since a recent study has shown interlaboratory variability in modal MICs (19).

Other authors have reported head-to-head or comparative data regarding the fungicidal activity of the three echinocandins for other *Candida* species, such as *C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* or *Candida lusitanae* using time-kill methods (10, 11, 15-17, 20, 21), but to our knowledge, this is the first study that has made a head-to-head comparison of the killing kinetics of these three echinocandins using blood isolates and strains of *C. bracariensis* and *C. nivariensis*. The lack of similar reports in the literature has precluded comparisons.

The mean time-kill curves and standard deviations of anidulafungin, caspofungin and micafungin against the isolates tested are depicted in Figure 1. The killing activities of the three echinocandins were species dependent and probably there is variability among strains inside each species. Most echinocandin activities and killing rate studies against several species of *Candida*, have usually included a low number of isolates similar to the number of strains in the current study (10, 11, 15).

For anidulafungin the mean maximum log decrease in CFU/ml was  $>3$  log for *C. glabrata*, *C. bracarensis* and *C. nivariensis* ( $5.17 \pm 0.52$  log,  $5.58 \pm 0.04$  log and  $3.62 \pm 2.78$  log, respectively) with  $0.5 \mu\text{g/ml}$ . For caspofungin these decreases were  $<3$  log against *C. glabrata* and *C. nivariensis* ( $2.91 \pm 2.62$  and  $1.65 \pm 3.81$  log, respectively) and  $>3$  log for *C. bracarensis* ( $4.33 \pm 1.78$  log). The mean maximum log decreases were  $>3$  log for  $0.125 \mu\text{g/ml}$  of micafungin, against *C. glabrata*

( $3.83 \pm 1.91$  log) and *C. bracariensis* ( $4.43 \pm 1.63$  log). Similar results have been observed by Nguyen et al. (15, 16) for *C. glabrata*, as these authors reported that anidulafungin and micafungin were fungicidal against 3 isolates of this species (0.48-0.96  $\mu\text{g/ml}$  and 0.24-2  $\mu\text{g/ml}$ , respectively).

There was a paradoxical effect for *C. bracarensis*, as 0.125  $\mu\text{g/ml}$  of micafungin caused more lethality than 0.5  $\mu\text{g/ml}$  at 24 h. This effect, defined as the ability to grow at high antifungal concentrations, but not at intermediate concentrations, has also been reported by other authors (10, 11). However, this paradoxical growth does not preclude in vivo response to echinocandin therapy in *Candida dubliniensis* infections (22). Against *C. nivariensis*, micafungin did not show lethality.

Figure 2 shows the effects of echinocandin concentrations on the killing rate of the three species. Against *C. glabrata*, the highest killing rate was reached with 0.125  $\mu\text{g/ml}$  of micafungin; however, against *C. nivariensis*, anidulafungin showed the highest killing rate with 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Even at the lowest concentration (0.06  $\mu\text{g/ml}$ ), anidulafungin showed killing activity against *C. bracarensis*.

Table 2 shows the mean time needed to kill 50, 90, 99 and 99.9% of the initial inoculum for each echinocandin concentration. While anidulafungin and micafungin required between 13 and 26 h to reach the fungicidal endpoint (99.9% killing) against *C. glabrata* (13.23 h with 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) and *C. bracarensis* (22.11 and 22.72 h with 0.125  $\mu\text{g/ml}$ , respectively), 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of caspofungin required 27.05 h against *C. bracarensis* and more than 48 h against *C. glabrata*. Only anidulafungin reached the fungicidal endpoint (36.54 h with 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) against *C. nivariensis*. The repercussion of protein binding on the in vitro killing should be very similar for the three echinocandins as the protein binding is >96% for all of them (23)

In conclusion, while MIC values of anidulafungin and micafungin were similar for the three species, differences in fungicidal activities were observed. All echinocandins were more lethal against *C. glabrata* and *C. bracarensis* than against *C. nivariensis*. Anidulafungin was the most active against *C. bracarensis* and *C. nivariensis*, and micafungin against *C. glabrata*. However, time-kill data

reveal that micafungin did not show killing activity against *C. nivariensis*. The lower activity of echinocandins against *C. nivariensis* highlights the importance of the correct identification and of knowing the antifungal susceptibility patterns of these new cryptic species for an adequate therapeutical approach of infections caused by the *C. glabrata* clade.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (S-PR12UN002, S-PE13UN121) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI11/00203), and UPV/EHU (UFI 11/25). SGA had a predoctoral scholarship from the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. In the past 5 years, EE has received grant support from Astellas Pharma, and Pfizer SLU. GQ has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Pfizer SLU, Schering Plough and Merck Sharp and Dohme. He has been an advisor/consultant to Merck Sharp and Dohme, and has been paid for talks on behalf of Abbvie, Astellas Pharma, Esteve Hospital, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer SLU, and Schering Plough.

## REFERENCES

1. **Quindós G.** 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* **31**:42-48.
2. **Quindós G, Sanchez-Vargas LO, Villar-Vidal M, Eraso E, Alkorta M, Hernandez-Almaraz JL.** 2008. Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**:266-271.
3. **Alcoba-Florez J, Mendez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Perez-Roth E, Arevalo MP.** 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4107-4111.
4. **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.
5. **Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernandez-Almaraz JL, Lopez-Soria LM, Carrillo-Munoz AJ, Hernandez-Molina JM, Quindós G.** 2011. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:2315-2322.
6. **Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, Diekema DJ.** 2009. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1216-1217.
7. **Peman J, Canton E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz-Perez-de-Pipaon MT, Perez-del-Molino L, Linares-Sicilia MJ, Marco F, Garcia J, Rosello EM, Gomez-G-de-la-Pedrosa E, Borrell N, Porras A, Yague G, FUNGEMYCA Study Group.** 2012. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:1181-1187.
8. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. M27-A3 S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth International Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
9. **Catalan Gonzalez M, Montejo Gonzalez JC.** 2008. Anidulafungin: a new therapeutic approach in antifungal therapy. *Pharmacology of anidulafungin. Rev. Iberoam. Micol.* **25**:92-100.
10. **Canton E, Peman J, Hervas D, Espinel-Ingroff A.** 2013. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:864-868.
11. **Canton E, Espinel-Ingroff A, Peman J, del Castillo L.** 2010. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2194-2197.
12. **Canton E, Peman J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A.** 2004. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2477-2482.

13. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
14. **Smith RP, Baltch A, Bopp LH, Ritz WJ, Michelsen PP.** 2011. Post-antifungal effects and time-kill studies of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **71**:131-138.
15. **Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, Clancy CJ.** 2009. Anidulafungin is fungicidal and exerts a variety of postantifungal effects against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3347-3352.
16. **Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, Clancy CJ.** 2010. Characterising the post-antifungal effects of micafungin against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **35**:80-84.
17. **Clancy CJ, Huang H, Cheng S, Derendorf H, Nguyen MH.** 2006. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2569-2572.
18. **Lopez-Soria LM, Bereciartua E, Santamaria M, Soria LM, Hernandez-Almaraz JL, Mularoni A, Nieto J, Montejo M.** 2013. First case report of catheter-related fungemia by *Candida nivariensis* in the Iberian Peninsula. *Rev. Iberoam. Micol.* **30**:69-71.
19. **Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Canton E, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Fothergill A, Fuller J, Gaustad P, Gonzalez GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Meis JF, Moore CB, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pukinskas SR, St-Germain G, Szeszs MW, Turnidge J.** 2013. Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:5836-5842.
20. **Canton E, Peman J, Valentin A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M.** 2009. In vitro activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3108-3111.
21. **Baltch AL, Ritz W, Bopp LH, Michelsen PB, Smith RP.** 2011. Time-kill studies with micafungin and voriconazole against *Candida glabrata* intracellularly in human monocyte-derived macrophages and extracellularly in broth. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **70**:468-474.
22. **Marine M, Pastor FJ, Sahand IH, Pontón J, Quindós G, Guarro J.** 2009. Paradoxical growth of *Candida dubliniensis* does not preclude in vivo response to echinocandin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:5297-5299.
23. **Elefanti A, Mouton JW, Krompa K, Al-Saigh R, Verweij PE, Zerva L, Meletiadis J.** 2013. Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against *Aspergillus* species in the presence of serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 1625-1631.



TABLE 1. MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of indicated drug

Species	Isolate/Strain	Anidulafungin	Caspofungin	Micafungin
<i>C. glabrata</i>	*UPV/EHU 03-282	0.06	0.25	0.12
	*UPV/EHU 03-285	0.06	0.5	0.12
	*UPV/EHU 03-287	0.06	0.25	0.12
	ATCC 90030	0.06	0.25	0.25
	NCPF 3203	0.06	0.25	0.12
	GM/Median	0.06/0.06	0.29/0.25	0.14/0.12
<i>C. braccarensis</i>	NCYC 3133	0.06	0.25	0.12
	NCYC 3397	0.06	0.12	0.12
	GM/Median	0.06/0.06	0.17/0.19	0.12/0.12
<i>C. nivariensis</i>	*UPV/EHU 11-284	0.12	0.25	0.12
	CBS 9984	0.06	0.25	0.12
	CECT 11998T	0.06	0.25	0.12
	GM/Median	0.08/0.06	0.25/0.25	0.12/0.12

\*Bloodstream isolates. GM: geometric mean of MIC.

TABLE 2. Time (h) to achieve 50% ( $t_{50}$ ), 90% ( $t_{90}$ ), 99% ( $t_{99}$ ) and 99.9% ( $t_{99.9}$ ) growth reduction from the initial inoculum at the indicated concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )

	<i>C. glabrata</i>			<i>C. nivariensis</i>			<i>C. braccarensis</i>		
	0,06	0,125	0,5	0,06	0,125	0,5	0,06	0,125	0,5
Anidulafungin									
$t_{50}$	NA	13.3	1.33	NA	NA	3.67	6.2	2.22	1.4
$t_{90}$	NA	44.17	4.41	NA	NA	12.18	20.6	7.37	4.66
$t_{99}$	NA	> 48	8.82	NA	NA	24.36	41.19	14.74	9.32
$t_{99.9}$	NA	> 48	13.23	NA	NA	36.54	> 48	22.11	13.97
Caspofungin									
$t_{50}$	NA	NA	6.9	NA	NA	8.78	NA	5.62	2.71
$t_{90}$	NA	NA	22.95	NA	NA	29.18	NA	18.66	9.01
$t_{99}$	NA	NA	45.9	NA	NA	> 48	NA	37.32	18.03
$t_{99.9}$	NA	NA	> 48	NA	NA	> 48	NA	> 48	27.05
Micafungin									
$t_{50}$	NA	2.36	1.31	NA	NA	NA	NA	2.28	2.62
$t_{90}$	NA	7.82	4.36	NA	NA	NA	NA	7.58	8.7
$t_{99}$	NA	15.65	8.72	NA	NA	NA	NA	15.15	17.39
$t_{99.9}$	NA	23.47	13.08	NA	NA	NA	NA	22.72	26.09

NA: not achieved

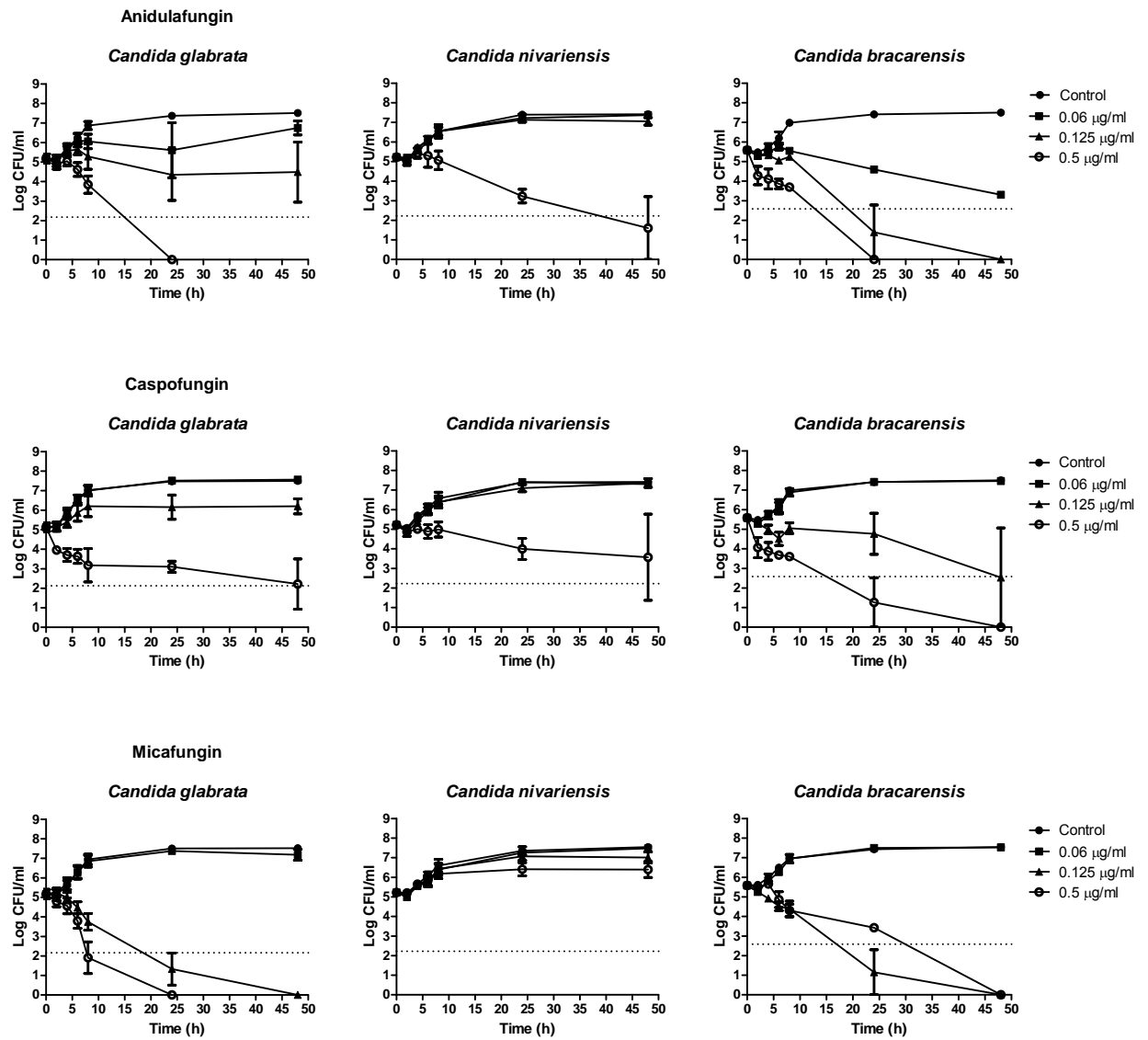


FIG 1. Mean time-kill plots for anidulafungin, caspofungin and micafungin against five *C. glabrata*, three *C. nivariensis* and two *C. braccarensis* strains. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars) for the indicated number of isolates. Broken lines represents  $\geq 99.9\%$  growth reduction compared with that of the initial inoculum (fungicidal effect).

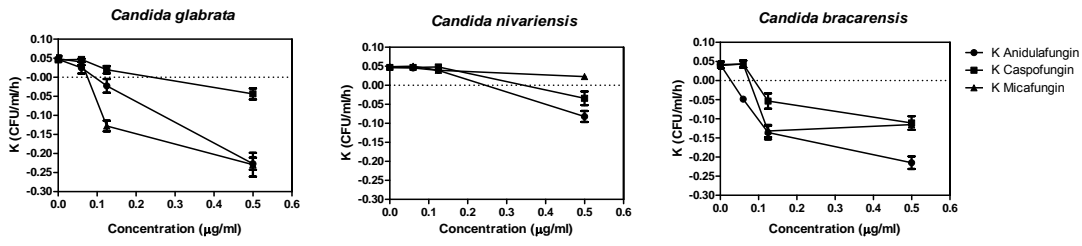


FIG 2. Effect of concentration on killing rates of anidulafungin, caspofungin and micafungin.

Values above broken lines indicate growth and values below the broken lines indicate killing.

- ESTUDIO 3 -

Comparación de la actividad in vitro de anidulafungina,  
caspofungina y micafungina contra *C. parapsilosis*,  
*C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* mediante  
curvas de letalidad

(Journal of Antimicrobial Chemotherapy: en redacción)



Los valores de las CMI de anidulafungina, caspofungina y micafungina fueron similares para las tres especies del complejo *C. parapsilosis*, pero las tasas de letalidad para las diferentes especies, cepas y fármacos antifúngicos evaluados fueron diferentes ( $p < 0,05$ ).

Anidulafungina, caspofungina y micafungina mostraron una actividad fungistática contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Sin embargo, caspofungina no mostró esta actividad contra *C. parapsilosis* (Tabla 4.3 y Figura 1 del manuscrito). Anidulafungina fue la única equinocandina que produjo una actividad candidacida contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* con una concentración de 8 µg/ml ( $5,3 \pm 0,004$ ;  $5,3 \pm 0,008$  y  $3,58 \pm 2,5$  log, respectivamente). Caspofungina fue candidacida contra una cepa de *C. metapsilosis* a una concentración de 8 µg/ml a las 30,12 h (Figura 1 y Tabla 1 del manuscrito). Micafungina fue fungicida contra *C. metapsilosis* y contra una cepa de *C. parapsilosis* y otra de *C. orthopsilosis* entre las 12,74 y 28,38 h. Las tasas de letalidad de las equinocandinas (Figura 2 del manuscrito) contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* fueron fármaco y concentración dependientes ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.3:** Tiempo (h) en el que anidulafungina, caspofungina y micafungina alcanzaron el 50% ( $t_{50}$ ), 90% ( $t_{90}$ ), 99% ( $t_{99}$ ) y 99,9% ( $t_{99,9}$ ) de la reducción de la concentración celular inicial a la concentración indicada ( $\mu\text{g/ml}$ ), en 3 cepas de *C. parapsilosis*, 2 cepas de *C. metapsilosis* y 2 cepas de *C. orthopsilosis*

	<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. metapsilosis</i>			<i>C. orthopsilosis</i>		
	0,25	2	8	0,25	2	8	0,25	2	8
Anidulafungina									
$t_{50}$	NA	NA	2.86	NA	4,73	1,34	NA	6,3	4,04
$t_{90}$	NA	NA	9.51	NA	15,7	4,47	NA	20,92	13,41
$t_{99}$	NA	NA	19	NA	31,39	8,93	NA	41,84	26,82
$t_{99,9}$	NA	NA	28.52	NA	47,09	13,4	NA	>48	40,23
Caspofungina									
$t_{50}$	NA	NA	NA	NA	NA	4,9	NA	9,07	7,36
$t_{90}$	NA	NA	NA	NA	NA	16,29	NA	30,12	24,45
$t_{99}$	NA	NA	NA	NA	NA	32,58	NA	>48	48,9
$t_{99,9}$	NA	NA	NA	NA	NA	48,89	NA	>48	>48
Micafungina									
$t_{50}$	NA	NA	5,36	NA	NA	1,34	NA	NA	4,4
$t_{90}$	NA	NA	17,79	NA	NA	4,45	NA	NA	14,62
$t_{99}$	NA	NA	35,58	NA	NA	8,9	NA	NA	29,24
$t_{99,9}$	NA	NA	>48	NA	NA	13,35	NA	NA	43,85

NA, no alcanzado



**Evaluation of killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis* by time-kill assays**

Sandra Gil-Alonso<sup>1,2</sup>, Nerea Jauregizar<sup>2</sup>, Emilia Cantón<sup>3</sup>, Elena Eraso<sup>1</sup> and Guillermo Quindós<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain

<sup>3</sup>Instituto Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

\*Corresponding author. Tel: +34 94 601 2854; Fax: +34 94 601 3495; E-mail: guillermo.quindos@ehu.es

**Abstract**

**Objectives:** To compare the antifungal activities of echinocandins against 3 *C. parapsilosis*, 2 *C. metapsilosis* and 2 *C. orthopsilosis* strains by time-kill (TK) methodology.

**Methods:** TK studies were performed in RPMI 1640 medium (200 µL, inoculum 1-5 x 10<sup>5</sup> CFU/mL). The number of cfu/mL was determined at 0, 2, 4, 6, 24 and 48 h. Concentrations assayed were 0.25, 2 and 8 mg/L, which are achieved in serum.

**Results:** Anidulafungin required between 25.4 to 29.35 h to reach the fungicidal endpoint (99.9% killing) in the three species and isolates assayed, but against the clinical isolate of *C. orthopsilosis*, > 48 h (8 mg/L) was needed. However, caspofungin fungicidal endpoint was only reached in one isolate of *C. metapsilosis* and after 30.13 h with the highest concentration. Micafungin also reached the fungicidal endpoint with 8 mg/L between 23.51 to 28.17 h in one isolate each of *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* and in the two isolates of *C. metapsilosis*.

**Conclusions:** Our study suggests that *C. metapsilosis* is the most susceptible to echinocandins, followed by *C. orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. Although MICs were similar for the three species, differences in killing activity were observed among species, isolates and echinocandins. Correct identification of these cryptic species and TK studies would be recommendable to get a more adequate therapeutic approach of invasive infections caused by the *C. parapsilosis* clade.

**Running title:** Fungicidal activities of echinocandins against *C. parapsilosis* complex

## Introduction

Invasive candidiasis is an important cause of morbidity and mortality worldwide.

Although *Candida albicans* remains the most common aetiology, the incidence of infections due to non-*C. albicans* species is increasing<sup>1</sup>. Among these species, *Candida parapsilosis* is emerging as a relevant cause of candidaemia in both adults and children, being the second or third most frequent depending on the geographical localization<sup>1,2</sup>. Moreover, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* are newly recognized members of *C. parapsilosis* clade<sup>3</sup>. These three species show substantial differences in antifungal susceptibility and virulence and their epidemiology a matter of increased interest<sup>3-5</sup>.

Anidulafungin, caspofungin and micafungin, inhibit 1,3- $\beta$ -D-glucan synthesis, causing fungistatic as well as fungicidal effects. Echinocandins are front line antifungal agents for the therapy of invasive candidiasis. Although the similar mechanism of action and chemical structure, there are subtle differences among the echinocandins in terms of in vitro activity for many *Candida* species<sup>6</sup>. The aim of our study was to compare the in vitro anidulafungin, caspofungin and micafungin activity at therapeutic concentrations, against *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* by time-kill (TK) curves.

## Materials and methods

### *Antifungal drugs*

Caspofungin (Merck Sharp & Dohme, Madrid, Spain), micafungin (Astellas Pharma Madrid, Spain) and anidulafungin (Pfizer SLU, Madrid, Spain) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock solution of 5120 mg/L. Further dilutions were prepared in RPMI 1640 medium with L-glutamine and without NaHCO<sub>2</sub> buffered to pH 7 with 0.165 M MOPS (RPMI) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Stock solutions were stored at – 80 °C until use.

### *Isolates*

Seven *C. parapsilosis* complex isolates were included in this study: 3 *C. parapsilosis sensu stricto* (1 bloodstream isolate -UPV/EHU 09-378- and 2 reference strains -ATCC 22019 and ATCC 90018-); 2 *C. metapsilosis* (1 blood isolate -UPV/EHU 07-045- and the reference strain -ATCC 96143-); 2-*C. orthopsilosis* (1 blood isolate -UPV/EHU 07-035- and the reference strain -ATCC 96139-). Clinical bloodstream isolates were obtained from the fungal strain culture collection of the Laboratorio de Micología Médica, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Bilbao, Spain. Isolates were identified by metabolic properties (ATB ID 32C, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and by molecular methods, as previously described <sup>7,8</sup>.

### *In vitro susceptibility testing*

MICs, defined as minimum concentrations that produce  $\geq 50$  growth reduction, were determined following the CLSI M27-A3 and M27-S4 documents<sup>9,10</sup>. All MICs were measured in RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS and results were read after 24 h of incubation.

### *TK curves*

Before TK studies were performed, the antifungal carryover effect was determined as described by Cantón et al.<sup>11</sup>. Studies were carried out as previously described<sup>12-15</sup> on microtitre plates for the computer-controlled microbiological incubator (BioScreen C MBR, LabSystems, Vantaa, Finland) in RPMI (final volume 200  $\mu$ L) by using an inoculum size of  $1-5 \times 10^5$  cfu/mL. Antifungal drug concentrations assayed were 0.25, 2 and 8 mg/L. Echinocandins concentrations were chosen taking into account their MICs for the studied isolates. Additionally, these concentrations are commonly reached in serum after standard therapeutic doses<sup>16</sup>. Plates were incubated 48 h at  $36 \pm 1$  °C without agitation. At predetermined time points (0, 2, 4, 6, 24, and 48 h), 10  $\mu$ l (0-6 h) or 6  $\mu$ l (24-48 h) were removed from both the control well and each test solution well and serially diluted in PBS to determine the number of cfu/mL. Volumes of 5, 10, 50 or 100  $\mu$ L (depending on the dilution and concentration of the drug) were plated onto Sabouraud dextrose agar (SDA) and incubated at  $36 \pm 1$  °C for 24 to 48 h. When the colony counts were expected to be less than 200 cfu/mL, 5  $\mu$ L samples were taken directly from the test solution and plated. The lower limit of

accurate and reproducible detectable colony counts was 200 cfu/mL. TK studies were conducted in duplicate and on two different days.

### *Data analysis*

The killing kinetics of the fungicidal activity were analyzed by fitting the TK data at each time point to the exponential equation  $N_t = N_0 \times e^{kt}$ , which was transformed into a line by applying logarithms [ $\log N_t = \log N_0 + Kt$ ], where  $N_t$  is the number of viable yeast cells at time  $t$ ,  $N_0$  is the starting inoculum,  $K$  is the killing or growing rate, and  $t$  is the incubation time. Thus, the six time points on each killing curve were reduced to one value,  $K$ . The goodness of fit for each isolate/drug was assessed by the  $r^2$  value ( $> 0.8$ ). The mean times to achieve reductions in viable cells of 50% ( $t_{50} = 0.30103/K$ ), 90% ( $t_{90} = 1/K$ ), and 99% ( $t_{99} = 2/K$ ), and the time to reach the fungicidal endpoint ( $t_{99.9} = 3/K$ ) were calculated from the  $K$  value. Fungicidal activities were compared by use of  $K$  values: positive values indicate growth and negative values indicate killing. Analysis of variance was performed to determine significant differences in killing kinetics among species, echinocandins and concentrations. A  $p$  value  $> 0.05$  was considered significant.

### **Results**

Caspofungin was the most active echinocandin against *C. parapsilosis sensu stricto* followed by micafungin and anidulafungin (geometric mean MIC (GM MIC)-: 1.25, 1.58 and 1.58 mg/L, respectively). However, anidulafungin was the most active

against *C. metapsilosis*, followed by caspofungin and micafungin (GM MIC: 1, 1.41 and 2 mg/L, respectively). Against *C. orthopsilosis* the most active were anidulafungin and micafungin followed by caspofungin (GM MIC: 1, 1 and 1.41 mg/L, respectively). No antifungal carryover effect was detected in TK studies. The mean TK curves and standard deviations of the three echinocandins are depicted in Figure 1. Killing activities of anidulafungin, caspofungin and micafungin were species- and isolate-dependent ( $p > 0.01$ ) and increased with time. All echinocandins were more active against *C. metapsilosis* than against *C. orthopsilosis* or *C. parapsilosis*.

Anidulafungin reached the mean maximum log decreases ( $> 3.5$  log) in CFU with 8 mg/L against the three species of the *C. parapsilosis* clade, except for one isolate each of *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* that was reached with 2 mg/L. It must be noted that against the isolate *C. orthopsilosis* UPV/EHU 07-035, the fungicidal endpoint was not reached.

With caspofungin, the fungicidal endpoint (99.9% killing) was only reached against *C. metapsilosis*, with 8 mg/L, maximum log decrease in cfu/mL being  $5.24 \pm 0.07$  log. Caspofungin did not display fungicidal activity against the rest of strains.

A concentration of 8 mg/L of micafungin was fungicidal for one isolate of *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and one isolate of *C. parapsilosis*. The log decreases of *C. metapsilosis* were higher than those of *C. orthopsilosis* ( $5.33 \pm 0.12$  log vs.  $3.6 \pm 2.52$  log).

In Figure 2 we can visualize the effect of echinocandin concentration on the killing rates for *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. Against *C. parapsilosis* and *C. metapsilosis*, the highest killing rates were obtained with anidulafungin, respectively, and these were significantly higher than those of micafungin and caspofungin ( $p > 0.001$ ). In the case of *C. orthopsilosis*, anidulafungin and caspofungin showed similar killing rates with 2 mg/L and were higher than that of micafungin, but with 8 mg/L the killing rates of anidulafungin and micafungin were similar and higher than that observed with caspofungin. Table 1 shows the mean times needed to reach the fungicidal endpoint (99.9% lethality) for each isolate and echinocandin concentration. Anidulafungin required 8 mg/L and between 13.34 to 29.67 h to reach this point against the three species,. However, the killing of the clinical isolate of *C. orthopsilosis* required more than 48 h. By contrast, the caspofungin fungicidal endpoint was only reached in one isolate of *C. metapsilosis* and after 30.12 h. Micafungin achieved the fungicidal endpoint with 8 mg/L after 12.74-28.38 h against one isolate each of *C. parapsilosis* and *C. Orthopsilosis*, against both isolates of *C. metapsilosis*.

## Discussion

Recent findings suggest that *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* are clinically relevant *Candida* spp. Lockhart et al. <sup>5</sup> reported that among 1,929 bloodstream infections, isolates presumed to be *C. parapsilosis*, 91.3% were *C. Parapsilosis sensu stricto*, 6.1%



were *C. orthopsilosis*, and 1.8% *C. metapsilosis*. The percentage of presumed *C. parapsilosis* isolates found to be *C. orthopsilosis* varied greatly by region, with the highest percentage (10.9%) from South America and the lowest (0.7%) from Africa. In recent study performed in Spain, on the prevalence of *C. parapsilosis sensu lato*, 74.4% of clinical isolates were *C. parapsilosis sensu stricto*, 23.54% were *C. orthopsilosis*, and 2.05% *C. metapsilosis*<sup>17</sup>. Moreover, in other Spanish multicentre study, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* were the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> most common bloodstream *Candida* isolates (1.4 and 1.7 % prevalence, respectively)<sup>18</sup>.

Echinocandins MICs are similar for those reported for the three species<sup>8, 17, 19, 20</sup>.

Although caspofungin MICs should be cautiously interpreted because an important variability in modal MICs have been reported<sup>21</sup>. Despite of the clinical importance of

*C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*, few studies have evaluated the fungicidal activities of echinocandins by TK methodology<sup>22-25</sup> and only two studies have head-to-head compared the activity of the echinocandins by TK curves<sup>19, 26</sup>.

Moreover, most TK studies have usually included a low number of isolates very similar to the number of strains in the current study<sup>12, 13, 27, 28</sup>. We have compared

killing activity of the echinocandins against *C. parapsilosis* complex up to 48 h and at therapeutic concentrations, providing new results about killing patterns and

expanding information on the activities of echinocandins against the *C. parapsilosis*

clade. Canton et al., studied fungicidal activities of echinocandins against four strains of *C. parapsilosis*, three of *C. metapsilosis* and four of *C. orthopsilosis*; they concluded

that *C. metapsilosis* was the most susceptible species followed by *C. orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. Micafungin and anidulafungin had similar killing rates, both being greater than those of caspofungin, and against *C. parapsilosis*, the authors have observed that none of the drugs reached the fungicidal endpoint<sup>26</sup>. Our current findings are similar to those seen by Canton et al., the highest killing rates of our study have been observed for *C. metapsilosis*, followed by *C. orthopsilosis*; caspofungin is also the least active against the three species, and anidulafungin the most active. Despite that *C. parapsilosis* was the least susceptible of the three species, fungicidal activity was found with anidulafungin and micafungin at 8 mg/L (therapeutic concentration achieved in serum). In our study the fungicidal endpoints, against the three species with all echinocandins, were achieved with concentrations achieved in patients' serum using the current regimen of dosification.

In a study in which the fungicidal activity of echinocandins was determined at concentration of 2 and 32 mg/L against four strains of *C. parapsilosis*, three strains of *C. metapsilosis* and four strains of *C. orthopsilosis*, killing curves showed that anidulafungin and micafungin were fungicidal against *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*, but caspofungin was fungicidal against *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*, but not against *C. parapsilosis*<sup>19</sup>. These results are consistent with those previously published by Canton et al.<sup>13</sup>; however, our results are only partially in agreement, because anidulafungin showed fungicidal activity against all *C. parapsilosis* tested, and micafungin showed fungicidal activity against one strain of

*C. parapsilosis*. Furthermore, Spreghini et al. evaluated the activity of echinocandins in presence of serum, and concluded the addition of serum reduced the fungicidal effects against the studied species. The repercussion of protein binding on the in vitro killing should be very similar for the three echinocandins as the protein binding is > 96% for all of them <sup>29</sup>.

A previous study on caspofungin activity against *C. parapsilosis* (n=4), *C. orthopsilosis* (n=2) and *C. metapsilosis* (n=2) has shown that caspofungin had a fungicidal effect at 16 mg/L against *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, and a fungistatic effect against *C. parapsilosis* <sup>25</sup>. We did not observe fungicidal activity with concentrations  $\leq$  8 mg/L of caspofungin against *C. orthopsilosis*. Similar to a previous report, in which the killing activity of micafungin was evaluated against several *Candida* species, the authors demonstrated the fungicidal activity against *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* at  $\geq$  2-8 MIC concentrations after 48 h <sup>24</sup>, data from our study corroborates these reports, however, the fungicidal activity of micafungin in our study was reached earlier against several isolates.

Szabó et al. reported that fluconazole and voriconazole, but not posaconazole, seem to be less active in vitro against *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, than against *C. parapsilosis* <sup>30</sup>.

We could conclude that anidulafungin was the most active against *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and both anidulafungin and micafungin displayed the same killing activity against *C. orthopsilosis*; caspofungin was the echinocandin that showed the

least killing activity. Our study suggests that *C. metapsilosis* is the most susceptible species, followed by *C. orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. While the MIC values of echinocandins were similar for the three species, differences in fungicidal activity were observed among isolates, species, and echinocandins. This fact highlights the importance for a correct identification and acquaintance of the antifungal susceptibility patterns of these cryptic species for an adequate therapeutic approach for the infections caused by the *C. parapsilosis* clade.

## **Acknowledgements**

### ***Funding***

This work was supported by Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (S-PR12UN002, S-PE13UN121) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI11/00203), and UPV/EHU (UFI 11/25). S.G.A. had a scholarship from the Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).

### **Transparency declarations**

In the past 5 years, E.E. has received grant support from Astellas Pharma, and Pfizer SLU. G.Q. has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Pfizer

SLU, Schering Plough and Merck Sharp and Dohme. He has been an advisor/consultant to Merck Sharp and Dohme, and has been paid for talks on behalf of Astellas Pharma, Esteve Hospital, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer SLU, and Schering Plough.

## References

1. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 2014; **31**: 42-8.
2. Pemán J, Cantón E, Minana JJ et al. Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: Results from the FUNGEMYCA study. *Rev Iberoam Micol.* 2011; **28**: 91-9.
3. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005; **43**: 284-92.
4. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: Six years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008; **46**: 150-6.
5. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA et al. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2008; **46**: 2659-64.
6. Mukherjee PK, Sheehan D, Puzniak L et al. Echinocandins: Are they all the same? *J Chemother.* 2011; **23**: 319-25.

7. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011; **66**: 2315-22.
8. Pemán J, Cantón E, Quindós G et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2012; **67**: 1181-7.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3 S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth International Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2012.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2008.
11. Cantón E, Pemán J, Valentín A et al. In vitro activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; **53**: 3108-11.

12. Cantón E, Pemán J, Hervas D et al. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitaniae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother.* 2013; **68**: 864-8.
13. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J et al. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; **54**: 2194-7.
14. Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E et al. Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; **82**: 57-61.
15. Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E et al. In vitro fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida glabrata*, *candida bracarensis* and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; doi:10.1128/AAC.04474-14.
16. González M, Montejo Gonzalez JC. Anidulafungin: A new therapeutic approach in antifungal therapy. Pharmacology of anidulafungin. *Rev Iberoam Micol.* 2008; **25**: 92-100.
17. García-Effron G, Cantón E, Pemán J et al. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis sensu lato* species isolated from bloodstream infections at a spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2012; **67**: 2739-48.



18. Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez D et al. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; **52**: 1506-9.
19. Spreghini E, Orlando F, Tavanti A et al. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; **67**: 2195-202.
20. Cantón E, Pemán J, Quindós G et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; **55**: 5590-6.
21. Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA et al. Interlaboratory variability of caspofungin MICs for *Candida* spp. using CLSI and EUCAST methods: Should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; **57**: 5836-42.
22. Varga I, Soczo G, Kardos G et al. Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2008; **62**: 1466-8.

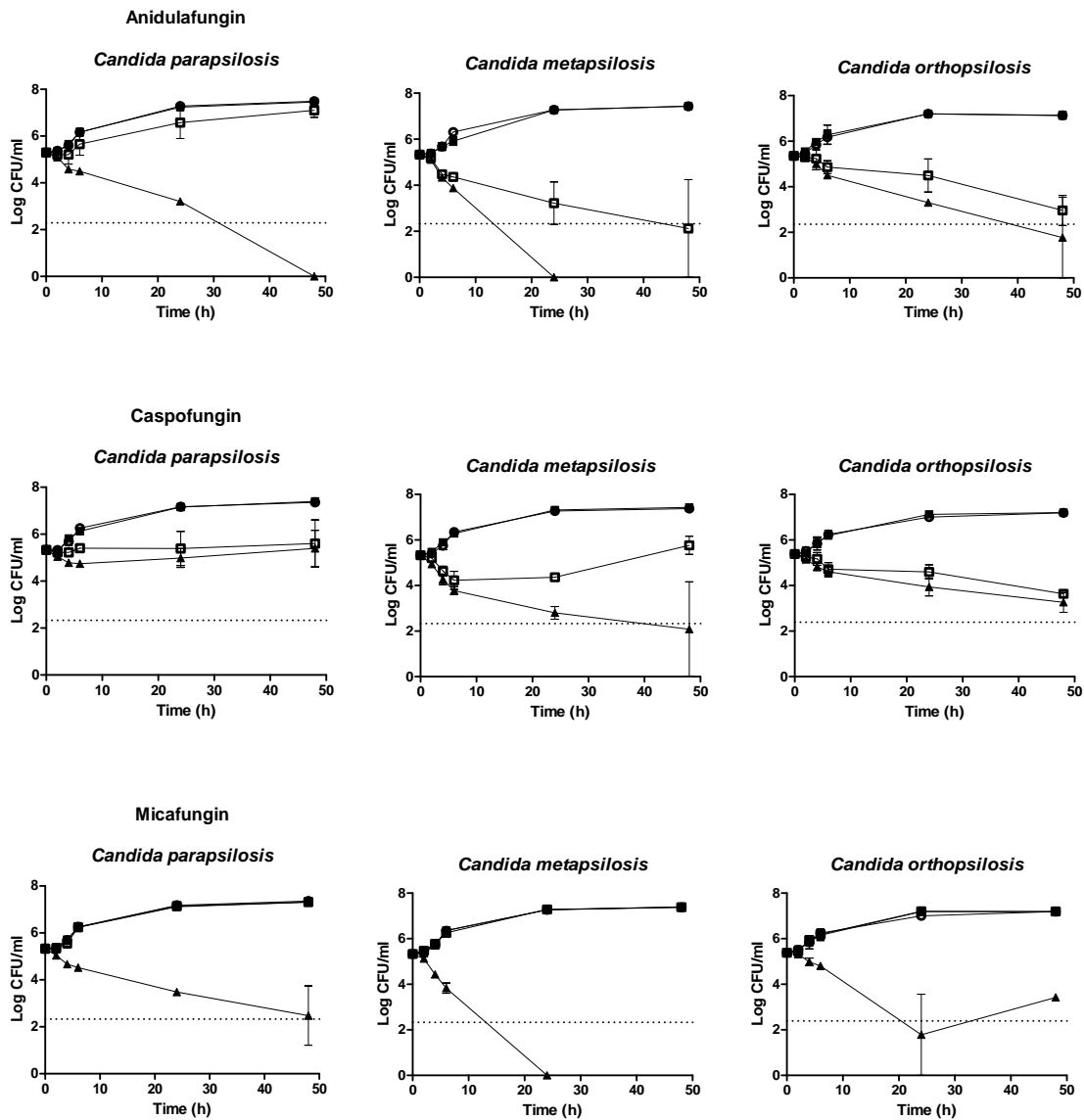
23. Foldi R, Kovacs R, Gesztelyi R et al. Comparison of in vitro and vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia*. 2012; **174**: 311-8.
24. Foldi R, Szilagyi J, Kardos G et al. Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; **73**: 338-42.
25. Szilagyi J, Foldi R, Bayegan S et al. Effect of nikkomycin Z and 50% human serum on the killing activity of high-concentration caspofungin against *Candida* species using time-kill methodology. *J Chemother*. 2012; **24**: 18-25.
26. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J et al. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; **54**: 2194-7.
27. Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR et al. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; **46**: 3846-53.
28. Foldi R, Kovacs R, Gesztelyi R et al. Comparison of in vitro and vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia*. 2012; **174**: 311-8.

29. Elefanti A, Mouton JW, Krompa K et al. Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against *Aspergillus* species in the presence of serum. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; **57**: 1625-31.
30. Szabo Z, Szilagyi J, Tavanti A et al. In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; **64**: 283-8.

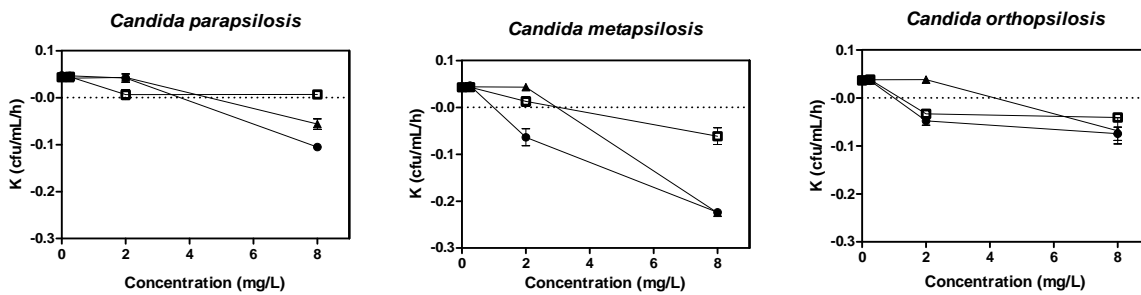
**Table 1** Time (h) to achieve 99.9% ( $t_{99.9}$ ) growth reduction from the initial inoculum

Drug Parameter	Anidulafungin			Caspofungin			Micafungin		
	$t_{99.9}$			$t_{99.9}$			$t_{99.9}$		
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.25	2	8	0.25	2	8	0.25	2	8
<i>C. parapsilosis</i>									
ATCC 22019	NA	NA	29.67	NA	NA	NA	NA	NA	> 48
ATCC 90018	NA	NA	27.75	NA	NA	NA	NA	NA	> 48
UPV/EHU 09-378	NA	NA	28.22	NA	> 48	> 48	NA	NA	28.38
<i>C. metapsilosis</i>									
ATCC 96143	NA	27.5	13.46	NA	NA	> 48	NA	NA	13.15
UPV/EHU 07-045	NA	> 48	13.34	NA	NA	30.12	NA	NA	13.54
<i>C. orthopsilosis</i>									
ATCC 96139	NA	48	28	NA	> 48	> 48	NA	NA	12.74
UPV/EHU 07-035	NA	> 48	> 48	NA	> 48	> 48	NA	NA	> 48

NA, not achieved



**Figure 1.** Mean time-kill plots for anidulafungin, caspofungin and micafungin against three *C. parapsilosis*, two *C. metapsilosis* and two *C. orthopsilosis* strains. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars) for the indicated number of isolates. Open circles ( $\circ$ ): control; filled squares ( $\blacksquare$ ): 0.25 mg/L; open squares ( $\square$ ): 2 mg/L; filled triangles ( $\blacktriangle$ ): 8 mg/L. The broken lines represents  $\geq 99.9\%$  growth reduction compared with that of the initial inoculum (fungicidal effect).



**Figure 2** Effect of concentration on killing rates of anidulafungin, caspofungin and micafungin. Open circles (○): anidulafungin; filled squares (■): caspofungin; open triangles (△): micafungin. Values above the broken lines indicate growth and values below the broken lines indicate killing.

- ESTUDIO 4 -

**Evaluación del PAFE de anidulafungina contra los  
complejos de especies *C. albicans* y *C. parapsilosis***

(International Journal of Antimicrobial Agents 2015; 46: en revisión)





La anidulafungina causó un PAFE prolongado contra *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* con una concentración de 2 µg/ml, ( $42,16 \pm 1,54$ ;  $37,6 \pm 11$  y  $35,65 \pm 2,9$  h, respectivamente) (Tabla 2 y Figura 1 del manuscrito). Además, el PAFE con 2 µg/ml de anidulafungina fue  $\geq 33,6$  h contra 13 de las 14 cepas ensayadas del complejo *C. albicans*. Con 0,5 µg/ml de anidulafungina el PAFE fue prolongado contra cinco cepas ( $p < 0,0001$ ).

En la Tabla 2 del manuscrito se puede observar que el PAFE de la anidulafungina fue fungistático contra todas las cepas y fungicida contra dos cepas: una *C. albicans* y otra *C. dubliniensis*. El cociente PAFE/*time-kill* (porcentaje de muerte celular atribuible al PAFE) fue 100 con 2 µg/ml de anidulafungina en 6 de la 14 cepas del complejo *C. albicans* (51,13 contra todo el complejo), lo que indica que después de una hora de exposición al fármaco antifúngico, y su posterior retirada, se observaba el mismo efecto que estando presente el fármaco.

En la Tabla 3 del manuscrito se observa el PAFE prolongado y significativo ( $p < 0,0001$ ) de la anidulafungina contra las especies del complejo *C. parapsilosis*. Anidulafungina a una concentración de 8 µg/ml mostró un PAFE durante  $29,73 \pm 21,25$ ; 44 y  $43 \pm 1,41$  h contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, respectivamente (Tabla 3 y Figura 2 del manuscrito). No hubo diferencias entre especies dentro del complejo *C. parapsilosis*. Este PAFE fue fungistático contra todas las cepas del complejo y candidacida contra una cepa de *C. metapsilosis*. El cociente PAFE/*time-kill* medio fue de 14,52 con 8 µg/ml de anidulafungina (en 2 de las 7 cepas, este valor fue de 100).



**Postantifungal effect of anidulafungin against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida africana*, *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis***

Sandra Gil-Alonso<sup>a,b</sup>, Nerea Jauregizar<sup>b</sup>, Elena Eraso<sup>a</sup>, and Guillermo Quindós<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar «Microbios y Salud» (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España,

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar «Microbios y Salud» (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España

\*Corresponding author: Dr. Guillermo Quindós, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología (UFI 11/25 «Microbios y Salud»), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Apartado 699, E-48080 Bilbao, Spain. Tel.:+34 94 601 2854; Fax: +34 94 601 3495; E-mail: guillermo.quindos@ehu.eus

## Abbreviations

PAFE: Postantifungal effect

TK: Time-kill

SDA: Sabouraud dextrose agar

MOPS: Morpholinepropanesulfonic acid

DMSO: Dimethyl sulfoxide

PBS: Phosphate buffered saline

UPV/EHU: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

CFU: Colony forming units

## Keywords

Postantifungal effect, anidulafungin, *Candida albicans* clade, *Candida parapsilosis* clade, time-kill

## Abstract

*Candida albicans* remains the most common fungal pathogen, nevertheless the incidence of candidiasis due to non-*C. albicans* species, such as *Candida parapsilosis*, is increasing. Postantifungal effect (PAFE) may have clinical relevance to the design of dosing regimens for anidulafungin and other echinocandins. We performed time-kill and PAFE tests with anidulafungin against *C. albicans* (including *C. albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana*) and *C. parapsilosis* clades (including *C. parapsilosis*, *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*). For PAFE studies, yeasts were exposed to anidulafungin for 1 h at concentrations ranging from 0.12 to 8 mg/L. Time-kill experiments were conducted at the same concentrations. Samples were removed at determinate reading points and viable cell counted. Anidulafungin time-kill and PAFE were concentration and species dependent. Anidulafungin was fungicidal against 5 out of 14 (36%) strains of *C. albicans* clade in the time-kill experiments. PAFE fungicidal endpoint was achieved against 2 out of 14 (14%) strains. Moreover, 2 mg/L of anidulafungin showed a prolonged PAFE ( $\geq 33.6$  h) for 13 out of 14 (93%). In the time-kill experiments, 8 mg/L of anidulafungin were fungicidal against 6 out of 7 (86%) strains of *C. parapsilosis* clade. In PAFE experiments, fungicidal endpoint was achieved against 1 out of 7 (14%) and 8 mg/L of anidulafungin, being PAFE prolonged ( $\geq 42$  h) for 6 out of 7 (86%) strains. In conclusion, anidulafungin showed a significant and prolonged PAFE against *C. albicans* and *C. parapsilosis* clades.

## 1. Introduction

Invasive candidiasis is a significant worldwide cause of morbidity and mortality, especially among patients with severe immunosuppression. Most *Candida* bloodstream infections are caused by five species of *Candida*: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. Although *C. albicans* remains the most common in clinical samples, the incidence of candidiasis due to non-*C. albicans* species is increasing [1]. *C. albicans* and *C. parapsilosis* have closely related species, such as *Candida dubliniensis* and *Candida africana* (in *C. albicans* clade) or *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* (in *C. parapsilosis* clade). Studies on distribution and antifungal susceptibility profiles of these cryptic *Candida* species are scarce [2], with differences and variability among *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* [3], and *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* [4-6].

Anidulafungin is an echinocandin that displays fungicidal activity against most isolates of *Candida* by inhibiting beta-(1, 3)-D-glucan synthase, an essential enzyme for the synthesis of the *Candida* cell wall [7]. However, there are a few number of reports on *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* and *C. krusei* isolates with decreased susceptibility to anidulafungin [1,5,7]. Postantifungal effect (PAFE) describes how long an antifungal drug continues acting after it has been removed. This effect may be relevant for antifungal therapy when new drugs are used and may be clinically relevant to establish dosage schedules. The existence of PAFE depends on both the fungal species and the class of the antifungal drug. The aim of this study

has been to evaluate PAFE of anidulafungin against clinical isolates and reference strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis* clades.

## 2. Materials and methods

**2.1. Microorganisms.** Twenty one *Candida* isolates from the culture collection of the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Bilbao, Spain, were included in this study. Fourteen isolates from *C. albicans* clade (5 blood isolates of *C. albicans* and 2 reference strains, NCPF 3153 and NCPF 3156; 4 *C. dubliniensis* blood isolates and 1 reference strain, NCPF 3949; 1 clinical vaginal isolate of *C. africana* and 1 reference strain, ATCC 2669) and 7 isolates from *C. parapsilosis* clade (1 clinical bloodstream isolate and 2 reference strains of *C. parapsilosis sensu stricto*, ATCC 22019 and ATCC 90018; 1 blood isolate and 1 reference strain of *C. metapsilosis*, ATCC 96143; 1 blood isolate and 1 reference strain of *C. orthopsilosis*, ATCC 96139). Isolates were identified by their metabolic properties (ATB ID 32C, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and by molecular methods, as previously described [8,9].

**2.2. Antimicrobial agents.** Anidulafungin (Pfizer SLU, Madrid, Spain) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock solution of 5120 mg/L. Further dilutions were obtained in RPMI 1640 medium with L-glutamine and without NaHCO<sub>2</sub> buffered to pH 7 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Stock solutions were stored at – 80 °C until use.

2.3. *In vitro* susceptibility testing. Minimum concentrations that produce  $\geq 50$  growth reductions (MICs) after 24 h of incubation were determined according to the M27-A3 S4 document [10].

2.4. *Time-kill procedures*. Time-kill studies (TK) were performed as previously described [11-14]. Isolates and strains were subcultured on Sabouraud dextrose agar plates (SDA) prior to testing to ensure purity. Fungal suspensions were prepared in sterile water by picking 3 to 5 colonies from a 24 h culture. Resulting suspension was prepared at 1 McFarland ( $\approx 10^6$  CFU/mL) and 1 mL was added to vials containing 9 mL of RPMI. TK were carried out on microtitre plates for the BioScreen C computer-controlled microbiological incubator (BioScreen C MBR, LabSystems, Helsinki, Finland) in RPMI (final volume 200  $\mu$ L) by using an inoculum of  $1-5 \times 10^5$  cells/mL. Anidulafungin concentrations tested took into account the echinocandin MICs for the isolates: 0.12, 0.5 and 2 mg/L for *C. albicans* clade and 0.25, 2 and 8 mg/L for *C. parapsilosis* clade. Inoculated plates were incubated during 48 h at  $36 \pm 1$  °C. At 0, 2, 4, 6, 24, and 48 h, 10  $\mu$ L (0-6 h) or 6  $\mu$ L (24-48 h) were collected from each culture well, including control and test solution wells, serially diluted in phosphate buffered saline (PBS) and aliquots plated onto SDA. The lower limit of accurate and reproducible detectable colony forming units (CFU) counts was 200 CFU/mL. When the CFUs were expected to be less than 200 per mL, 5  $\mu$ L were taken directly from the test solution and plated. After incubation of the plates at  $36 \pm 1$  °C for 48 h, *Candida* colonies were counted. Each experiment was performed twice for each isolate. Plots



of averaged colony counts ( $\log_{10}$  CFU/mL) versus time were constructed and compared against a growth control (in the absence of drug). Also the antifungal carryover effect was determined as formerly reported [15].

*2.5. Postantifungal effect.* PAFE was detected as previously described with slight differences [16]. Standard 1 McFarland turbidity fungal suspensions were prepared in sterile distilled water, from which 1 mL was added to 9 mL of RPMI.

Anidulafungin concentrations were the same as described for the TK. After 1 h of incubation, anidulafungin was removed by a process of 3 cycles of repeated centrifugations (at 2000 rpm, 10 min) and washed with PBS. After the final centrifugation, the fungal pellet was suspended in 600  $\mu$ L of RPMI. All samples were incubated on microtitre plates for the BioScreen C at  $36 \pm 1$  °C, with a final volume of 200  $\mu$ L. At the same predetermined time points described previously for TK and following the same procedure, samples were serially diluted in PBS and inoculated onto a SDA plate for CFU counting. PAFE was calculated for each isolate as the difference in time required for control (in the absence of drug) and treated isolates to grow 1  $\log_{10}$  following drug removal. PAFE was therefore determined using the following equation:  $PAFE = T - C$ , where T = time required for counts in treated cultures to increase by 1  $\log_{10}$  unit above that seen following drug removal and C = time required for counts in control to increase by 1  $\log_{10}$  unit above that following the last washing [17,18].

Fungicidal activity was described as a growth reduction  $\geq 3 \log_{10}$  (99.9%), and fungistatic activity was defined as a reduction  $< 99.9\%$  in CFU from the starting inoculum size [19]. Plots of averaged colony counts (log CFU per mL) versus time were constructed and compared against a growth control. The ratios of the log killing during PAFE experiments to the log killing during TK experiments were calculated [20,21]. TK and PAFE experiments were performed at the same time.

*2.7. Statistical analysis.* Analysis of variance was performed to determine significant differences in PAFE (in hours) among species and concentrations, using GraphPad Prism™ 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA; USA). A  $p$  value  $< 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

No antifungal carryover effect was detected in TK. Anidulafungin MICs for isolates from *C. albicans* and *C. parapsilosis* clades are summarized in Table 1. The results of TK and PAFE for *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* are shown in Table 2.

Anidulafungin exhibited a prolonged and significant PAFE ( $\geq 33.6$  h) for most strains of *C. albicans* clade (13 out of 14, 93%) with 2 mg/L ( $p < 0.0001$ ), when compared with controls. Even 5 out of 14 (36%) of these strains achieved the same effect with  $\leq 0.5$  mg/L of anidulafungin. In the TK experiments, 2 mg/L of anidulafungin were fungicidal against 5 out of 14 (36%) strains of *C. albicans* clade (NCPF 3156, UPV/EHU 99-101, 99-102, 99-105 and *C. dubliniensis* UPV/EHU 00-135); ranging the extent of

anidulafungin log-killing from 0.05 to 5.17 log. After the anidulafungin removal in PAFE experiments, fungicidal endpoint was achieved against 2 out of 14 (14%) strains of *C. albicans* clade (UPV/EHU 99-101 and *C. dubliniensis* UPV/EHU 00-135). Anidulafungin log-killing in PAFE ranged from 0.03 to 4.91 log with 2 mg/L. The mean value of PAFE/TK ratio was 51.13 (with 2 mg/L) for *C. albicans* clade. Against 6 out of 14 strains (43%), the PAFE/TK ratio of anidulafungin was 100 (with  $\leq 2$  mg/L), indicating that 1-hour exposure to anidulafungin accounted for up to 100% of the overall killing observed during TK (Table 2).

Table 3 summarizes the results of TK and PAFE experiments for *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. A significant and prolonged PAFE ( $\geq 42$  h) for 6 out of 7 (86%) strains of *C. parapsilosis* clade was observed with 8 mg/L of anidulafungin ( $p < 0.0001$ ). In TK experiments, the same concentration of anidulafungin was fungicidal against 6 out of 7 (86%) strains from the *C. parapsilosis* clade and fungistatic against 1 strain of *C. orthopsilosis*. The extent of log-killing in TK with the highest concentration evaluated of anidulafungin ranged from 2.06 to 5.39. In PAFE experiments, fungicidal endpoint was achieved only against 1 strain (*C. metapsilosis* UPV/EHU 07-045). The extent of anidulafungin log-killing in PAFE reached to 5.38 log (with 8 mg/L). The mean value of PAFE/TK ratio was 14.52 (with 8 mg/L) for *C. parapsilosis* clade. Against 2 out of 7 strains (29%), the PAFE/TK ratio of 8 mg/L of anidulafungin was 100, indicating that 1-hour exposure to anidulafungin accounted for up to 100% of the overall killing observed during TK (Table 3).

Mean PAFE for *C. albicans* clade ( $39.6 \pm 26.81$  h) did not differ from *C. parapsilosis* clade ( $37.6 \pm 14.32$  h) with 8 mg/L of anidulafungin (Figs. 1 and 2).

#### 4. Discussion

The incidence of invasive candidiasis continues to rise over the last two decades.

*C. albicans* and *C. parapsilosis* are the most frequent etiological agents in Spain and many Mediterranean and Latin-American countries [1-4]. These species are not homogeneous, and both clades included cryptic species, such as *C. dubliniensis* and *C. africana* (*C. albicans* clade), or *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* (*C. parapsilosis* clade). Antifungal susceptibility profiles of these cryptic species are not similar; and echinocandins activities show significant variability among *C. parapsilosis sensu lato* isolates [3,8,9,11]. Antifungal therapy is a critical component of patient management for acute diseases, because the scarce number of antifungal agents and the potential resistance of some *Candida* species. Echinocandins are now the preferred choice to treat a range of candidiasis [22].

PAFE may have clinical relevance in the design of dosing regimens for antifungal agents as it is an important factor in both dose interval choice and outcome. TK and PAFE experiments of anidulafungin against *Candida* have not been widely evaluated and most studies include a low number of isolates [16,18,23].

To our knowledge, this is the first study that shows and compares the PAFE of anidulafungin against cryptic species of *C. albicans* and *C. parapsilosis* clades.

Anidulafungin MICs were consistent with those reported in other studies [24]. In the current study, anidulafungin exerted fungicidal activity in TK studies against most strains of *C. parapsilosis* clade (6 out of 7 strains) but this activity was lower against *C. albicans* clade (5 out of 14 strains). Smith et al. also reported fungicidal activity of anidulafungin against *C. glabrata* and *C. parapsilosis* at similar concentrations [18]. Nguyen et al. evaluated the anidulafungin PAFE against several *Candida* species, reporting that fungicidal activity was only reached against 1 out of 4 strains of *C. albicans* but this drug was candidacidal against 3 out of 3 strains of *C. parapsilosis* [23].

Anidulafungin PAFEs against *Candida* have been evaluated in very few studies. Smith et al. studied the PAFEs of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, concluding that PAFEs of anidulafungin and caspofungin were longer than those of micafungin; and anidulafungin and caspofungin PAFEs against *C. glabrata* were greater than PAFE for *C. parapsilosis* [18]. In the present study, a prolonged PAFE ( $\geq 42$  h) against all strains of *C. parapsilosis*, with 8 mg/L of anidulafungin, except for one strain, was observed. Similarly, Smith et al. observed a PAFE  $> 24$  h against in two strains of *C. parapsilosis* with 1 or 2 mg/L of anidulafungin [18]. However, we observed a shorter PAFE ( $\leq 5.7$  h) in 3 out of 7 strains of *C. parapsilosis* with 2 mg/L of anidulafungin. PAFE was determined after 1 h exposure in most studies [18,23,25], so we did not tested shorter or longer exposures to this antifungal drug. Shields et al. have evaluated the impact of brief

exposures of caspofungin on PAFE in *C. albicans* isolates observing maximum values with 5 or 15 min exposures to this drug [26]. However, the current study is the first one that compares the intra-clade differences. Of interest, all tested concentrations in the current study are easily achievable in serum after standard dosing of anidulafungin [27].

Other authors have also observed prolonged PAFE against *C. albicans* and *C. parapsilosis* with the two other echinocandins, caspofungin and micafungin. Nguyen et al. [21] observed fungicidal activity against *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*, after 1 hour of micafungin exposure. Clancy et al. reported that caspofungin exhibited a PAFE/TK ratio of 100 for *C. albicans* and *C. parapsilosis* [20], a similar ratio to the one found in the present study with anidulafungin against *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. parapsilosis* and *C. metapsilosis*.

In a study comparing the PAFE of amphotericin B, triazoles and echinocandins against *C. albicans* and *Aspergillus fumigatus*, Manavathu et al. [25] observed that amphotericin B produced a prolonged effect against *A. fumigatus* whereas triazoles, caspofungin and micafungin produced short PAFEs. In contrast, in the same study, amphotericin B, caspofungin and micafungin produced prolonged PAFE against *C. albicans* whereas the triazoles exerted a short one. These authors concluded that fungicidal drugs tend to possess longer PAFE compared to fungistatic ones. Ernst et al. [16] also demonstrated that fluconazole displayed no measurable PAFE against

*C. albicans* whereas echinocandins and amphotericin B exerted a prolonged PAFE (> 12 h) against the same species.

The PAFE may have clinical relevance to the design of dosing regimens for new antifungal agents such as the echinocandins. Antifungals with long PAFEs may be given less frequently than antimicrobials with short PAFEs, which may require more frequent administration [16,28]. A recent study [29] has demonstrated PAFEs of nystatin, amphotericin B and ketoconazole against oral *C. dubliniensis* isolates.

Conversely, fluconazole failed to produce a detectable PAFE. Ellepola et al. previously reported that a brief exposure of *C. albicans* isolates to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate would yield suppressor effects of growth and phospholipase production of this species [30].

In the current study, we did not observe significant differences between both clades, *C. albicans* and *C. parapsilosis*, although there were inter-strain differences in TK and PAFE. Among the possible explanations could be those distinctive fungal growth characteristics, the binding affinity of the drug, or the amount of glucan in the fungal cell membrane [23].

In conclusion, anidulafungin showed a significant and prolonged PAFE against the members of *C. albicans* and *C. parapsilosis* clades. Although the clinical implications of in vitro killing and PAFE are unproven, the current findings may be useful for optimizing dosing regimen of anidulafungin against these species. Due to possible differences among fungal species and antifungal drugs, both characterization of

PAFE and the correct identification of the pathogen are very important issues that have relevant therapeutic implications.

### **Acknowledgments**

Sandra Gil-Alonso had a scholarship from the Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. This work was supported by Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (SPR12UN002, S-PE13UN025) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, and UPV/EHU (UFI 11/25).



## References

- [1] Quindos G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 2014;31:42-8
- [2] Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 2008;46:2659-64
- [3] Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, et al. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1506-9
- [4] Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:278-83
- [5] Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: Six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008;46:150-6
- [6] Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: Four years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2006;44:760-3
- [7] Pfaller MA. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012;125:S3-13
- [8] Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernandez-Almaraz JL, Lopez-Soria LM, Carrillo-Munoz AJ, Hernandez-Molina JM, et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2315-22
- [9] Peman J, Canton E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1181-7
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3 S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth International Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2012

- [11] Canton E, Espinel-Ingroff A, Peman J, del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2194-7
- [12] Canton E, Peman J, Hervas D, Espinel-Ingroff A. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:864-8
- [13] Gil-Alonso S, Jauregizar N, Canton E, Eraso E, Quindós G. Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;81: in press. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.010
- [14] Gil-Alonso S, Jauregizar N, Canton E, Eraso E, Quindós G. In vitro fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59: in press. doi:10.1128/AAC.04474-14
- [15] Canton E, Peman J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2477-82
- [16] Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1108-11
- [17] Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3846-53
- [18] Smith RP, Baltch A, Bopp LH, Ritz WJ, Michelsen PP. Post-antifungal effects and time-kill studies of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71:131-8
- [19] Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:345-51
- [20] Clancy CJ, Huang H, Cheng S, Derendorf H, Nguyen MH. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2569-72

- [21] Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, et al. Characterising the post-antifungal effects of micafungin against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:80-4
- [22] Perlin DS. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: Implications for patient management. *Drugs* 2014;74:1573-85
- [23] Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, et al. Anidulafungin is fungicidal and exerts a variety of postantifungal effects against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3347-52
- [24] Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bustamante B, Canton E, Diekema DJ, Fothergill A, et al. Multicenter study of anidulafungin and micafungin MIC distributions and epidemiological cutoff values for eight *Candida* species and the CLSI M27-A3 broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:916-22
- [25] Manavathu EK, Ramesh MS, Baskaran I, Ganesan LT, Chandrasekar PH. A comparative study of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B, triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:386-9
- [26] Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Clancy CJ. Five-minute exposure to caspofungin results in prolonged postantifungal effects and eliminates the paradoxical growth of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3598-602
- [27] Catalan Gonzalez M, Montejo Gonzalez JC. Anidulafungin: A new therapeutic approach in antifungal therapy. pharmacology of anidulafungin. *Rev Iberoam Micol* 2008;25:92-100
- [28] Oz Y, Kiremitci A, Dag I, Metintas S, Kiraz N. Postantifungal effect of the combination of caspofungin with voriconazole and amphotericin B against clinical *Candida krusei* isolates. *Med Mycol* 2013;51:60-5
- [29] Ellepola AN, Joseph BK, Chandy R, Khan ZU. The postantifungal effect of nystatin and its impact on adhesion attributes of oral *Candida dubliniensis* isolates. *Mycoses* 2014;57:56-63
- [30] Ellepola AN, Joseph BK, Khan ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate. *Mycoses* 2014;57:553-9

**Table 1.** Anidulafungin MICs of *C. albicans* and *C. parapsilosis* clades

Strain	MIC (mg/L)
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	0.03
<i>C. albicans</i> NCPF 3156	0.03
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-101	0.06
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-102	0.03
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-103	0.03
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-104	0.06
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-105	0.06
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	0.06
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-131	0.06
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-132	0.06
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-133	0.03
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-135	0.03
<i>C. africana</i> UPV/EHU 97-135	0.03
<i>C. africana</i> ATCC 2669	0.06
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	2
<i>C. parapsilosis</i> UPV/EHU 09-378	2
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	1
<i>C. metapsilosis</i> UPV/EHU 07-045	1
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	1
<i>C. orthopsilosis</i> UPV/EHU 07-035	1

**Table 2.** Reductions in starting inocula of *Candida* isolates during time-kill and PAFE experiments and PAFE in hours against fourteen isolates of *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana*.

Isolate	Anidulafungin mg/L	Killing (log)		PAFE/time-kill killing <sup>a</sup>	PAFE (h)
		Time-kill	PAFE		
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	0.12	0.27	0.2	85.11	2
	0.5	0.39	0.01	41.69	20
	2	0.05	0.66	100	> 44
<i>C. albicans</i> NCPF 3156	0.12	1.35	0.15	6.31	0
	0.5	5.10	0.04	0	0
	2	5.10	2.05	0.09	> 42
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-101	0.12	2.7	0.36	0.46	0
	0.5	5	0.51	0	0
	2	5	4.91	81.28	> 43
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-102	0.12	0.92	0.30	24	3.2
	0.5	2.02	1.6	38.02	> 39.1
	2	5.17	1.3	0.01	> 39.1
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-103	0.12	NA <sup>b</sup>	0.1		> 43
	0.5	NA	0.05		19
	2	2.03	1.24	16.22	> 43
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-104	0.12	NA	0.35		> 42
	0.5	NA	0.44		> 42
	2	1.1	0.41	20.42	> 42
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-105	0.12	5.17	0.42	0	0
	0.5	5.17	0.5	0	0
	2	5.17	1.82	0.04	> 42
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	0.12	NA	NA		0
	0.5	0.04	0.04	100	0
	2	0.57	0.92	100	> 42
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-131	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	NA		2
	2	0.54	1.16	100	> 44
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-132	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	0.08		0
	2	0.53	0.03	31.62	> 42
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-133	0.12	NA	0.13		0
	0.5	0.39	0.39	100	18
	2	0.72	1.03	100	18
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-135	0.12	5.03	NA		0
	0.5	5.03	4.5	29.51	> 42
	2	5.03	1.32	0.02	> 42
<i>C. africana</i> ATCC 2669	0.12	NA	0.23		2.8
	0.5	0.12	0.25	100	> 37.7
	2	0.15	0.4	100	> 37.7
<i>C. africana</i> UPV/EHU 97-135	0.12	0.02	0.3	100	0.7
	0.5	0.36	0.34	95.5	2
	2	0.6	0.42	66.07	> 33.6

<sup>a</sup>Ratio of the log killing during PAFE experiments to the log killing during time-kill experiments.

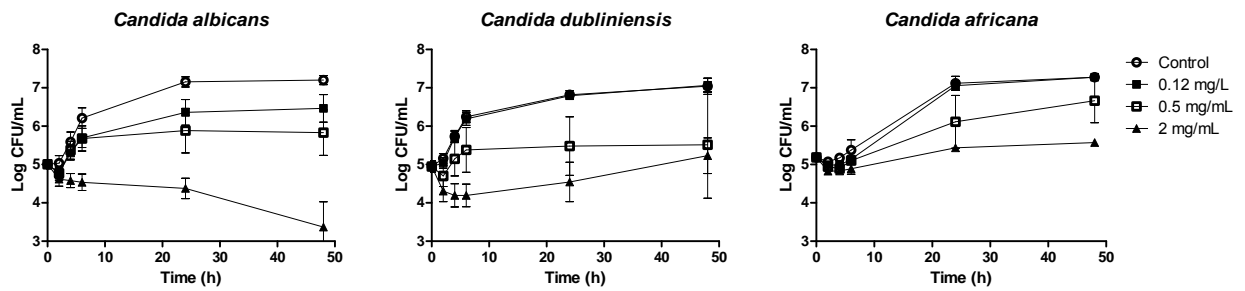
<sup>b</sup>NA, not applicable (without any reduction in colony counts compared with the starting inoculum).

**Table 3.** Reductions in starting inocula of *Candida* isolates during time-kill and PAFE experiments and PAFE in hours against seven isolates of *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*.

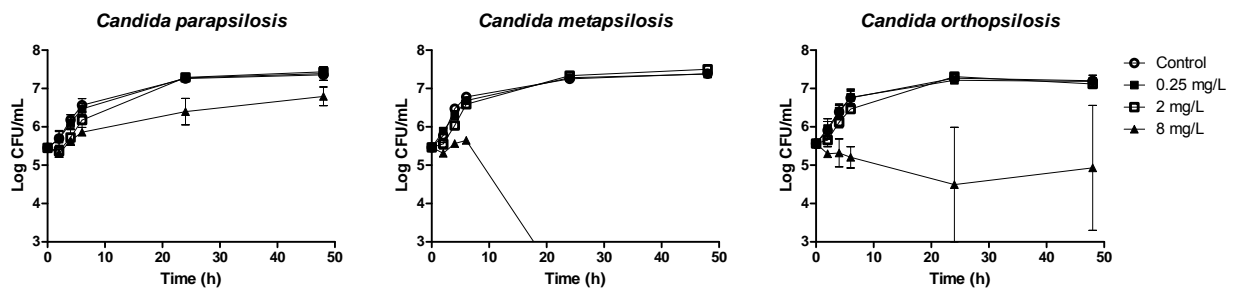
Isolate	Anidulafungin mg/L	Killing (log)		PAFE/time-kill killing <sup>a</sup>	PAFE (h)
		Time-kill	PAFE		
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0.25	NA <sup>b</sup>	NA		0
	2	0.88	0.11	16.98	0
	8	5.29	0.36	0	42
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0.25	NA	NA		0
	2	NA	NA		3.6
	8	5.30	0.18	0	42
<i>C. parapsilosis</i> UPV/EHU 09-378	0.25	0.15	NA		0
	2	0.08	0.19	100	5.7
	8	5.29	NA		5.2
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	0.25	NA	NA		0
	2	5.39	NA		0
	8	5.39	2.36	0.09	> 44
<i>C. metapsilosis</i> UPV/EHU 07-045	0.25	NA	NA		0
	2	1.12	NA		0
	8	5.26	5.38	100	> 44
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	0.25	NA	NA		0
	2	3.05	NA		2
	8	5.35	2.67	0.21	> 44
<i>C. orthopsilosis</i> UPV/EHU 07-035	0.25	NA	NA		0
	2	1.73	NA		0
	8	2.06	0.19	1.35	42

<sup>a</sup>Ratio of the log killing during PAFE experiments to the log killing during time-kill experiments.

<sup>b</sup>NA, not applicable (without any reduction in colony counts compared with the starting inoculum)



**Fig. 1.** Mean TK curves from PAFE assays against 7 *C. albicans*, 5 *C. dubliniensis* and 2 *C. africana* strains. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars).



**Fig. 2.** Mean TK curves from PAFE assays against 3 *C. parapsilosis sensu stricto*, 2 *C. metapsilosis* and 2 *C. orthopsilosis* strains. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars).





- ESTUDIO 5 -

Evaluación del PAFE de caspofungina contra los  
complejos de especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*

(PLoS One: 2015; en revisión)



El PAFE obtenido con 2 µg/ml de caspofungina fue > 37,7 h contra 12 de las 14 cepas del complejo de especies *C. albicans* ( $p < 0,05$ ). Este PAFE contra *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* fue de  $42,36 \pm 1,55$ ;  $38 \pm 10,1$  y  $25,6 \pm 17,11$  h, respectivamente (Tabla 2 y Figura 1 del manuscrito). No hubo diferencias en el PAFE entre las especies dentro de este complejo. En la Tabla 2 del manuscrito se puede observar que el PAFE de caspofungina era fungistático, excepto contra una cepa de *C. albicans* en la cual este efecto fue fungicida. El cociente PAFE/*time-kill* medio fue 55,27 con 2 µg/ml de caspofungina contra el complejo *C. albicans* pero con 8 de las 14 cepas fue de 100, lo que indica que después de la exposición al fármaco y su posterior retirada, este seguía causando el mismo efecto que cuando estaba presente.

Caspofungina (8 µg/ml) desarrolló un PAFE de  $6,68 \pm 4,32$ ;  $24,3 \pm 25,03$  y  $14,5 \pm 7,78$  h contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, respectivamente (Tabla 3 y Figura 2 del manuscrito).. El PAFE obtenido con 8 µg/ml de caspofungina fue  $\leq 11,6$  h, excepto para una *C. orthopsilosis* y otra *C. metapsilosis* con las que se observaron un PAFE prolongados ( $> 20$  y  $42$  h, respectivamente). La media del cociente PAFE/*time-kill* obtenido con 8 µg/ml caspofungina fue de 1,47 contra el complejo *C. parapsilosis*. El PAFE de caspofungina contra el complejo *C. albicans* ( $38,41 \pm 9,42$  h) fue superior ( $p < 0,0001$ ) al obtenido contra el complejo *C. parapsilosis* ( $13,96 \pm 13,54$  h).



**Postantifungal effect of caspofungin against the species of the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* complexes**

Sandra Gil-Alonso,<sup>a,b</sup> Nerea Jauregizar,<sup>b</sup> Elena Eraso,<sup>a</sup> Guillermo Quindós<sup>a</sup>#

<sup>a</sup> Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España,

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España

**Running title:** Caspofungin postantifungal activity against *Candida*

#Address correspondence to Dr. Guillermo Quindós, guillermo.quindos@ehu.es

**ABSTRACT**

*Candida albicans* is the most common cause of invasive candidiasis. However, non-*C. albicans* species are rising, being *Candida parapsilosis* an emerging cause of nosocomial blood stream infection. Caspofungin shows in vitro activity against invasive clinical isolates of *Candida*. Killing and postantifungal effects (PAFE) are important factors in both dose interval choice and infection outcome. We performed time-kill and PAFE experiments with caspofungin on *C. albicans* (*C. albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana*) and *C. parapsilosis* complexes (*C. parapsilosis*, *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*). For PAFE studies, microorganisms were exposed to caspofungin for 1 h at concentrations ranging from 0.12 to 8 µg/ml. Cell suspensions were then washed and re-suspended. Time-kill experiments were conducted at the same concentrations. Samples were removed at each time point (0-48 h) and viable cells determined. Caspofungin time-kill and PAFE were influenced by drug concentration, with the highest concentration resulting in the longest PAFE and also by specific *Candida* species. Caspofungin exhibited a significant and prolonged PAFE (> 37 h) at the highest tested concentration (2 µg/ml) against 12 out of 14 (86%) strains from the *C. albicans* complex. Against *C. parapsilosis* complex, PAFE was < 12 h at 8 µg/ml, except for one *C. orthopsilosis* and one *C. metapsilosis* strain, with PAFEs of 20 and > 42 h, respectively. Caspofungin demonstrated fungicidal activity in both time-kill and PAFE experiments against *C. albicans* complex. However, caspofungin did not generate fungicidal activity against *C. parapsilosis* complex strains, except for one strain of *C. metapsilosis*, in time-kill assays.

## INTRODUCTION

Invasive candidiasis are important nosocomial infections causing high morbidity and mortality. Although *Candida albicans* is the most common cause of invasive candidiasis, the incidence of infections due to non-*C. albicans* species is rising. Among these species, *Candida parapsilosis* is emerging as a cause of nosocomial blood stream infection in both adult and children (1). In addition to *C. albicans sensu stricto*, two closely related species have been described and added to the *C. albicans* species complex: *Candida dubliniensis* and *Candida africana*, with differences in antifungal susceptibility, virulence and epidemiology (2-4). Similarly, *C. parapsilosis* complex groups three different but closely related species named *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. These species show differences in antifungal susceptibility and virulence, being their epidemiology and antifungal susceptibility a matter of increased interest (5-9). *C. parapsilosis* is usually susceptible to most antifungal agents, but there are reports of isolates with decreased susceptibility to azoles and echinocandins (10).

Caspofungin is an echinocandin antifungal that decreases fungal growth or kill the fungal cell by a non-competitive inhibition of 1,3- $\beta$ -glucan synthase, an enzyme responsible for fungal cell wall synthesis. Caspofungin is increasingly used for the therapy of invasive candidiasis showing in vitro activity against clinical isolates of *Candida* (3). Postantifungal effect (PAFE) is the continuation of suppression of fungal growth after the drug is removed from the fungal suspension. The existence of PAFE depends on both the fungal species and the class of the antifungal drug. However, PAFE may also be affected by the size of the fungal inoculum, the concentration of the drug and the time of exposure. There is an increasing need for understanding of the pharmacodynamic properties of the antifungal agents, specially the new ones and their potential usefulness in treating these severe infectious diseases. For this reason, PAFE may have a main clinical relevance in the design of dosing regimens for these new

antifungal agents. The PAFE of caspofungin against various species of *Candida* has been evaluated in a few studies and usually including a low number of isolates (11-13).

Because the use of echinocandins to treat serious *Candida* infections is increasing and taking into account that duration of the anti-infective activity after drug clears from the site of infection is important, both in dose interval selection and in outcome of infection (14), we compared the in vitro antifungal activity and the PAFE of caspofungin against clinical isolates and reference strains of *C. albicans* complex and *C. parapsilosis* complex.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms

13 clinical isolates and 8 reference strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis* were included in this study: 5 clinical bloodstream isolates of *C. albicans*; 2 *C. albicans* reference strains (NCPF 3153 and NCPF 3156); 4 *C. dubliniensis* clinical blood isolates and 1 reference strain (NCPF 3949); 1 vaginal isolate of *C. africana* and 1 reference strain (ATCC 2669). Moreover, 1 clinical bloodstream isolate and 2 reference strains of *C. parapsilosis sensu stricto* (ATCC 22019 and ATCC 90018), 1 blood isolate and 1 reference strain of *C. metapsilosis* (ATCC 96143) and 1 blood isolate and 1 reference strain of *C. orthopsilosis* (ATCC 96139) were selected for study based upon extensive experience with these isolates in our laboratory. Isolates were identified by metabolic properties (ATB ID 32C, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and molecular methods, as previously described (15, 16).

### Antimicrobial agents

Caspofungin (Merck Sharp & Dohme, Madrid, Spain) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock solution of 5120 µg/mL. Further dilutions were prepared in RPMI 1640 medium with L-glutamine and without NaHCO<sub>2</sub> buffered to pH 7 with 0.165 M



morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (RPMI) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Stock solutions were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use.

### **In vitro susceptibility testing**

MICs, defined as minimum concentrations that produce  $\geq 50$  growth reduction, were determined following the M27-A3 S4 document (17). All MICs were measured in RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS and results were read after 24 h of incubation.

### **Time-kill procedures**

Time-kill studies were performed as previously described (6, 18, 19). Isolates and strains previously stored were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) plates prior to testing. Fungal suspensions were prepared in sterile water by picking 3 to 5 colonies from a 24 h culture and the resulting suspension was prepared at 1 McFarland ( $\approx 10^6$  CFU/ml). One milliliter of the fungal suspension was added to vials containing 9 ml of RPMI. Time-kill studies were carried out on microtiter plates for the BioScreen C computer-controlled microbiological incubator (BioScreen C MBR, LabSystems, Helsinki, Finland) in RPMI (final volume 200  $\mu\text{l}$ ) by using an inoculum size of  $1\text{-}5 \times 10^5$  CFU/ml. For *C. albicans* complex, caspofungin concentrations tested were 0.12, 0.5 and 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and for *C. parapsilosis* complex the concentrations tested were 0.25, 2 and 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Echinocandin concentrations assayed in both *Candida* complexes, are achieved in serum after standard doses (20). Inoculated plates were incubated 48 h at  $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . At predetermined time points (0, 2, 4, 6, 24, and 48 h), 10  $\mu\text{l}$  (0-6 h) and 6  $\mu\text{l}$  (24-48 h) were collected from each culture well (control and test solution wells), serially diluted in phosphate buffered saline (PBS) and aliquots plated onto SDA. After incubation of the plates at  $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h, *Candida* colonies were counted. The lower limit of accurate and reproducible detectable colony counts was 200 CFU/ml. When the colony counts were expected to be less than 200 CFU/mL, samples of 5  $\mu\text{l}$  were taken directly from the test solution and plated. Each experiment was performed twice for each isolate. Plots of averaged colony counts ( $\log_{10}$  CFU/ml) versus

time were constructed and compared against a growth control (in the absence of drug). Also the antifungal carryover effect was determined as formerly reported (21).

### **Postantifungal effect**

PAFE studies were performed as described previously with slight differences (13). Standard 1 McFarland turbidity fungal suspensions were prepared in sterile distilled water, from which 1 ml was added to 9 ml of RPMI. Caspofungin concentrations were the same as described for the time-kill procedures. Following the incubation period of 1 h, caspofungin was removed by a process of three cycles of repeated centrifugation (2000 rpm, 10 min) and washed with PBS. After the final centrifugation, the fungal pellet was suspended in 600  $\mu$ l of RPMI. All samples were incubated on microtiter plates for the BioScreen C at  $36 \pm 1$  °C with a final volume of 200  $\mu$ l. At the same predetermined time points described in the time-kill experiments, samples were serially diluted in PBS and inoculated onto a SDA plate for CFU counting.

PAFE was calculated for each isolate as the difference in time required for control (in the absence of drug) and treated isolates to grow  $1 \times \log_{10}$  following drug removal. PAFE was determined using the following equation:  $PAFE = T - C$ , where T = time required for counts in treated cultures to increase by  $1 \log_{10}$  unit above that seen following drug removal and C = time required for counts in control to increase by  $1 \log_{10}$  unit above that following the last wash.

### **PAFE and time-kill data comparison**

Fungicidal activity was described as a  $\geq 3 \log_{10}$  (99.9%) reduction, and fungistatic activity was defined as a  $< 99.9\%$  reduction in CFU from the starting inoculum size (22). Plots of averaged colony counts ( $\log_{10}$  CFU per ml) versus time obtained in PAFE experiments were constructed and compared against a growth control. The ratios of the log killing during PAFE experiments to the log killing during time kill experiments were calculated. Time-kill and PAFE experiments were performed simultaneously.

Analysis of variance was performed to determinate significant differences in PAFE (in hours) among species and concentrations, using GraphPad Prism™ 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA; USA). A  $p$  value  $< 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

No antifungal carryover effect was detected in time-kill studies. Caspofungin MICs for isolates from *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes are shown in Table 1. The results of time-kill and PAFE experiments for *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* are summarized in Table 2. Caspofungin exhibited a significant and prolonged PAFE ( $> 37$  h) at the highest tested concentration ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) against 12 out of 14 (86%) strains from the *C. albicans* complex, except for one strain of *C. dubliniensis* and one strain of *C. africana*, with PAFEs of 20 and 13.5 h, respectively. Significant differences were detected when compared with controls (without drug) ( $p < 0.005$ ). Time-kill experiments resulted in fungicidal activity, defined as a kill of  $\geq 3 \log_{10}$ , against 3 out of 14 (21%) of the studied strains of *C. albicans* complex. Fungicidal endpoint was achieved against *C. albicans* UPV/EHU 99-101 at the three tested concentrations, and against *C. dubliniensis* UPV/EHU 00-131 and UPV/EHU 00-135 at  $2 \mu\text{g/ml}$ . Fungicidal endpoint was also attained after caspofungin removal in PAFE experiments against *C. albicans* UPV/EHU 99-101 (7% of strains). The mean value of PAFE/time-kill ratio was 55.27 with  $2 \mu\text{g/ml}$  for *C. albicans* complex; moreover, against 8 out of 14 (57.14%) of the studied strains the PAFE/time-kill ratio of caspofungin at  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$  was 100, indicating that 1 hour exposure to caspofungin accounted for up to 100% of the overall killing observed during time-kill experiments (Table 2).

Table 3 summarizes the results of time-kill and PAFE experiments for *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* at each caspofungin concentration. Caspofungin PAFE was  $< 12$  h at  $8 \mu\text{g/ml}$  for *C. parapsilosis* complex, except for two strains, *C. metapsilosis* UPV/EHU 07-045 and *C. orthopsilosis* ATCC 96139, with PAFE values of  $> 42$  h and 20 h, respectively. At  $8 \mu\text{g/ml}$ ,

the range of log time-kill data was 0.47 to 5.24. Time-kill experiments data showed that caspofungin did not generate fungicidal activity against any of the studied isolates of this complex, except for *C. metapsilosis* UPV/EHU 07-045, for which fungicidal activity persisted during the 48 h testing period. However, this trend was not observed in PAFE experiments. (Table 3).

PAFE results for *C. parapsilosis* complex ( $13.93 \pm 13.54$  h) differed from *C. albicans* complex ( $38.41 \pm 9.42$  h) ( $p < 0.0001$ ). This difference was also evident when comparing *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes curves from PAFE assays (Figures 1 and 2).

## DISCUSSION

The prevalence of *C. parapsilosis* as causative agent of candidemia and invasive candidiasis has risen to become in many countries of Southern Europe, Latin America and Asia, the second most common etiological agent of these infections after *C. albicans* (15, 23, 24). However, *C. parapsilosis* forms a complex of species composed of three genetically distinct groups that have been recognized as separate species; *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* (25). Exact importance of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* as human pathogens remains unknown, but studies point to them being significant in invasive candidiasis (7, 25-27). *C. parapsilosis* is usually susceptible to antifungal agents, but there are reports of isolates with decreased susceptibility to azoles and echinocandins (10). Moreover, differences in antifungal susceptibility among the three cryptic species have been observed, with *C. parapsilosis sensu stricto* being less susceptible to amphotericin B, echinocandins, and fluconazole than *C. metapsilosis* or *C. orthopsilosis* (7, 15). Miranda-Zapico et al. observed higher MICs of anidulafungin, micafungin and caspofungin for *C. parapsilosis sensu stricto* isolates compared with those for *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* isolates (15).

PAFE data together with MIC values of drugs may be clinically useful in the evaluation of the dosage regimens to manage invasive candidiasis. Recently, PAFE of amphotericin B, ketoconazole, fluconazole and nystatin against oral isolates of *C. dubliniensis* was studied. Amphotericin B, ketoconazole and nystatin induced PAFE, while fluconazol failed to produce a detectable PAFE, after the isolates were exposed to these drugs for 1 h (28, 29). In another recent report, Kovács et al. studied the PAFE in two *C. albicans* strains after caspofungin exposure, and obtained CFU decreases comparable with the results obtained in time-kill experiments in RPMI-1640 (30). Although the PAFE of caspofungin against various species of *Candida* has been evaluated in a few studies, usually including a low number of isolates (11-13), to our knowledge, this is the first study comparing the PAFE of this echinocandin against the cryptic species inside *C. parapsilosis* and *C. albicans* complexes.

The ranges of caspofungin MICs were consistent with large surveillance studies of in vitro activity of this drug (4). The results of in vitro caspofungin MICs should be cautiously interpreted because these values can be variable for this echinocandin, since a recent study has shown interlaboratory variability in modal MICs (31).

Caspofungin at the concentration above the MIC, significantly reduced the burden of *C. albicans* complex strains during time-kill experiments. In this study it has been observed that caspofungin exhibits fungicidal activity against 3 out of 14 (21%) of the strains of *C. albicans* complex tested. Previous studies have shown that caspofungin exhibits fungicidal or fungistatic activity depending on the isolate and test conditions. In this sense, echinocandins are less consistently fungicidal in RPMI medium than antibiotic medium (32, 33). The prolonged incubation period of 48 h used in our experiments, should have been long enough to achieve fungicidal endpoint.

The PAFEs of caspofungin, against various species of *Candida* has been evaluated in a few studies. In a study evaluating the PAFE of echinocandins, caspofungin displayed a prolonged PAFE of greater than 12 h against *C. albicans* when tested at concentrations above the MICs (13).

Data from our study corroborates these reports regarding the prolonged PAFE activity of caspofungin against *C. albicans* complex. Additionally, caspofungin has also shown a prolonged PAFE against *C. krusei* isolates (34). In a study in which PAFEs of caspofungin (after 1 h exposure) was determined against six clinical isolates of *C. guilliermondii*, *C. kefyr* and *C. lusitaniae*, authors observed that caspofungin induced measurable PAFEs only against *C. lusitaniae* (35), in contrast with findings of Ernst et al. concerning *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans* (13). Other authors have also shown prolonged (> 12 to 24 h) PAFE for micafungin and anidulafungin against different *Candida* species (11, 13). In our studies, anidulafungin and micafungin have also depicted prolonged PAFE against the species included in the *C. albicans* clade (unpublished observations).

The comparisons of PAFE to time-kill assays are of interest. In our study, higher PAFE/time-kill ratios were obtained for *C. albicans* complex than for *C. parapsilosis* complex, indicating that 1 hour exposure to caspofungin accounted for a great extent of the overall killing observed during time-kill experiments for *C. albicans* complex, especially for the highest tested concentration. These results differed from the ones of Clancy et al., in which high PAFE/time-kill ratios were observed for *C. parapsilosis* strains (12).

In our study, inter-species differences were detected in terms of PAFE in *C. parapsilosis* complex. Other authors have observed prolonged PAFE with caspofungin (11, 12) and for the other two echinocandins (11, 36) against *C. parapsilosis*. But this is the first work that determines the intra-complex differences. In our study, caspofungin caused the longest PAFE (> 42 h) against an isolate of *C. metapsilosis* at 8 µg/ml, followed by *C. orthopsilosis* ATCC 96139 (20 h) at the highest concentration of caspofungin tested. However, caspofungin displayed a short PAFE against *C. parapsilosis sensu stricto* when tested at concentrations above the MIC. This result was observed both against clinical isolates (*C. parapsilosis* UPV/EHU 09-378) and against reference strains

(*C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. parapsilosis* ATCC 90018), with PAFE values of 11.6 h, 4.6 and 3.7 h, respectively, with 8 µg/ml of caspofungin.

Neither fungicidal activity was detected in time-kill nor PAFE experiments with caspofungin, with the exception of a clinical isolate of *C. metapsilosis* (*C. metapsilosis* UPV/EHU 07-045), at 8 µg/ml. Our current findings are similar to those seen by Canton et al., who observed that caspofungin lacked fungicidal activity against multiple strains of *C. parapsilosis* complex (6). In addition, they observed species-specific differences among the three echinocandins, being caspofungin the less effective causing rapid killing activity than either micafungin or anidulafungin. These findings were corroborated in our studies on the anidulafungin and micafungin time-kills against the species included in the clades *C. albicans* and *C. glabrata* (18, 37).

This study demonstrates that PAFE seen against *C. albicans* complex strains was longer than PAFE against *C. parapsilosis* complex. Additionally, intra-complex differences in PAFE have also been observed, with the longest PAFE against *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. We have also observed these differences between complexes in the length of PAFE with micafungin but not with anidulafungin (unpublished results). Possible explanations for the differences in the PAFE of caspofungin against the different species tested include organism growth characteristics, the binding affinity of the drug to the target enzyme, or the amount of glucan in the fungal cell membrane. Our results suggest that *C. parapsilosis* intra-complex identification is important as it might have relevant therapeutic implications. Animal studies reveal in vivo PAFEs in accordance with PAFEs obtained in vitro for most organism/antimicrobial combinations. Andes et al. also demonstrated a prolonged PAFE of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model (37).

As performed in other PAFE experiments, in which PAFE was determined after 1 h exposure, we have studied the PAFE of caspofungin after 1 h exposure. We did not test shorter exposure times, but Ernst et al. observed that the prolonged PAFE of echinocandins and amphotericin B

was not affected by the exposure time, such that exposure for 0.25 h for the antifungals produced the same PAFE as exposure for 1 h (13). Moreover, other studies have shown that removal of caspofungin (8 µg/mL) after 5 or 15 minutes exposure also resulted in maximal PAFE (38). Similarly, Moriyama et al. observed that maximum PAFE against *Candida* spp. occurred with caspofungin exposures of 5 or 15 minutes (39).

The exact mechanisms by which antimicrobials induce the PAFE have not been clearly delineated. A number of factors may contribute to the in vivo PAFE, including sub-MIC effects, the time for organisms to recover from impaired ergosterol synthesis, and the persistence of the drug at the effect site (37). The clinical relevance of the post-antimicrobial effect (PAE) is probably most important when designing dosage regimens. The presence of a long PAE allows aminoglycosides to be dosed infrequently; the lack of an in vivo PAE suggests that beta-lactamic antimicrobials require frequent or continuous dosing. Important questions remain to be answered concerning the PAE. The clinical relevance of caspofungin concentrations tested (0.25, 2 and 8 µg/ml) needs to be considered in relation to achievable serum concentrations with standard dosing schedules. Peak serum levels at steady state for adults receiving standard doses of caspofungin are 10 µg/ml (40) or 12 µg/ml (20). Investigations of optimal echinocandin choice, dose and dose interval should consider differences in PAFE related to species differences in *C. parapsilosis* complex and *C. albicans* complex.



## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (S-PR12UN002, S-PE13UN025) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, and UPV/EHU (UFI 11/25). SGA had a predoctoral scholarship from the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

Elena Eraso and Guillermo Quindós have received grant support from Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (S-PR12UN002, S-PE13UN121) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI11/00203), and UPV/EHU (UFI 11/25). Data of time-kill experiments and curves, of *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes have been presented in “XII Congreso Nacional de Micología” celebrated in Bilbao, Spain, in 2014 (organized by “Asociación Española de Micología” and by “Sociedad española de Micología”).

## TRANSPARENCY DECLARATIONS

In the past 5 years, Elena Eraso has received grant support from Astellas Pharma, and Pfizer SLU. Guillermo Quindós has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Pfizer SLU, Schering Plough and Merck Sharp and Dohme. He has been an advisor/consultant to Merck Sharp and Dohme, and has been paid for talks on behalf of Abbvie, Astellas Pharma, Esteve Hospital, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer SLU, and Schering Plough.

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

## REFERENCES

1. **Quindós G.** 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev. Iberoam. Micol.* **31**:42-48.
2. **Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ , Jones RN.** 2010. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **68**:278-283.
3. **Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S , Diekema DJ.** 2006. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **44**:760-763.
4. **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.
5. **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.
6. **Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J , del Castillo L.** 2010. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2194-2197.
7. **Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA , Diekema DJ.** 2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2659-2664.
8. **Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C , Rodrigues AG.** 2009. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2392-2397.
9. **Szabo Z, Szilagyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayegan S , Majoros L.** 2009. In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **64**:283-288.
10. **Moudgal V, Little T, Boikov D , Vazquez JA.** 2005. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:767-769.
11. **Smith RP, Baltch A, Bopp LH, Ritz WJ , Michelsen PP.** 2011. Post-antifungal effects and time-kill studies of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **71**:131-138.
12. **Clancy CJ, Huang H, Cheng S, Derendorf H , Nguyen MH.** 2006. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by

simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2569-2572.

13. **Ernst EJ, Klepser ME , Pfaller MA.** 2000. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1108-1111.

14. **Gumbo T.** 2007. Impact of pharmacodynamics and pharmacokinetics on echinocandin dosing strategies. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **20**:587-591.

15. **Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM , Quindós G.** 2011. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:2315-2322.

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

17. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. M27-A3 S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth International Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.

18. **Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E , Quindós G.** 2015. Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.010.

19. **Cantón E, Pemán J, Hervas D , Espinel-Ingroff A.** 2013. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:864-868.

20. **Catalán González MMontejo Gonzalez JC.** 2008. Anidulafungin: a new therapeutic approach in antifungal therapy. *Pharmacology of anidulafungin. Rev. Iberoam. Micol.* **25**:92-100.

21. **Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A , Espinel-Ingroff A.** 2004. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2477-2482.

22. **Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA , Klepser ME.** 2002. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:345-351.

23. **Gómez J, García-Vázquez E, Espinosa C, Ruiz J, Canteras M, Hernández-Torres A, Banos V, Herrero JA , Valdés M.** 2009. Nosocomial candidemia at a general hospital: the change of epidemiological and clinical characteristics. A comparative study of 2 cohorts (1993-1998 versus 2002-2005). *Rev. Iberoam. Micol.* **26**:184-188.

24. **Pfaller MA, Diekema DJ.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133-163.
25. **Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, Fernández-Rodríguez M, Quindós G, Pontón J.** 1995. Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J. Infect. Dis.* **171**:967-975.
26. **de Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J.** 2011. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:418-424.
27. **Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Barcelona Candidemia Project Study Group.** 2008. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1506-1509.
28. **Ellepola AN, Chandy R, Khan ZU.** 2014. Post-antifungal effect and adhesion to buccal epithelial cells of oral *Candida dubliniensis* isolates subsequent to limited exposure to amphotericin B, ketoconazole and fluconazole. *J. Investig. Clin. Dent.* doi: 10.1111/jicd.12095.
29. **Ellepola AN, Joseph BK, Khan ZU.** 2014. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate. *Mycoses.* **57**:553-559.
30. **Kovacs R, Gesztelyi R, Perlin DS, Kardos G, Doman M, Berenyi R, Majoros L.** 2014. Killing Rates for Caspofungin Against *Candida albicans* After Brief and Continuous Caspofungin Exposure in the Presence and Absence of Serum. *Mycopathologia.* **178**:197-206.
31. **Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Cantón E, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Fothergill A, Fuller J, Gaustad P, González GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Meis JF, Moore CB, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pukinskas SR, St-Germain G, Szeszs MW, Turnidge J.** 2013. Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:5836-5842.
32. **Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA.** 1999. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **33**:75-80.
33. **Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN.** 2003. In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1068-1071.
34. **Oz Y, Kiremitci A, Dag I, Metintas S, Kiraz N.** 2013. Postantifungal effect of the combination of caspofungin with voriconazole and amphotericin B against clinical *Candida krusei* isolates. *Med. Mycol.* **51**:60-65.

35. **Di Bonaventura G, Spedicato I, Picciani C, D'Antonio D , Piccolomini R.** 2004. In vitro pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4453-4456.
36. **Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH , Clancy CJ.** 2010. Characterising the post-antifungal effects of micafungin against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **35**:80-84.
37. **Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Prince RA, Marchillo K, Ashbeck J , Hou J.** 2008. In vivo pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:539-550.
38. **Shields RK, Nguyen MH, Press EG , Clancy CJ.** 2011. Five-minute exposure to caspofungin results in prolonged postantifungal effects and eliminates the paradoxical growth of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:3598-3602.
39. **Moriyama B, Henning SA, Penzak SR , Walsh TJ.** 2012. The postantifungal and paradoxical effects of echinocandins against *Candida* spp. *Future Microbiol.* **7**:565-569.
40. **Cappelletty DE, Eiselstein-McKittrick K.** 2007. The echinocandins. *Pharmacotherapy.* **27**:369-388.

TABLE 1. Caspofungin MICs for *C. albicans* and *C. parapsilosis* complex strains

Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	0.25
<i>C. albicans</i> NCPF 3156	0.25
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-101	0.25
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-102	0.5
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-103	0.25
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-104	0.5
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-105	0.25
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	0.5
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-131	0.25
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-132	0.25
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-133	0.25
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-135	0.25
<i>C. africana</i> UPV/EHU 97-135	0.5
<i>C. africana</i> ATCC 2669	0.5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	1
<i>C. parapsilosis</i> UPV/EHU 09-378	2
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	2
<i>C. metapsilosis</i> UPV/EHU 07-045	1
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	2
<i>C. orthopsilosis</i> UPV/EHU 07-035	1

TABLE 2. Maximum log reductions in starting inocula of *Candida* isolates during time-kill and PAFE experiments and PAFE in hours against fourteen isolates of *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana*.

Isolate	Caspofungin µg/ml	Killing (log)		PAFE/time-kill killing <sup>a</sup>	PAFE (h)
		Time-kill	PAFE		
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	0.12	0.01	NA <sup>b</sup>		0
	0.5	0.1	NA		0
	2	0.33	1.03	100	> 44
<i>C. albicans</i> NCPF 3156	0.12	NA	0.04		0
	0.5	0.03	0.12	100	0
	2	2.55	2.06	32.36	> 42
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-101	0.12	5.1	0.33	0	0
	0.5	5.1	0.71	0	0
	2	5.1	5	79.43	> 43
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-102	0.12	0.24	0.89	100	2.9
	0.5	0.34	1.02	100	2.3
	2	2.04	1.85	64	> 39.5
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-103	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	NA		0
	2	1.39	0.12	5.34	> 44
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-104	0.12	NA	0.1		0
	0.5	NA	NA		0
	2	0.98	0.54	36.33	> 42
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-105	0.12	0.46	0.66	100	0
	0.5	0.34	0.39	100	0
	2	1.42	1.36	87.11	> 42
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	0.12	0.04	0.13	100	0
	0.5	NA	0.01		0
	2	0.69	0.53	69.18	> 42
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-131	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	NA		0
	2	4.63	0.46	0	20
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-132	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	NA		0
	2	0.56	NA		44
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-133	0.12	0.04	NA		0
	0.5	NA	NA		0
	2	0.76	1.14	100	42
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-135	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	0.15		0
	2	5	1.67	0.05	42
<i>C. africana</i> ATCC 2669	0.12	0.06	0.12	100	0
	0.5	0.06	0.15	100	0
	2	0.22	0.37	100	37.7
<i>C. africana</i> UPV/EHU 97-135	0.12	0.12	0.02	79.54	0.7
	0.5	0.16	0.03	73.79	0.8
	2	0.4	0.65	100	13.5

<sup>a</sup>Ratio of the log killing during PAFE experiments to the log killing during time-kill experiments.

Calculated as:  $(10^{\log \text{ killing PAFE}} / 10^{\log \text{ killing time-kill}}) \times 100$

<sup>b</sup>NA, not applicable (without any reduction in colony counts compared with the starting inoculum)

TABLE 3. Maximum log reductions in starting inocula of *Candida* isolates during time-kill and PAFE experiments and PAFE in hours against seven isolates of *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*.

Isolate	Caspofungin µg/ml	Killing (log)		PAFE/time-kill killing <sup>a</sup>	PAFE (h)
		Time-kill	PAFE		
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0.25	NA <sup>b</sup>	NA		0
	2	0.03	NA		0
	8	0.74	NA		4.6
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0.25	NA	NA		0
	2	0.16	NA		0
	8	0.47	NA		3.7
<i>C. parapsilosis</i> UPV/EHU 09-378	0.25	0.24	NA		0
	2	1.67	NA		0
	8	1.42	0.35	8.52	11.6
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	0.25	0.01	NA		0
	2	1.42	NA		0
	8	2.35	NA		6.6
<i>C. metapsilosis</i> UPV/EHU 07-045	0.25	NA	NA		0
	2	1.41	0.03	4.16	0
	8	5.24	0.86	0	> 42
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	0.25	NA	NA		0
	2	1.81	0.11	1.98	2
	8	1.89	0.05	1.44	20
<i>C. orthopsilosis</i> UPV/EHU 07-035	0.25	NA	NA		0
	2	1.74	NA		0
	8	2.52	0.02	0.31	9

<sup>a</sup>Ratio of the log killing during PAFE experiments to the log killing during time-kill experiments.

Calculated as:  $(10^{\log \text{ killing PAFE}} / 10^{\log \text{ killing time-kill}}) \times 100$

<sup>b</sup>NA, not applicable (without any reduction in colony counts compared with the starting inoculum)



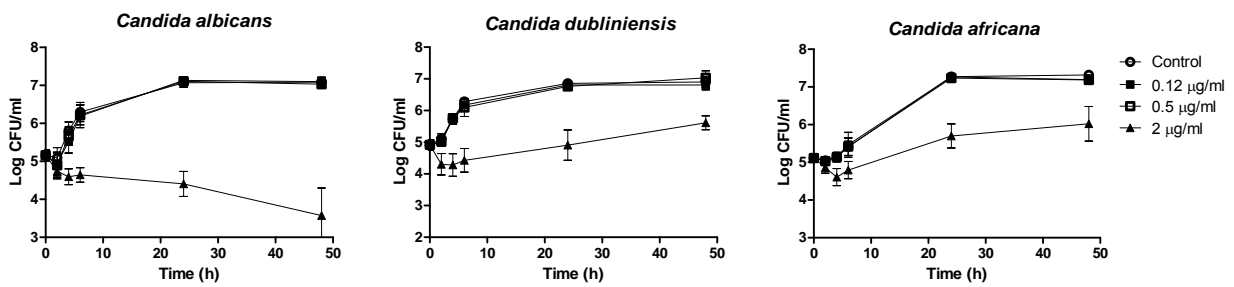


FIG. 1. Mean time-kill curves from PAFE assays against seven *C. albicans* isolates, five *C. dubliniensis* isolates and two *C. africana* isolates at caspofungin indicated concentrations. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars)

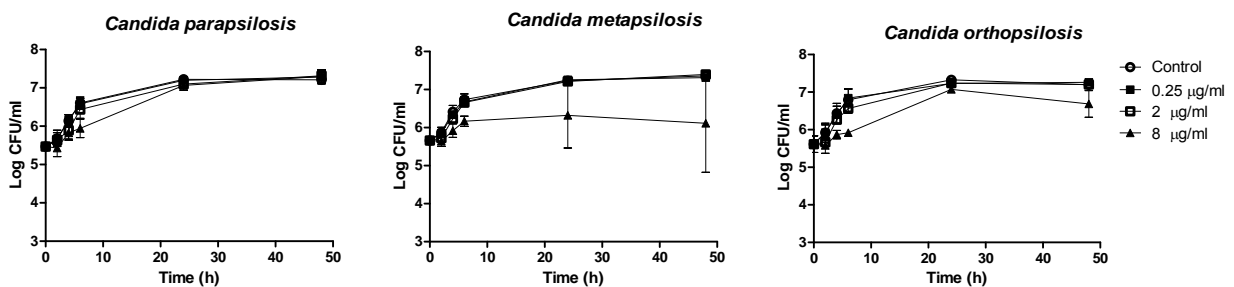


FIG. 2. Mean time-kill curves from PAFE assays against three *C. parapsilosis sensu stricto* isolates, two *C. metapsilosis* isolates and two *C. orthopsilosis* isolates at caspofungin indicated concentrations. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars)



- ESTUDIO 6 -

Evaluación del PAFE de micafungina contra los complejos  
de especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*

(PLoS One: 2015; en revisión -con cambios mínimos-)



Micafungina (2 µg/ml) mostró un PAFE prolongado y significativo contra *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* ( $42,35 \pm 1,55$ ;  $42,8 \pm 1,1$  y  $37,6 \pm 0,14$  h, respectivamente) (Tabla 2 y Figura 1 del manuscrito). No hubo diferencias entre especies dentro del complejo. Además, micafungina mostró un PAFE > 43 h, con 0,5 µg/ml, contra una cepa de *C. albicans*. En los experimentos PAFE, micafungina mostró actividad fungistática contra casi todas las cepas y actividad fungicida contra dos cepas del complejo *C. albicans*.

Micafungina (8 µg/ml) mostró un PAFE de  $9 \pm 5,81$ ;  $7,35 \pm 2,76$  y  $7,4 \pm 5,09$  h, contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, respectivamente (Tabla 3 y Figura 2 del manuscrito). No hubo diferencias entre especies. En los experimentos de PAFE, micafungina mostró una baja letalidad contra *C. parapsilosis*.

El PAFE de caspofungina contra el complejo *C. albicans* ( $41,83 \pm 2,18$  h) fue superior ( $p < 0,0001$ ) al obtenido contra el complejo *C. parapsilosis* ( $8,07 \pm 4,2$  h). El cociente PAFE/*time-kill* medio fue 43,25 con 2 µg/ml de caspofungina contra el complejo *C. albicans* (en 4 de las 14 cepas este cociente fue de 100) y 0,49 con 8 µg/ml de caspofungina contra el complejo *C. parapsilosis*.



Postantifungal effect of micafungin against the species complexes of  
*Candida albicans* and *Candida parapsilosis*

Sandra Gil-Alonso<sup>1,2</sup>, Nerea Jauregizar<sup>2</sup>, Elena Eraso<sup>1</sup>, and Guillermo Quindós<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España

<sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España

\* Corresponding author

E-mail: guillermo.quindos@ehu.eus

## Abstract

Micafungin is an effective antifungal agent useful for the therapy of invasive candidiasis. *Candida albicans* is the most common cause of invasive candidiasis; however, infections due to non-*C. albicans* species, such as *Candida parapsilosis*, are rising. Killing and postantifungal effects (PAFE) are important factors in both dose interval choice and infection outcome. The aim of this study was to determinate the micafungin PAFE against 7 *C. albicans* strains, 5 *Candida dubliniensis* 2 *Candida africana*, 3 *C. parapsilosis*, 2 *Candida metapsilosis* and 2 *Candida orthopsilosis*. For PAFE studies, cells were exposed to micafungin for 1 h at concentrations ranging from 0.12 to 8 µg/ml. Time-kill experiments (TK) were conducted at the same concentrations. Samples were removed at each time point (0-48 h) and viable counts determined. Micafungin (2 µg/ml) was fungicidal ( $\geq 3 \log_{10}$  reduction) in TK against 5 out of 14 (36%) strains of *C. albicans* complex. In PAFE experiments, fungicidal endpoint was achieved against 2 out of 14 strains (14%). In TK against *C. parapsilosis*, 8 µg/ml of micafungin turned out to be fungicidal against 4 out 7 (57%) strains. Conversely, fungicidal endpoint was not achieved in PAFE studies. PAFE results for *C. albicans* complex ( $41.83 \pm 2.18$  h) differed from *C. parapsilosis* complex ( $8.07 \pm 4.2$  h) at the highest tested concentration of micafungin. In conclusion, micafungin showed significant differences in PAFE against *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes, being PAFE for the *C. albicans* complex longer than for the *C. parapsilosis* complex.



## Introduction

Invasive candidiasis is a leading cause of mortality worldwide, being *Candida albicans* the predominant cause of candidemia and invasive candidiasis. However, candidiasis due to non-*C. albicans* species, such as *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, are increasing. Some of these species exhibit resistance or reduced susceptibility to fluconazole and other triazoles, echinocandins or amphotericin B. *C. parapsilosis* is associated to infections in neonates and young adults, usually related to the presence of central venous catheter and hyperalimentation [1]. *C. parapsilosis* is usually susceptible to most antifungal agents, but there are reports of infections caused by isolates with decreased susceptibility to azoles and echinocandins [2]. Molecular identification methods have unveiled new cryptic species within *C. albicans* and *C. parapsilosis* species complexes, such as *Candida dubliniensis* and *Candida africana* within the *C. albicans* complex or *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis* within *C. parapsilosis* complex. These cryptic species show differences in antifungal susceptibility and virulence, being their epidemiology and antifungal susceptibility a matter of increased interest [3-5].

Micafungin inhibits the synthesis of 1,3- $\beta$ -D-glucan, an essential molecule of many pathogenic fungi wall architecture, and exhibits an excellent activity against a great number of *Candida* species many resistant to azoles [6]. Thus, micafungin is a very useful drug for the first line therapy of invasive candidiasis [7].

Postantifungal effect (PAFE) allows for sustained killing of fungus when it is exposed briefly to an antifungal, being a concentration-dependent process [8]. The existence of PAFE depends on both the fungal species and the class of the antifungal drug. Whereas antifungal drugs that have long PAFE may be given less frequently, the antifungal drugs with short PAFE may require a frequent administration [9]. For this reason, the PAFE may have a main clinical relevance in the design of dosing regimens for antifungal agents, such as micafungin. The PAFE of micafungin

against various species of *Candida* has been evaluated in a few studies [10-13]. The aim of this study was to determinate the PAFE of micafungin against the species inside of the *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes.

## Materials and Methods

### Microorganisms

A total of 21 *Candida* strains were selected for testing: 14 strains from the *C. albicans* complex (*C. albicans*: 5 blood isolates [UPV/EHU 99-101, 99-102, 99-103, 99-104 and 99-105] and 2 reference strains [NCPF 3153 and 3156]; *C. dubliniensis*: 4 blood isolates [UPV/EHU 00-131, 00-132, 00-133, 00-135] and 1 reference strain [NCPF 3949]; *C. africana*: 1 vaginal isolate [UPV/EHU 97-135] and 1 reference strain [ATCC 2669]) and 7 strains from the *C. parapsilosis* complex (*C. parapsilosis sensu stricto*: 1 blood isolate [UPV/EHU 09-378] and 2 reference strains [ATCC 22019 and ATCC 90018]; *C. metapsilosis*: 1 blood isolate [UPV/EHU 07-045] and 1 reference strain [ATCC 96143]; *C. orthopsilosis*: 1 blood isolate [UPV/EHU 07-035] and 1 reference strain [ATCC 96139]). Fungal isolates were obtained from the culture collection of the Laboratorio de Micología Médica, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Bilbao, Spain. Isolates were identified by their metabolic properties using the ATB ID 32C method (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and by molecular methods, as previously described [14,15].

### Antifungal Agents

Micafungin (Astellas Pharma, Madrid, Spain) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), to obtain a stock solution of 5120 µg/ml. The dilutions were prepared in RPMI 1640 medium with L-glutamine, 0.2% glucose and without NaHCO<sub>2</sub> buffered to pH 7 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Stock solutions were stored at – 80 °C until use.

## In Vitro Susceptibility Testing

MICs, defined as minimum concentrations that produce  $\geq 50$  growth reduction, were determined following M27-A3 and M27-A3 S4 documents [16,17]. All MICs were measured in RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS and results were read after 24 h of incubation.

## Time-Kill Procedures

Time-kill studies (TK) were performed as previously described [18-20]. Strains were subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) plates prior to testing. Cell suspensions were prepared in sterile water by picking 3 to 5 colonies from a 24 h culture and the resulting suspension was prepared at 1 McFarland ( $\approx 10^6$  CFU/ml). One milliliter of the cell suspension was added to vials containing 9 ml of RPMI. TK were carried out on microtiter plates for the BioScreen C computer-controlled microbiological incubator (BioScreen C MBR, LabSystems, Helsinki, Finland) in RPMI (final volume 200  $\mu$ l) by using an inoculum of  $1-5 \times 10^5$  CFU/ml. On the basis of MICs, micafungin concentrations tested were 0.12, 0.5 and 2  $\mu$ g/ml for the *C. albicans* complex and 0.25, 2 and 8  $\mu$ g/ml for the *C. parapsilosis* complex. These micafungin concentrations are achieved in serum after standard therapeutic doses [21]. Inoculated plates were incubated 48 h at  $36 \pm 1$  °C ( $30 \pm 1$  °C for *C. africana*). At predetermined time points (0, 2, 4, 6, 24, and 48 h), 10  $\mu$ l (0-6 h) or 6  $\mu$ l (24-48 h) were collected from each culture well (control and test solution wells), serially diluted in phosphate buffered saline (PBS) and aliquots plated onto SDA. The lower limit of accurate and reproducible detectable colony forming units (CFU) counts was 200 CFU/ml. When the CFUs were expected to be less than 200 per milliliter, samples of 5  $\mu$ l were taken directly from the test solution and plated. After incubation of the plates at  $36 \pm 1$  °C for 48 h ( $30 \pm 1$  °C for *C. africana*), *Candida* colonies were counted. Each experiment was performed twice for each isolate. Plots of averaged colony counts ( $\log_{10}$  CFU/ml) versus time were constructed and compared against a growth control (in the absence of drug). Also the antifungal carryover effect was determined as formerly reported [22].

## PAFE

PAFE studies were performed as described previously with slight differences [23]. Standard 1 McFarland turbidity cell suspensions were prepared in sterile distilled water, from which 1 ml was added to 9 ml of RPMI. Micafungin concentrations were the same as described for the TK. Following an incubation of 1 h, micafungin was removed by a process of 3 cycles of repeated centrifugations (2000 rpm, 10 min) and washed with PBS. After the final centrifugation, the fungal pellet was suspended in 600  $\mu$ l of RPMI. All samples were incubated on microtiter plates for the BioScreen C at  $36 \pm 1$  °C, with a final volume of 200  $\mu$ l. At the same predetermined time points described for the TK, samples were serially diluted in PBS and inoculated onto a SDA plate for CFU counting. When the colony counts were expected to be less than 200 CFU/mL, samples of 5  $\mu$ l were taken directly from the test solution and plated. After incubation of the plates at  $36 \pm 1$  °C for 48 h, *Candida* colonies were counted. The lower limit of accurate and reproducible detectable colony counts was 200 CFU/ml. PAFE was calculated for each isolate as the difference in time required for control (in the absence of drug) and treated isolates to grow 1  $\log_{10}$  following drug removal. PAFE was also determined using the following equation:  $\text{PAFE} = T - C$ , where T = time required for counts in treated cultures to increase by 1  $\log_{10}$  unit above that seen following drug removal and C = time required for counts in control to increase by 1  $\log_{10}$  unit above that following the last washing.

## PAFE and TK data comparison

Fungicidal activity was described as a  $\geq 3 \log_{10}$  (99.9%) reduction, and fungistatic activity was defined as a  $< 99.9\%$  reduction in CFU from the starting inoculum size [24]. Plots of averaged colony counts ( $\log_{10}$  CFU per milliliter) versus time were constructed and compared against a growth control. The ratios of the log killing during PAFE experiments to the log killing during time kill experiments were calculated. Time-kill and PAFE experiments were performed simultaneously.

## Statistical Analysis

Analysis of variance was performed to determine significant differences in PAFE (in hours) among species and concentrations, using GraphPad Prism™ 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA; USA). A  $p$  value  $< 0.05$  was considered significant.

## Results

No antifungal carryover effect was detected in TK. Micafungin MICs for isolates from *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes are shown in Table 1.

**Table 1.** Micafungin MICs for *C. albicans* and *C. parapsilosis* complex strains.

Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	0.25
<i>C. albicans</i> NCPF 3156	0.12
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-101	0.25
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-102	0.25
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-103	0.12
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-104	0.25
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-105	0.12
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	0.25
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-131	0.25
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-132	0.12
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-133	0.12
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-135	0.06
<i>C. africana</i> UPV/EHU 97-135	0.12
<i>C. africana</i> ATCC 2669	0.06
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	1
<i>C. parapsilosis</i> UPV/EHU 09-378	2
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	2
<i>C. metapsilosis</i> UPV/EHU 07-045	2
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	1
<i>C. orthopsilosis</i> UPV/EHU 07-035	1

The results of TK and PAFE experiments for *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* are shown in Table 2. Micafungin showed prolonged PAFE ( $\geq 37.5$  h) against all strains of *C. albicans* complex with 2  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.0001$ ). With one of these strains (UPV/EHU 99-101) PAFE was  $> 43$  h with 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . During TK tests, micafungin was fungicidal against 5 out of 14 (36%)

strains of *C. albicans* complex (*C. albicans* NCPF 3156, UPV/EHU 99-101, 99-102, 99-105 and *C. dubliniensis* UPV/EHU 00-135). The extent of micafungin log-killing in TK ranged from 0.08 to 5.22 log at 2 µg/ml. After micafungin removal in PAFE experiments, fungicidal endpoint was achieved against 2 out of 14 (14%) strains of *C. albicans* complex (*C. albicans* UPV/EHU 99-102 and *C. dubliniensis* UPV/EHU 00-135). Moreover, the extent of killing during PAFE experiments ranged from 0.28 to 4.67 log with 2 µg/ml.

The mean value of PAFE/TK ratio was 43.25 (with 2 µg/ml) for *C. albicans* complex. Against 4 out of 14 strains (29%), the PAFE/TK ratio of micafungin at the highest tested concentration was 100, indicating that 1-hour exposure to micafungin accounted for up to 100% of the overall killing observed during TK. Additionally, a ratio of 100 at concentrations  $\leq 2$  µg/m was observed for *C. africana* (Table 2).

**Table 2.** PAFE results for *C. albicans* complex.

Isolate	Micafungin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Killing (log)		PAFE/TK <sup>1</sup>	PAFE (h)
		TK	PAFE		
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	0.12	0.21	NA <sup>2</sup>		0
	0.5	0.38	NA		0
	2	0.08	0.28	100	> 44
<i>C. albicans</i> NCPF 3156	0.12	NA	NA		0
	0.5	1.49	NA		0
	2	5.07	1.55	0	> 42
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-101	0.12	2.25	0.56	2.04	0
	0.5	2.85	1.58	5.37	> 43
	2	5.1	1.81	0	> 43
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-102	0.12	1.54	0.65	12.89	2.4
	0.5	2.26	0.42	1.44	0
	2	5	4.67	46.77	> 39.46
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-103	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	NA		0
	2	1.49	0.52	10.68	> 44
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-104	0.12	NA	0.27		0
	0.5	NA	0.02		0
	2	0.46	0.63	100	> 42
<i>C. albicans</i> UPV/EHU 99-105	0.12	0.63	0.62	98	0
	0.5	2.62	0.52	0.8	0
	2	5.22	0.55	0	> 42
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	0.12	0.12	0.04	82.56	0
	0.5	NA	0.11		0
	2	0.5	0.21	51.27	> 42
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-131	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	NA		20
	2	0.43	NA		44
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-132	0.12	NA	NA		0
	0.5	NA	NA		0
	2	0.51	NA		> 44
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-133	0.12	NA	NA		0
	0.5	0.02	NA		0
	2	0.7	0.4	50.1	42
<i>C. dubliniensis</i> UPV/EHU 00-135	0.12	0.86	NA		0
	0.5	2.22	0.24	1.05	0
	2	5	4.67	46.77	> 42
<i>C. africana</i> ATCC 2669	0.12	0.1	0.12	100	0
	0.5	0.1	0.12	100	0
	2	0.19	0.28	100	> 37.7
<i>C. africana</i> UPV/EHU 97-135	0.12	0.12	0.01	77.27	0
	0.5	0.08	0.24	100	3
	2	0.46	0.58	100	> 37.5

<sup>1</sup>Ratio of the log killing during PAFE experiments to the log killing during time-kill experiments

<sup>2</sup>NA, not applicable (without any reduction in colony counts compared with the starting inoculum)

Table 3 summarizes the results of time-kill and PAFE experiments for *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* at each micafungin concentration. During TK, micafungin at 8 µg/ml caused significant reductions from the starting inoculum of each strain, with a killing activity that ranged from 1.67 to 5.43 log. However, during PAFE experiments, 1-hour exposure of the strains to micafungin did not cause important reductions in colony counts. PAFE of micafungin ranged 3.8 to 15.7 h (with 8 µg/ml); the longest PAFE (15.7 h) was reached against *C. parapsilosis* UPV/EHU 09-378. Micafungin at 8 µg/ml demonstrated fungicidal activity in TK against 4 out 7 (57%) strains from *C. parapsilosis* complex (*C. parapsilosis* UPV/EHU 09-378, *C. metapsilosis* ATCC 96143, UPV/EHU 07-045 and *C. orthopsilosis* ATCC 96139). However, after micafungin removal in PAFE experiments, it was not reached fungicidal endpoint against any of the tested strains. The lack of similarity between TK and PAFE data was also detected in the mean PAFE/TK ratio of 0.49, with 8 µg/ml, suggesting that 1-hour exposure to micafungin accounted for only a 2% of the overall killing observed during time-kill experiments; only one strain, *C. parapsilosis* UPV/EHU 09-378, showed a ratio of 100, with 2 µg/ml (Table 3).



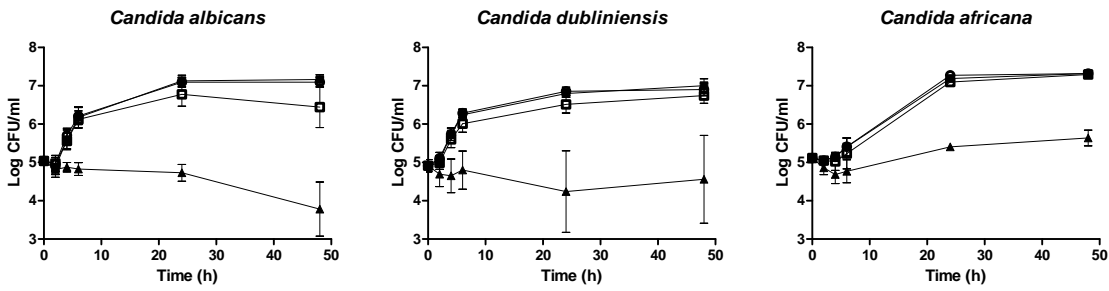
**Table 3.** PAFE results for *C. parapsilosis* complex.

Isolate	Miconazole ( $\mu\text{g/ml}$ )	Killing (log)		PAFE/TK <sup>1</sup>	PAFE (h)
		TK	PAFE		
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0.25	NA <sup>2</sup>	NA		0
	2	NA	NA		0
	8	1.67	0.08	2.56	6
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0.25	0.16	NA		0
	2	0.12	NA		0
	8	2.12	0.07	0.89	5.3
<i>C. parapsilosis</i> UPV/EHU 09-378	0.25	NA	NA		0
	2	0.07	0.31	100	0
	8	5.27	0.22	0	15.7
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	0.25	0.02	NA		0
	2	NA	NA		0
	8	5.42	NA		5.4
<i>C. metapsilosis</i> UPV/EHU 07-045	0.25	NA	0.03		0
	2	NA	NA		0
	8	5.24	0.11	0	9.3
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	0.25	NA	NA		2
	2	NA	NA		2
	8	5.43	NA		11
<i>C. orthopsilosis</i> UPV/EHU 07-035	0.25	NA	NA		0
	2	NA	NA		0
	8	1.91	NA		3.8

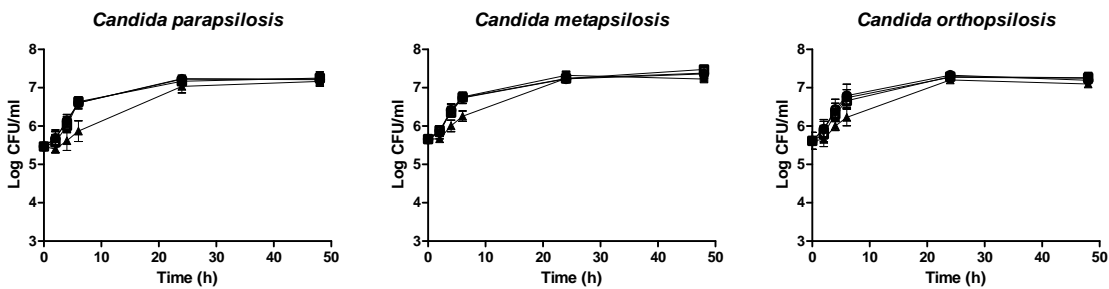
<sup>1</sup>Ratio of the log killing during PAFE experiments to the log killing during TK experiments

<sup>2</sup>NA, not applicable (without any reduction in colony counts compared with the starting inoculum)

PAFE results for *C. albicans* complex ( $41.83 \pm 2.18$  h) differed from *C. parapsilosis* complex ( $8.07 \pm 4.2$  h) with the highest concentration of miconazole tested ( $p < 0.0001$ ). This difference is also evident when comparing *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes curves from PAFE assays (Figs. 1 and 2). Miconazole caused lethality (with  $2 \mu\text{g/ml}$ ) against *C. albicans* complex (Fig. 1) that persisted during the 48 h testing period; however, in Fig. 2 similar log (CFU/ml) slopes between miconazole and control can be observed.



**Figure 1.** Mean TK curves from PAFE assays against 7 *C. albicans*, 5 *C. dubliniensis* and 2 *C. africana* strains. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars). Open circles (○): control; filled squares (■): 0.12 µg/ml; open squares (□): 0.5 µg/ml; filled triangles (▲): 2 µg/ml.



**Figure 2.** Mean TK curves from PAFE assays against 3 *C. parapsilosis sensu stricto*, 2 *C. metapsilosis* and 2 *C. orthopsilosis* strains. Each data point represents the mean result  $\pm$  standard deviation (error bars). Open circles (○): control; filled squares (■): 0.25 µg/ml; open squares (□): 2 µg/ml; filled triangles (▲): 8 µg/ml.

## Discussion

TK and PAFE experiments of micafungin against *Candida* have usually included a low number of isolates [10-13]. This is the first study that has evaluated PAFE of micafungin against *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. *C. dubliniensis* and *C. africana* are cryptic species from *C. albicans*. Similarly *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* are cryptic species from *C. parapsilosis*. These species have different in vitro susceptibility to antifungal agents [3,4,25]. Additionally, PAFE is an important factor in both dose interval choice and outcome.

MICs for *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes were consistent with other studies of micafungin activity in vitro against these species [26]. Moreover, we also found that micafungin reached fungicidal endpoint against 4 out of 7 strains of *C. albicans* (with 2 µg/ml) and against 1 out of 3 strains of *C. parapsilosis* (with 8 µg/ml), during TK experiments. This fungicidal activity has also been reported by Smith et al. [11] against both species.

After micafungin removal, Nguyen et al. [11] observed fungicidal activity against 1 out 4 strains of *C. albicans*, 1 out of 3 strains of *C. parapsilosis*, 2 out of 3 strains of *C. glabrata* and 1 out of 2 strains of *C. krusei* (with range concentrations 0.12 to 8 µg/ml). Similarly, in the current study, the fungicidal endpoint was reached against 1 out of 7 strains of *C. albicans* at the highest tested concentration (2 µg/ml). Nevertheless, after micafungin removal, no fungicidal endpoint was achieved against *C. parapsilosis* [11].

Micafungin (8 µg/ml) displayed PAFE against *C. parapsilosis* complex that ranged from 3.8 to 15.7 h, being the longest PAFE against *C. parapsilosis* UPV/EHU 09-378. These results are similar to previous reported by Smith et al. [10] Other authors have demonstrated that a short exposure (1 h) of *C. albicans* to low concentrations (0.125 to 1 µg/ml) of micafungin, resulted in a PAFE of 5 h [12]. Our current findings demonstrate that micafungin produced a longer PAFE against *C. albicans* than those previously reported, being the PAFE > 40 h with 2 µg/ml against all strains. Manavathu et al. [12] compared PAFE of different antifungal drugs against *C. albicans* and

*Aspergillus fumigatus* and stated that antifungal drugs with fungicidal activity tend to possess longer PAFE than fungistatic ones. On the other hand, Ernst et al. [23] observed that fluconazole displayed no measurable PAFE against none of the studied microorganisms, while echinocandins displayed prolonged PAFE of greater than 12 h against *C. albicans* with concentrations  $\leq 0.12$   $\mu\text{g/ml}$ . Our current findings differed from these ones, as no measurable PAFE was detected against *C. albicans* at such low micafungin concentrations (0.12  $\mu\text{g/ml}$ ) except for one strain, UPV/EHU 99-102. In order to investigate the effect of exposure time on the observed PAFE, Ernst et al. studied the PAFE of caspofungin and amphotericin B after 0.25, 0.5 and 1 h exposure times concluding that PAFE was not affected by the exposure time: 0.25 h exposure produced the same PAFE as 1 h exposure [23]. Similarly, Moriyama et al. reported that the maximum PAFE against *Candida* occurred with caspofungin exposures of 5 or 15 minutes [8]. As performed in other PAFE experiments, in which PAFE was determined after 1 h exposure [10-12], we have studied the PAFE of micafungin after 1 h exposure.

In another study, Ernst et al. also found PAFE with micafungin against *C. albicans*, *C. kerusei*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*, [13]. Micafungin and anidulafungin had greater activity than caspofungin, and none of the echinocandins depicted fungicidal activity against *C. parapsilosis*. However, the three echinocandins reached the fungicidal endpoint against *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* [19]. Results from our study differ from these reports as we have found that micafungin was fungicidal only against one strain of *C. parapsilosis*.

Previous studies have evaluated PAFEs of anidulafungin and caspofungin against *Candida*, and have shown that anidulafungin achieved fungicidal activity against *C. parapsilosis*, but not against *C. albicans*, and caspofungin did not show fungicidal activity [27,28].

Our PAFE studies demonstrated that micafungin produced concentration-dependent, strain-dependent and complex-dependent antifungal activity following drug removal. PAFE was measurable at the higher concentration, and this effect was enhanced by increasing the

concentration of the antifungal drug, with highest concentration resulting in the longest PAFE in each case. One of the most notable findings of this study was the PAFE of micafungin against *C. albicans* complex. Micafungin exerted prolonged PAFE against *C. albicans* complex, and 1 h exposure to micafungin accounted for up to 100% of the overall killing observed during TK experiments in 29% of the studied strains. The results are consistent with a rapid onset of anticandidal activity of micafungin, which might be explained by a rapid association with its target (1,3- $\beta$ -D-glucan synthase). Alternatively, it has also been suggested that the drug, as a large lipopeptide with a fatty acid side chain, could rapidly intercalate with the phospholipid bilayer of the *Candida* cell membrane and subsequently access its target over time [29].

Recently, Ellepola et al. studied the PAFE of nystatin, amphotericin B, ketoconazole and fluconazole against oral *C. dubliniensis* isolates, concluding that nystatin, amphotericin B and ketoconazole produced a detectable PAFE, whereas fluconazole did not display any measurable PAFE [30,31]. This finding is consistent with previously published by Ernst et al. [23]. Kovács et al. reported caspofungin PAFE in 2 *C. albicans* strains [32].

In conclusion, micafungin showed significant differences in PAFE against *C. albicans* and *C. parapsilosis* complexes, being PAFE of micafungin for the *C. albicans* complex longer than against the *C. parapsilosis* complex. These differences in the PAFE could be explained by the distinct microorganism growth characteristics, the antifungal drug binding affinity to the targets, or differences in the amount of  $\beta$ -glucan in the fungal cell wall. These PAFE differences for *C. parapsilosis* and other *Candida* species might have important therapeutic implications. The current data could be useful in optimizing dosing regimens for micafungin against *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. However, further animal studies and human clinical trials are needed to explore their potential clinical usefulness and applications.

## References

1. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. Rev Iberoam Micol. 2014;31: 42-48.
2. Moudgal V, Little T, Boikov D , Vazquez JA. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49: 767-769.
3. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. J Clin Microbiol. 2008;46: 150-156.
4. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC , Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005;43: 284-292.
5. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA , Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2008;46: 2659-2664.
6. Emri T, Majoros L, Toth V , Pocsi I. Echinocandins: production and applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97: 3267-3284.
7. Quindós G, Eraso E, Javier Carrillo-Munoz A, Cantón E , Pemán J. In vitro antifungal activity of micafungin. Rev Iberoam Micol. 2009;26: 35-41.
8. Moriyama B, Henning SA, Penzak SR , Walsh TJ. The postantifungal and paradoxical effects of echinocandins against *Candida* spp. Future Microbiol. 2012;7: 565-569.
9. Oz Y, Kiremitci A, Dag I, Metintas S , Kiraz N. Postantifungal effect of the combination of caspofungin with voriconazole and amphotericin B against clinical *Candida krusei* isolates. Med Mycol. 2013;51: 60-65.

10. Smith RP, Baltch A, Bopp LH, Ritz WJ , Michelsen PP. Post-antifungal effects and time-kill studies of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71: 131-138.
11. Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, et al. Characterising the post-antifungal effects of micafungin against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35: 80-84.
12. Manavathu EK, Ramesh MS, Baskaran I, Ganesan LT , Chandrasekar PH. A comparative study of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B, triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53: 386-389.
13. Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ , Klepser ME. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46: 3846-3853.
14. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66: 2315-2322.
15. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67: 1181-1187.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2008.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3 S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth International Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2012.

18. Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E , Quindós G. Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 82: 57-61.
19. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J , del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54: 2194-2197.
20. Cantón E, Pemán J, Hervas D , Espinel-Ingroff A. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68: 864-868.
21. Catalán González M, Montejo Gonzalez JC. Anidulafungin: a new therapeutic approach in antifungal therapy. *Pharmacology of anidulafungin. Rev Iberoam Micol*. 2008;25: 92-100.
22. Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A , Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48: 2477-2482.
23. Ernst EJ, Klepser ME , Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44: 1108-1111.
24. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA , Klepser ME. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49: 345-351.
25. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA , Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*. 2008;46: 2659-2664.



26. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bustamante B, Cantón E, Diekema DJ, Fothergill A, et al. Multicenter study of anidulafungin and micafungin MIC distributions and epidemiological cutoff values for eight *Candida* species and the CLSI M27-A3 broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58: 916-922.
27. Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, et al. Anidulafungin is fungicidal and exerts a variety of postantifungal effects against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53: 3347-3352.
28. Clancy CJ, Huang H, Cheng S, Derendorf H, Nguyen MH. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50: 2569-2572.
29. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 2003;362: 1142-1151.
30. Ellepola AN, Joseph BK, Chandy R, Khan ZU. The postantifungal effect of nystatin and its impact on adhesion attributes of oral *Candida dubliniensis* isolates. *Mycoses.* 2014;57: 56-63.
31. Ellepola AN, Chandy R, Khan ZU. Post-antifungal effect and adhesion to buccal epithelial cells of oral *Candida dubliniensis* isolates subsequent to limited exposure to amphotericin B, ketoconazole and fluconazole. *J Investig Clin Dent.* 2014;doi: 10.1111/jicd.12095.
32. Kovacs R, Gesztelyi R, Perlin DS, Kardos G, Doman M, Berenyi R, et al. Killing rates for caspofungin against *Candida albicans* after brief and continuous caspofungin exposure in the presence and absence of serum. *Mycopathologia.* 2014;178: 197-206.



- ESTUDIO 7 -

Modelización FC/FD de anidulafungina contra los  
complejos de especies *C. albicans*, *C. glabrata* y  
*C. parapsilosis* a partir de datos de tiempo-letalidad in vitro  
estáticos

(International Journal of Antimicrobial Agents 2015; 46: en revisión)



Los valores de CMI de anidulafungina contra el complejo *C. albicans* fueron de 0,03 a 0,06  $\mu\text{g/ml}$ , de 0,06  $\mu\text{g/ml}$  contra el complejo *C. glabrata* y de 1  $\mu\text{g/ml}$  contra el complejo *C. parapsilosis*. En la figura 1 del manuscrito se muestran los ajustes de las curvas de letalidad por el modelo descrito con nueve cepas de referencia de los complejos *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. En la tabla 1 del manuscrito se muestran los parámetros FD determinados para cada cepa individual. La constantes de crecimiento celular ( $K_g$ ) fueron similares en todas las cepas (0,27 - 0,4  $\text{h}^{-1}$ ), excepto para *C. africana* ATCC 2669 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 ( $K_g$  0,12 y 0,13  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente). Tampoco hubo diferencias en la tasa de máximo crecimiento de *Candida* ( $N_{\text{max}}$ ) (7,23 - 7,63 UFC/ml) ni se encontró una correlación significativa entre la  $K_g$  y el efecto máximo de anidulafungina ( $E_{\text{max}}$ ). Las concentraciones de fármaco necesarias estimadas para producir un 50% del efecto máximo ( $\text{EC}_{50}$ ), demostraron que la actividad de la anidulafungina fue especie-dependiente (0,0004 - 3,28  $\mu\text{g/ml}$ ). El valor más alto de  $\text{EC}_{50}$  se obtuvo con *C. parapsilosis* ATCC 22019 (3,28  $\mu\text{g/ml}$ ) y el más bajo con *C. africana* ATCC 2669 (0,0004  $\mu\text{g/ml}$ ). Los máximos valores de  $E_{\text{max}}$ , 2, 1,24 y 0,88  $\text{h}^{-1}$ , se hallaron con *C. glabrata* ATCC 90030, *C. nivariensis* CECT 11998 y *C. brucarensis* NCYC 3133, respectivamente. Los resultados del ajuste de los datos (Figura 1 del manuscrito) y los parámetros estimados (Tabla 1 del manuscrito), indican que el modelo desarrollado para anidulafungina es apropiado y se ajusta bien a nuestros datos.

Finalmente, se realizaron simulaciones de curvas de letalidad de anidulafungina, con el modelo descrito para un régimen de dosificación con una dosis de carga de 200 mg en infusión intravenosa durante 3 h y una dosis de mantenimiento de 100 mg/día durante seis días, con un intervalo de dosificación de 24 h, para las nueve cepas del estudio. No se observó letalidad contra el complejo *C. albicans* pero las curvas de los efectos estaban siempre por debajo de la curva control. Sin embargo, contra el complejo *C. glabrata* se vio una rápida acción fungicida con el régimen de dosificación estudiado. La actividad candidacida observada contra el complejo *C. parapsilosis* fue más lenta.



## In vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of anidulafungin against

### *Candida*

Sandra Gil-Alonso<sup>a,b</sup>, Nerea Jauregizar<sup>b</sup>, Ignacio Ortega<sup>c</sup>, Elena Eraso<sup>a</sup>, Elena Suárez<sup>b</sup> and Guillermo Quindós<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología, (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España

<sup>c</sup>Departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación FAES FARMA, S.A., Bilbao, Bizkaia, España

\* Corresponding author: Dr. Guillermo Quindós, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología (UFI 11/25 “Microbios y Salud”), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Apartado 699, E-48080 Bilbao, Spain. Tel.:+34 94 601 2854; Fax: +34 94 601 3495; E-mail: guillermo.quindos@ehu.es

## Abstract

The aim of the study was to fit anidulafungin in vitro static time-kill data from nine strains of *Candida* with a pharmacokinetic/pharmacodynamic model and use the model to simulate the expected TK curves for a typical dosing regimen. Time-kill data from strains of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* clades were best fit by using an adapted sigmoidal  $E_{\max}$  model. Human published PK data were then used in the model to simulate time-kill curves for each isolate. The data were analyzed with NONMEM. Anidulafungin was effective in a species-dependent way at easily achievable serum levels, against the strains of *C. glabrata* and *C. parapsilosis* clades, as observed with the  $EC_{50}$  estimates. Maximum killing rates constant ( $E_{\max}$ ) values were higher against *C. glabrata* complex strains. Simulations using human PK parameters showed a rapid fungicidal effect against strains of *C. glabrata* clade and against *C. metapsilosis* ATCC 96143 and *C. orthopsilosis* ATCC 96139. In conclusion, we demonstrated that the activity of anidulafungin against *Candida* can be accurately described using an adapted sigmoidal  $E_{\max}$  model. In the future, combining in vitro time-kill data with existing in vivo pharmacokinetic data might be a useful approach in defining optimal antifungal regimens.

## Highlights

- We have established an appropriate in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model for describing the activity of anidulafungin against *Candida*.
- Simulations of the expected time-kill curves for each isolate were made using human pharmacokinetic data based on pharmacokinetic parameters of anidulafungin.
- The mathematical model can be used to simulate expected time-kill data for typical anidulafungin dosing regimens.



## 1. Introduction

Invasive candidiasis remains a significant cause of global morbidity and mortality, especially among patients with underlying immunosuppression. *Candida albicans* remains the predominant cause of candidaemia and invasive candidiasis, accounting for 50% of all cases; however, the incidence of infections due to non-*C. albicans* species, such as *Candida parapsilosis* or *Candida glabrata*, is increasing [1]. These species are closely related to two phenotypically similar cryptic species. *Candida dubliniensis* and *Candida africana* are inside the *C. albicans* clade; *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* are two species closely related to *C. glabrata*, and *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* are newly recognized members of the *C. parapsilosis* complex of species.

The use of anidulafungin, a new class of antifungal agent, to treat serious *Candida* infection is increasing. It inhibits 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase, an enzyme that is necessary for the synthesis of an essential component of the cell wall of several fungi. There are reports of species with decreased susceptibility to anidulafungin, as isolates of *Candida parapsilosis* or *Candida glabrata* [2-4].

The parameter most commonly used to quantify the antifungal activity of drugs is usually the minimum inhibitory concentration (MIC). Although MIC is a well established in vitro pharmacodynamic (PD) parameter routinely determined in microbiology, this parameter has several disadvantages. For instance, MIC does not provide information on the rate of fungal kill, and since the MIC determination depends on the number of microorganisms at a single time-point, many different combinations of growth and kill rates can result for the same MIC.

Antifungal activity is a dynamic process whereas the MIC is only a threshold value, a one-point measurement with poor precision determined in two-fold dilution steps. An alternative PD approach, microbial time-kill (TK) curves, has been proposed to offer detailed information about the antimicrobial efficacy as a function of both time and drug concentration [5,6].

Although TK curves can be studied using animal models of infection, in vitro models offer significant advantages in cost, convenience and time, as well as allowing direct investigation of

the drug-microbe interaction in a controlled and reproducible manner [7]. Once the specific TK experiments have been performed, the results can be accurately described using PD mathematical models and the respective PD parameters can be calculated. Additionally, by using published human pharmacokinetic (PK) data, mathematical models can be used to simulate the expected TK curves for different doses and dosing regimens of an antifungal agent. As such, pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling is a potentially powerful technique for defining optimal antimicrobial treatment strategies [8].

The aims of this study were (1) to establish a general mathematical model that is appropriate for describing the in vitro PK/PD of anidulafungin in static TK curve experiments, and to obtain model parameters, such as, concentrations producing 50% of the maximal effect ( $EC_{50}$ ) and the maximal effect ( $E_{max}$ ), (2) to apply this model in order to compare the in vitro PD features of anidulafungin against different *Candida* strains and (3) to use human PK data to simulate expected TK curves in vivo for a dosing schedule.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungal strains

Nine reference strains were included in this study: *C. albicans* NCPF 3153, *C. dubliniensis* NCPF 3949, *C. africana* ATCC 2669, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. nivariensis* CECT 11998, *C. braccarensis* NCYC 3133, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. metapsilosis* ATCC 96143 and *C. orthopsilosis* ATCC 96139.

### 2.2. Antifungal agents

Anidulafungin (Pfizer SLU, Madrid, Spain) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), to obtain a stock solution of 5120 mg/L. The dilutions were prepared in RPMI 1640 medium with

L-glutamine and without  $\text{NaHCO}_2$  buffered to pH 7 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Stock solutions were stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  until use.

### 2.3. MIC determination

MICs, defined as minimum concentrations that produce  $\geq 50$  growth reduction, were determined following the M27-A3 S4 document [9,10]. All MICs were measured in RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS and results were read after 24 h of incubation.

### 2.4. Time-kill procedures

Before TK curve studies were performed, the antifungal carryover effect was determined as previously described by Cantón et al. [11]. TK studies were performed as previously described [12-15]. Time-kill studies were carried out on microtitre plates for the computer-controlled microbiological incubator BioScreen C (MBR, LabSystems, Vantaa, Finland) in RPMI (final volume 200  $\mu\text{L}$ ) by using an inoculum size of  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL. Anidulafungin concentrations assayed ranged from 0.015 to 32 mg/L. Plates were incubated 48 h at  $36 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  ( $30 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  for *C. africana*) without agitation. At predetermined time points (0, 2, 4, 6, 24, and 48 h), 10  $\mu\text{L}$  (0-6 h) or 6  $\mu\text{L}$  (24-48 h) were removed from both the control well (without drug) and each test solution well and serially diluted in phosphate buffered saline (PBS) to determine the number of CFU/mL. Volumes of 5, 10, 50 or 100  $\mu\text{L}$  (depending on the dilution and concentration of the drug) were plated onto Sabouraud dextrose agar (SDA) and incubated at  $36 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  ( $30 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  for *C. africana*) for 24 to 48 h. When the colony counts were expected to be less than 200 CFU/mL, samples of 5  $\mu\text{L}$  were taken directly from the test solution and plated. The lower limit of accurate and reproducible detectable colony counts was 200 CFU/mL. TK curve studies were conducted in duplicate and on two different days.

## 2.5. Mathematical modelling of TK data

TK curve analysis and mathematical modelling of the TK curve data were performed using a nonlinear mixed-effect approach as appropriate with NONMEM 7 (ICON Development solutions, USA).

A previously described adapted  $E_{\max}$  model [16] was tried to fit to the log-transformed data of the static TK curve experiments of anidulafungin. This model accounts for delays in *Candida* growth and onset of killing, as well as the maximum number of *Candida*:

$$\frac{dN}{dt} = \left[ K_g \left( 1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) \cdot (1 - e^{-\alpha t}) - \left( \frac{E_{\max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \cdot (1 - e^{-\beta t}) \right] \cdot N$$

In this model,  $dN/dt$  is the change in the number of *Candida* as a function of time,  $K_g$  ( $h^{-1}$ ) is the cell growth rate constant in the absence of drug,  $E_{\max}$  is the maximum killing rate constant (i.e. maximum effect),  $EC_{50}$  (mg/L) is the drug concentration necessary to produce 50% of maximum effect,  $C$  (mg/L) is the concentration of antifungal drug at any time ( $t$ ) and  $N$  is the number of viable *Candida* (CFU/mL).

This model also took into account: 1) In in vitro systems, available space and nutrients are limited. The factor that accounts for the resulting saturation in growth is the maximum number of fungal ( $N_{\max}$ ); 2) Isolates have not reached yet the logarithmic growth phase at time zero, i.e. delay in growth:  $(1 - e^{-\alpha t})$ ; 3) Delay of the onset of killing:  $(1 - e^{-\beta t})$ ; 4) A Hill factor or shape factor ( $h$ ) modified the steepness of the slopes and smoothed the curves.

Since anidulafungin concentrations did not change during the TK experiments,  $C$  was constant for the entire fitted time period. For each fungal strain, the initial estimate of  $K_g$ ,  $N_{\max}$  and  $\alpha$  were determined using control data. Thereafter,  $K_g$ ,  $N_{\max}$  and  $\alpha$  were fixed in each model at their determined values, whereas the drug parameters  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $\beta$  and  $h$  were fitted simultaneously to the experimental data.

A first order conditional estimation method algorithm was used, as implemented in the non linear mixed effect modelling software NONMEM 7. Interindividual variability of the model parameters was not included in the final model because the fungal inocula were obtained from a pure culture so that all the experimental fungal cultures were assumed to be genetically identical. The residual variability was estimated by using additive model. Evaluation of the model performance included the analysis of standard diagnostic plots, objective function value and the precision of the parameter estimates, as well as the visual inspection of the data for the quality of fit.

#### 2.6. Simulations of expected TK curves using human PK data

Simulations of the expected TK curves for each isolate were made using human PK data obtained from in vivo PK parameters of anidulafungin ( $t_{1/2} = 25.6$  h;  $V_d = 33.4$  L) [17]. Phoenix WinNonlin (Certara, USA) software program was used to simulate plasma concentration-time profiles for recommended multiple intravenous dosing regimen of anidulafungin (Loading dose/maintenance dose (LD/MD), 200/100 mg with a dosing interval ( $\tau$ ) of 24 hours up to 6 days) and then applied to the adapted  $E_{\max}$  model to simulate in vivo TK curves.

### 3. Results

#### 3.1. MIC determination

Anidulafungin MICs, ranged from 0.03 to 0.06 mg/L for *C. albicans* complex strains, 0.06 mg/L for *C. glabrata* complex strains and 1 mg/L for *C. parapsilosis* complex strains.

#### 3.2. Static TK curves and PD model

The fitted curves for the described model against the nine strains of *Candida* in the absence of anidulafungin (control) or in the presence of constant anidulafungin concentrations are shown in Fig. 1.

The determined PD parameters and their standard error estimate (SEE%) for each individual strain are listed in Table 1. The results indicate that the model chosen is appropriate for fitting the data (Table 1 and Fig. 2). Summarizing the data, the growing rates in the absence of antifungal was similar for the studied isolates (0.27 - 0.4 h<sup>-1</sup>), except for *C. africana* ATCC 2669 and *C. parapsilosis* ATCC 22019, which showed smaller growth rates in the absence of anidulafungin (0.12 and 0.13 h<sup>-1</sup>, respectively). No statistical correlation was obtained between fungal growing rate and anidulafungin maximum effect (maximum killing rate constant). Similarly, no differences in the  $N_{\max}$  fungal parameter was detected (7.23 - 7.63 UFC/mL). The EC<sub>50</sub> values estimated in the present study, demonstrated that anidulafungin was effective in a species-dependent way, against the strains of *C. glabrata* and *C. parapsilosis* clades, at easily achievable serum levels. EC<sub>50</sub> ranged from 0.0004 to 3.28 mg/L. Highest EC<sub>50</sub> value was obtained against *C. parapsilosis* ATCC 22019, while the smallest value was reached against *C. africana* ATCC 2669.

Maximum killing rates constant ( $E_{\max}$ ) values were higher against *C. glabrata* complex strains (2, 1.24 and 0.88 h<sup>-1</sup> for *C. glabrata* ATCC 90030, *C. nivariensis* CECT 11998 and *C. braccarensis* NCYC 3133, respectively) with the highest efficacy against *C. glabrata* ATCC 90030.

### 3.3. Model diagnostics

The diagnostic plots of the final model presented in Fig. 2, show random uniform scatter around the line of identity (Fig. 2A) and suggested the absence of any trend or bias ( $R^2 = 0.94$ ). Weighted residuals were randomly scattered around 0 (Fig. 2B).

### 3.4. Simulations

Fig. 3 shows simulated TK curves in vivo for the standard dosing schedule. The simulated kill curves plotted in Fig. 3 predicted that anidulafungin at the selected dosing regimen (LD/MD 200/100 mg every 24 h) would not show lethality against *C. albicans* NCPF 3153, *C. africana* ATCC 2669 and *C. dubliniensis* NCPF 3949, even the CFU were always below those of control. A rapid fungicidal activity would be obtained against *C. glabrata* ATCC 90030, *C. bracarensis* NCYC 3133 and *C. nivariensis* CECT 11998 with the same dosing schedule. Finally, a rapid fungicidal activity would be exerted against *C. metapsilosis* ATCC 96143 and *C. orthopsilosis* ATCC 96139, and a prolonged fungistatic activity against *C. parapsilosis* ATCC 22019, with reductions from starting inocula that were predicted to exceed 1 Log.

## 4. Discussion

In vitro TK curves are attractive tools for studying the PD of antimicrobial agents as they provide detailed information of antimicrobial efficacy as a function of both time and concentration [5]. In this study we have used a PK/PD approach based on TK curves to evaluate the antifungal efficacy of the echinocandin anidulafungin against nine strains of the clades of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. Although widely used, MICs do not provide a very detailed characterization of antimicrobial activity [7]. Therefore, the most sophisticated TK curve approach was used. To our knowledge, this is the first report of TK curves based PK/PD modelling of anidulafungin.

From the anidulafungin TK curves in experiments with constant concentrations, it can be seen that for certain strains, *C. albicans* NCPF 3153 and especially for *C. africana* ATCC 2669, the rate of antifungal activity did not increase much as antifungal concentrations increased. For the other studied strains, a concentration-dependent response to anidulafungin was observed, as higher starting concentrations resulted in greater growth inhibition or killing.

In our study the lack of correlation between the  $E_{\max}$  parameter of anidulafungin for each strain and the growth rates of the isolates, suggests that the highest kill rates were not achieved against the most rapidly proliferating cells. Conversely, a significant correlation was obtained for voriconazole in a previous study [16]; these differences can be related to the mechanisms of action of the two drugs, as voriconazole inhibits the biosynthesis of cell membrane ergosterol and anidulafungin inhibits the cell wall 1,3- $\beta$ -D-glucan biosynthesis.

The  $EC_{50}$  values estimated with the developed PD model demonstrated that anidulafungin was effective in a species-dependent way at easily achievable serum levels, as we have seen in the simulations performed. The  $EC_{50}$  value estimated for *C. africana* was very low compared to the  $EC_{50}$  for the other species. This may be related to the fact that even at the lowest concentration tested, 0.015 mg/L, the maximal effect was achieved.

Although PD studies comparing the efficacy of various regimens of antifungals are feasible in animal models [18], they are complicated, laborious and expensive. Even many investigators have confirmed that the behaviour of microorganisms in an in vitro environment is not equivalent to that in vivo (e.g., changes in growth characteristics, micro-organism viability, effects of protein binding on antimicrobial activity, immune defence system, etc.), in vitro TK permit direct, controlled and reproducible studies of the interaction between antifungal drugs and fungi, and they allow comparisons among different agents and dosing strategies in a more convenient, faster and cheaper way without expending animal lives [5,19].



A limitation of this study design was that anidulafungin concentrations were constant. We will model anidulafungin dynamic TK data, with anidulafungin concentrations changing over time in a manner consistent with the PK profiles in humans.

Similar approaches that combine in vitro TK data with PK data collected in vivo, have been used for antibacterial agents like cefaclor [20] cefpodoxime and cefixime [5], azithromycin [21] and more recently for vertilmicin and ceftazidime [22] and to a small extent, for antifungal drugs such as voriconazole [19] and fluconazole and caspofungin [23]

In conclusion, it was demonstrated that it is possible to fit anidulafungin static TK data accurately using an adapted  $E_{\max}$  sigmoid mathematical model. Moreover, the model can be used to simulate expected TK data for typical anidulafungin dosing regimens. Our approach of combining in vitro TK data with existing in vivo PK data, might serve in the future to define optimal antifungal regimens against candidiasis.

### **Acknowledgments**

Sandra Gil-Alonso had a scholarship from the Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. This work was supported by Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (SPR12UN002, S-PE13UN025) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, and UPV/EHU (UFI 11/25).

## References

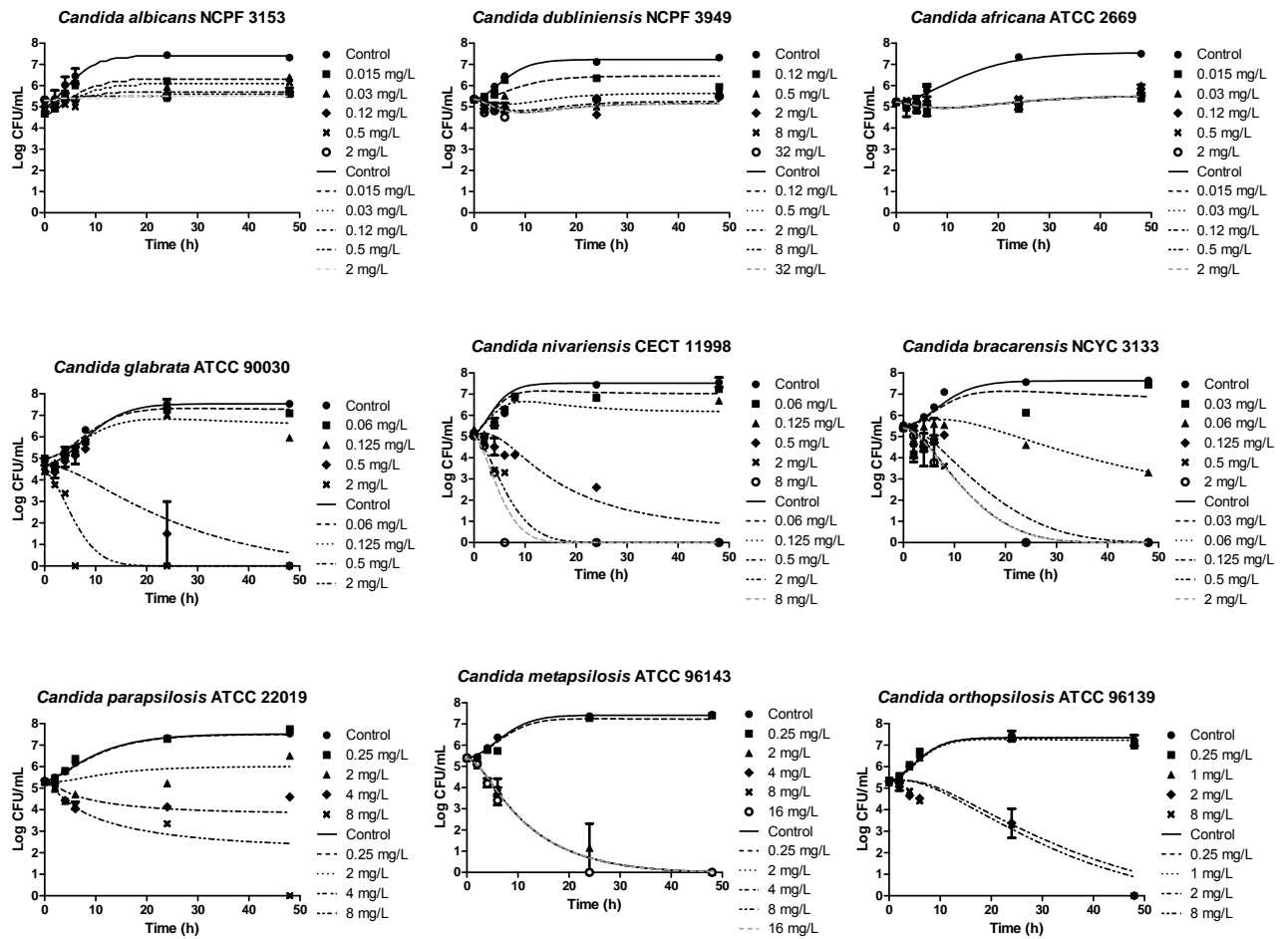
- [1] Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 2014;31:42-8
- [2] Pfaller MA. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012;125:S3-13
- [3] Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: A comparison. *Drugs* 2011;71:11-41
- [4] Bal AM. The echinocandins: Three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:13-8
- [5] Liu P, Rand KH, Obermann B, Derendorf H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibacterial activity of cefpodoxime and cefixime in in vitro kinetic models. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:120-9
- [6] Mueller M, de la Pena A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: Kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:369-77
- [7] Schuck EL, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of anti-infective agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005;3:361-73
- [8] Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev* 2013;65:1053-90
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2008
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3 S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth International Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2012
- [11] Cantón E, Pemán J, Valentín A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. In vitro activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3108-11
- [12] Cantón E, Pemán J, Hervas D, Espinel-Ingroff A. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:864-8
- [13] Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2194-7
- [14] Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. In vitro fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida glabrata*, *candida bracarensis* and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;doi:10.1128/AAC.04474-14

- [15] Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;82:57-61
- [16] Li Y, Nguyen MH, Cheng S, Schmidt S, Zhong L, Derendorf H, et al. A pharmacokinetic/pharmacodynamic mathematical model accurately describes the activity of voriconazole against *Candida* spp. in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:369-74
- [17] Catalán González M, Montejo Gonzalez JC. Anidulafungin: A new therapeutic approach in antifungal therapy. *Pharmacology of anidulafungin. Rev Iberoam Micol* 2008;25:92-100
- [18] Andes D, Marchillo K, Stamstad T, Conklin R. In vivo pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1193-9
- [19] Li Y, Nguyen MH, Cheng S, Schmidt S, Zhong L, Derendorf H, et al. A pharmacokinetic/pharmacodynamic mathematical model accurately describes the activity of voriconazole against candida spp. in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:369-74
- [20] de la Pena A, Grabe A, Rand KH, Rehak E, Gross J, Thyroff-Friesinger U, et al. PK-PD modelling of the effect of cefaclor on four different bacterial strains. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:218-25
- [21] Treyaprasert W, Schmidt S, Rand KH, Suvanakoot U, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of in vitro activity of azithromycin against four different bacterial strains. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:263-70
- [22] Zhuang L, Sy SK, Xia H, Singh RP, Mulder MB, Liu C, et al. Evaluation of in vitro synergy between vertilmicin and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* using a semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:151-60
- [23] Venisse N, Gregoire N, Marliat M, Couet W. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic models of in vitro fungistatic and fungicidal effects against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:937-4

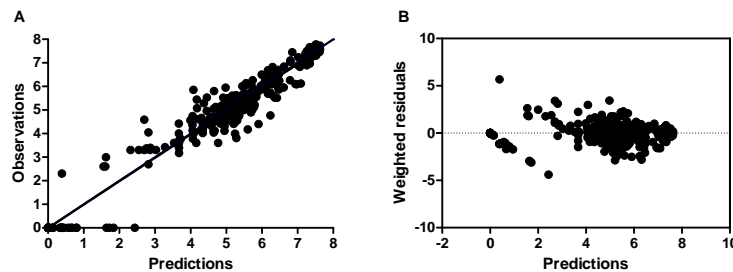
Table 1. Pharmacodynamic parameters estimates and residual variability against *Candida* strains.

Strains	Parameter	$K_g$ ( $h^{-1}$ )	$E_{max}$ ( $h^{-1}$ )	EC <sub>50</sub> (mg/L)	$N_{max}$ (CFU/mL)	$\alpha$	$\beta$	$h$	RV
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	Value	0.3	0.08	0.11	7.4	0.29	0.3	0.69	0.06
	SEE (%)		7.01	54.39			40.67	34.93	28.52
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	Value	0.37	0.11	0.19	7.23	0.15	0.28	1.18	0.06
	SEE (%)		5.45	11.34			24.35	13.9	18.49
<i>C. africana</i> ATCC 2669	Value	0.12	0.03	0.0004	7.57	0.15	0.46	6	0.08
	SEE (%)		3.35	75.25			65.13		32.62
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	Value	0.29	2	1.13	7.54	0.1	0.04	1.74	0.34
	SEE (%)			19.73			29.97	16.67	34.13
<i>C. nivariensis</i> CECT 11998	Value	0.4	1.24	0.89	7.52	0.1	0.09	1.41	0.31
	SEE (%)		26.54	32.15			18.54	16.52	13.89
<i>C. braccarensis</i> NCYC 3133	Value	0.27	0.88	0.09	7.63	0.15	0.03	2.96	0.36
	SEE (%)		54.47	13.5			71.17	23.14	36.87
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Value	0.13	0.10	3.28	7.52	0.38	0.7	2.22	0.31
	SEE (%)		31.7	32.32				25.91	47.08
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	Value	0.39	0.56	0.37	7.41	0.1	0.06	10	0.11
	SEE (%)		27.19	2.84			26.24		62.12
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	Value	0.38	0.63	1.52	7.34	0.15	0.02	10	0.16
	SEE (%)		49.21	3.57			72.17		40.89

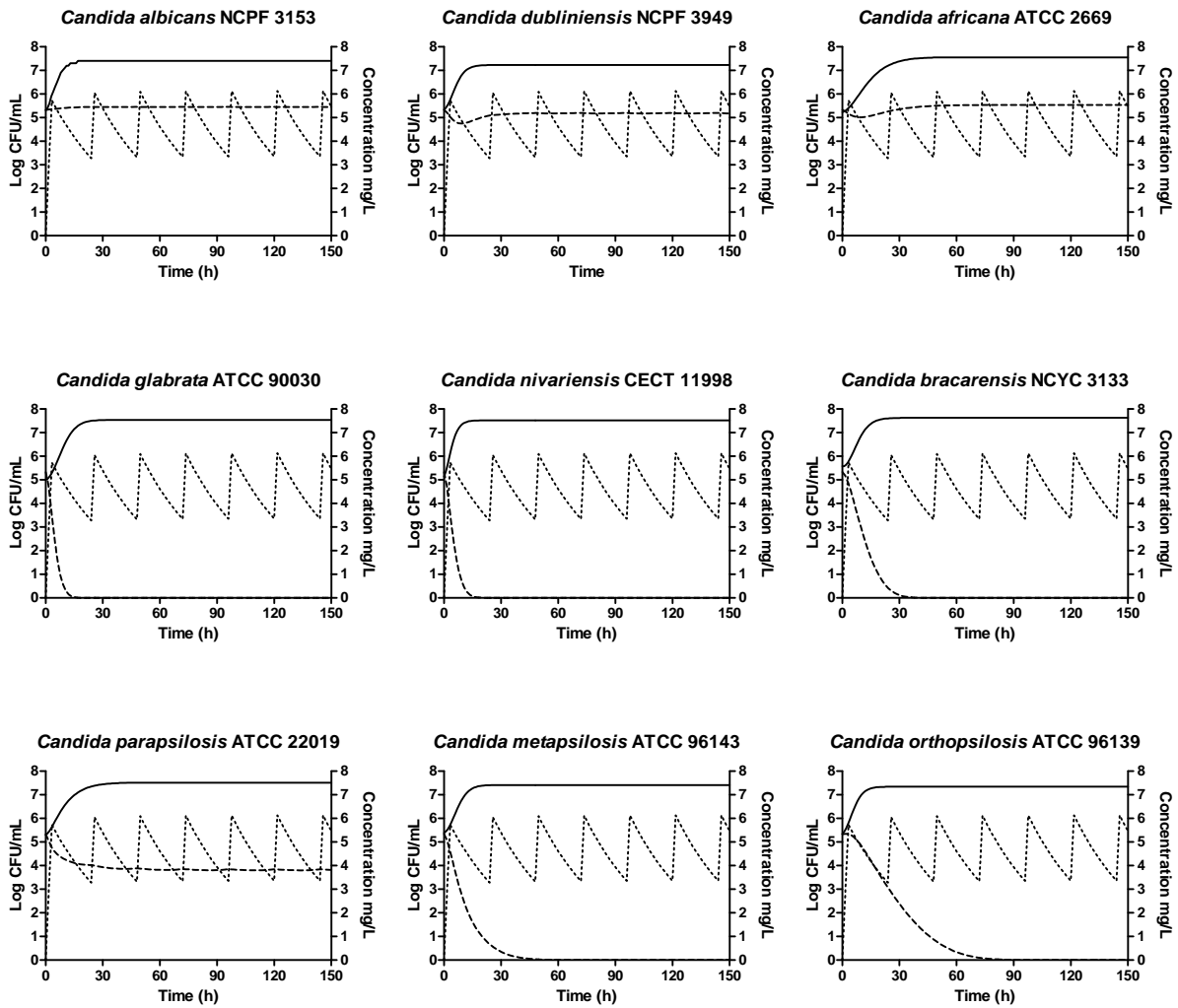
$K_g$ , fungal growth rate constant in the absence of anidulafungin;  $E_{max}$ , maximum killing rate constant (maximum effect); EC<sub>50</sub>, concentration of anidulafungin necessary to produce 50% of maximum effect;  $\alpha$ , constant used to fit the initial lag phase for the growth;  $\beta$ , constant used to fit the initial lag phase for the inhibition or killing;  $N_{max}$ , maximum number of *Candida*; CFU, colony forming units;  $h$ , Hill factor; RV, residual variability; SEE, standard error of estimate.



**Fig. 1.** Fitted TK curves derived by the mathematical model for constant concentrations of anidulafungin. The plots show the number of colony forming units per millilitre (CFU/mL) (means  $\pm$  standard deviation) of the different *Candida* strains for the control experiments without anidulafungin and after exposure to the different initial anidulafungin concentrations. The lines represent the curve fits from the respective data analysis.



**Fig. 2.** Diagnostic plots. (A) Observations versus predictions for anidulafungin against nine reference strains of *Candida*; (B) weighted residuals versus predictions for anidulafungin against nine reference strains of *Candida*.



**Fig. 3.** Simulations of candidal TK log CFU/mL (---) and plasma anidulafungin concentration-time profiles (...) for recommended multiple dosing regimen of anidulafungin (Loading dose/maintenance dose, 200/100 mg with a dosing interval ( $\tau$ ) of 24 h up to 7 days). Control growth is in the absence of drug (—).

- ESTUDIO 8 -

**Modelización FC/FD de anidulafungina contra los  
complejos de especies *C. albicans*, *C. glabrata* y  
*C. parapsilosis* a partir de datos de tiempo-letalidad in vitro  
dinámicos**

(Journal of Antimicrobial Chemotherapy: en redacción)





Los valores de CMI de anidulafungina contra el complejo *C. albicans* fueron de 0,03 a 0,06  $\mu\text{g/ml}$ , de 0,06  $\mu\text{g/ml}$  contra el complejo *C. glabrata* y de 1  $\mu\text{g/ml}$  contra el complejo *C. parapsilosis*.

En la Figura 1 del manuscrito se muestran los ajustes de las curvas de letalidad por el modelo descrito con nueve cepas de referencia de los clados *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Contra *C. albicans* NCPF 3153 y *C. dubliniensis* NCPF 3949, anidulafungina no mostró letalidad, mientras que contra *C. africana* ATCC 2669 el fármaco fue fungistático. Anidulafungina mostró actividad candidacida contra el complejo *C. glabrata*, excepto contra *C. bracarensis* NCYC 3397. Por último, anidulafungina fue fungistática contra *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. orthopsilosis* ATCC 96139, y candidacida contra *C. metapsilosis* ATCC 96143.

En la Tabla 1 del manuscrito se muestran los parámetros FD estimados para cada cepa individual. Las constantes de crecimiento celular ( $K_g$ ) fueron similares en todas las cepas (0.23 - 0.62  $\text{h}^{-1}$ ) menos para *C. dubliniensis* NCPF 3949 ( $K_g$  1.01  $\text{h}^{-1}$ ). La tasa de máximo crecimiento de *Candida* ( $N_{\text{max}}$ ) fue similar en las nueve cepas (6.66 - 8.26 UFC/ml).

La concentración de anidulafungina necesaria para producir el 50% del efecto máximo,  $\text{EC}_{50}$ , fue de 0.01 - 1.2  $\mu\text{g/ml}$ , lo que indica que su actividad es especie-dependiente. Los valores de  $E_{\text{max}}$  estimados fueron similares para todas las cepas (0.14 - 0.41  $\text{h}^{-1}$ ). No se encontró una correlación significativa entre la  $K_g$  y el efecto máximo de anidulafungina ( $E_{\text{max}}$ ).

Los resultados del ajuste de los datos (Figura 1 del manuscrito) y los parámetros estimados (Tabla 1 del manuscrito) indican que el modelo desarrollado para anidulafungina es apropiado y se ajusta bien a nuestros datos.

Mediante la combinación de datos FC de humanos y los parámetros FD estimados a partir de las curvas de letalidad *in vitro*, se realizaron simulaciones de curvas de letalidad de anidulafungina, con el modelo descrito, para un régimen de dosificación habitual de este fármaco. Anidulafungina

no fue letal para *C. albicans* NCPF 3153 y *C. dubliniensis* NCPF 3949. Sin embargo, este fármaco fue fungicida contra *C. africana* ATCC 2669 después de la tercera dosis.

La acción candidacida fue rápida contra *C. nivariensis* CECT 11998, pero a las 30 h desaparecería. Con el mismo régimen de dosificación, anidulafungina fue candidacida contra *C. glabrata* ATCC 90030 y *C. bracarensis* NCYC 3397.

Finalmente, este fármaco fue fungistático contra las especies del complejo *C. parapsilosis*; sin embargo, contra *C. metapsilosis* ATCC 96143 fue fungicida.

**Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and simulation of anidulafungin in an in vitro dynamic model against *Candida***

Sandra Gil-Alonso<sup>a,b</sup>, Nerea Jauregizar<sup>b</sup>, Ignacio Ortega<sup>c</sup>, Elena Eraso<sup>a</sup>, Elena Suárez<sup>b</sup> and Guillermo Quindós<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España,

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Bizkaia, España

<sup>c</sup>Departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación. FAES FARMA, S.A., Bilbao, Bizkaia, España

\* Corresponding author: Dr. Guillermo Quindós, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología (UFI 11/25 “Microbios y Salud”), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Apartado 699, E-48080 Bilbao, Spain. Tel.:+34 94 601 2854; Fax: +34 94 601 3495; E-mail: guillermo.quindos@ehu.es

**Abstract**

Using dynamic time-kill experiments with changing anidulafungin concentrations, it was demonstrated that the drug was fungicidal against *C. glabrata* ATCC 90030, *C. nivariensis* CECT 11998 and *C. metapsilosis* ATCC 96143. Fitting of the data using a modified sigmoid  $E_{\max}$  model resulted in a set of pharmacodynamic parameters ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ) for each fungal strain. The parameters derived from these experiments and pharmacokinetic parameters from human data were used in the model to simulate kill-curves for a typical treatment regimen. The simulated kill curves predicted that anidulafungin at the standard dosing regimen would exert fungicidal activity against *C. africana* ATCC 2669, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. nivariensis* CECT 11998, *C. bracarensis* NCYC 3397 and *C. metapsilosis* ATCC 96143. These results demonstrated that PK/PD modelling provides an innovative approach in assist dose selection.

## 1. Introduction

Anidulafungin is a new class of antifungal agents that inhibits 1,3- $\beta$ -D-glucan synthesis, causing fungistatic as well as fungicidal effects. The use of this drug to treat candidemias is increasing.

The MIC, is the lowest concentration that inhibits visible growth of the organism as detected by the unaided eye, after 24 h for echinocandins. It is the vitro reference value that describes the activity of antimicrobial agents against microorganism (Mouton and Vinks, 2005; Mueller et al., 2004), but other approaches, such as pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling based on dynamic time-kill curves may be assess the efficacy of antimicrobial agents.

In this study, a dynamic time-kill methodology was developed in which anidulafungin concentrations mimic the human serum PK profile. The purposes of this study were (i) to establish a general mathematical model that is appropriate for characterizing the in vitro PD of anidulafungin and obtain PD parameters (ii) to apply this model in order to compare the in vitro pharmacodynamic features of anidulafungin against different *Candida* species (iii) the mathematical model was then fit to the changing concentration time-kill curves and human PK data were used to simulate expected kill curves in vivo.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungal strains

Nine reference strains were included in this study. *C. albicans* NCPF 3153, *C. dubliniensis* NCPF 3949, *C. africana* ATCC 2669, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. nivariensis* CECT 11998, *C. bracarensis* NCYC 3397, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. metapsilosis* ATCC 96143 and *C. orthopsilosis* ATCC 96139.

## 2.2. Antifungal agents

Anidulafungin (Pfizer SLU, Madrid, Spain) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), to obtain a stock solution of 5120 mg/L. The dilutions were prepared in RPMI 1640 medium with L-glutamine and without NaHCO<sub>2</sub> buffered to pH 7 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Stock solutions were stored at – 80 °C until use.

## 2.3. MIC determination

MICs, defined as minimum concentrations that produce  $\geq 50$  growth reduction, were determined following the M27-A3 and the M27-A3 S4 document (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). All MICs were measured in RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS and results were read after 24 h of incubation.

## 2.4. In vitro PK/PD infection model

Before time-kill curve studies were performed, the antifungal carryover effect was determined as previously described by Cantón et al. (Cantón et al., 2009). Dynamic time-kill experiments were conducted as previously described by other authors (Li et al., 2008; Venisse et al., 2008) with slight differences. A one-compartment in vitro infection model was developed to simulate exponentially changing drug concentrations of anidulafungin in the presence of viable *Candida* cells. The glass compartment (Ilmabor, Scharlab, Spain) was filled with 400 mL of RPMI 1640 containing only a fungal culture (for the control growth experiment) or a fungal culture and anidulafungin. The compartment contained a magnetic stir bar for continuous mixing and sample ports. A peristaltic pump (Masterflex L/S, Cole-Parmer, USA) continuously supplied and removed the culture broth from the central compartment at a flow rate adjusted to simulate a half-life equal to  $t_{1/2} = 25.6$  h. The system was maintained at  $36 \pm 1$  °C ( $30 \pm 1$  °C for *C. africana*) throughout the experiment. The starting inoculum of *Candida* in the central compartment was

$1 - 5 \times 10^5$  colony forming units/mL (CFU/mL). Immediately after the introduction of the inoculum, anidulafungin was introduced into the central compartment to yield a predefined concentration of 5,47 mg/L. After the introduction of the antifungal, samples were taken from the central compartment (control compartment and drug containing compartment) at 0, 2, 4, 6, 24 and 48 h. The samples were then serially diluted 1:10 in phosphate buffered saline (PBS), and 100  $\mu$ l aliquots were plated onto Sabouraud dextrose agar (SDA). After 48 h of incubation at  $36 \pm 1$  °C ( $30 \pm 1$  °C for *C. africana*), the CFU were counted, and the results were expressed in CFU/mL.

The lower limit of accurate and reproducible detectable colony counts was 200 CFU/mL. When the colony counts were expected to be less than 200 CFU/mL, samples of 100  $\mu$ L were taken directly from the central compartment (with drug) and plated. The time-kill curve studies were conducted in duplicate and on two different days. Anidulafungin concentrations were verified by high-performance liquid chromatography (HPLC).

## 2.5. Mathematical modelling of time-kill data

Data were analyzed with NONMEM 7 (ICON Development solutions, USA). A previously described adapted and modified  $E_{\max}$  model (Li et al., 2008) was fit to the log-transformed data from the dynamic time-kill curve experiments of anidulafungin. This model accounts for delays in *Candida* growth and onset of killing and the maximum number of *Candida*. Because the in vitro model operates by dilution, a correction for fungal loss due to broth renewal was introduced in the PK/PD model.

$$\frac{dN}{dt} = \left[ K_g \left( 1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) \cdot (1 - e^{-\alpha t}) - \left( \frac{E_{\max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \cdot (1 - e^{-\beta t}) - K_e \right] \cdot N$$

In this model,  $dN/dt$  is the change in the number of *Candida* as a function of time,  $K_g$  ( $h^{-1}$ ) is the candidal growth rate constant in the absence of drug,  $E_{\max}$  ( $h^{-1}$ ) is the maximum killing rate

constant (i.e. maximum effect),  $EC_{50}$  (mg/L) is the drug concentration necessary to produce 50% of maximum effect,  $C$  (mg/L) is the concentration of antifungal drug at any time ( $t$ ) and  $N$  (colony forming units CFU/mL) is the number of viable *Candida*.

This model also took into account: 1) In in vitro systems, available space and nutrients are limited. The factor that accounts for the resulting saturation in growth is the maximum number of fungal ( $N_{max}$ ); 2) Isolates had not reached yet the logarithmic growth phase at time zero, i.e. delay in growth:  $(1 - e^{-\alpha t})$ ; 3) Delay of the onset of killing:  $(1 - e^{-\beta t})$ ; 4) A Hill factor or shape factor ( $h$ ) modified the steepness of the slopes and smoothed the curves; 5) A correction for fungal loss, where  $K_e$  corresponds to the elimination rate constant due to broth renewal.  $K_e$  was set equal to  $0.027 \text{ h}^{-1}$ , corresponding to the 25.6 h anidulafungin elimination half-life.

All data from the experiments were fit simultaneously in a single analysis. PK parameters were fixed in the PK/PD model and set equal to their selected values ( $V_d = 400 \text{ mL}$ , where  $V_d$  is the volume corresponding to the bulk volume in the glass compartment, and  $CL = 10.8 \text{ mL/h}$ , where  $CL$  is clearance, accounting for an elimination half-life of 25.6 h with the 400 mL volume).

A single estimated value of *Candida*-related parameters ( $K_g$ ,  $N_{max}$ ,  $\alpha$ ) was obtained by fitting the data from the control data with the PK/PD model. Thereafter,  $K_g$ ,  $N_{max}$  and  $\alpha$  were fixed in each model at their determined values. The anidulafungin-related PK/PD parameters ( $EC_{50}$ ,  $E_{max}$ ,  $\beta$ ,  $h$ ) were obtained by fitting the data from the corresponding experiments.

The algorithm used for the analysis was the first-order method, as implemented in NONMEM 7. The interindividual variability of the model parameters was not included in the final model because the fungal inoculations were operated on a single colony so that all the experimental fungal cultures were assumed to be genetically identical. The residual variability was estimated by using additive model. Evaluation of the model performance included the analysis of standard



diagnostic plots, objective function value and the precision of the parameter estimates, as well as the visual inspection of the data for the quality of fit.

### 2.6. Simulations of expected time-kill curves using human pharmacokinetic data

Simulations of the expected kill curves for each isolate were made using steady state PK parameters of anidulafungin collected in vivo ( $t_{1/2} = 25.6$  h;  $V_d = 33.4$  L) (Catalán González and Montejo Gonzalez, 2008). Phoenix WinNonlin (Certara, USA) software program was used to simulate plasma concentration-time profiles for recommended multiple dosing regimen of anidulafungin (Loading dose/maintenance dose (LD/MD), 200/100 mg with a dosing interval ( $\tau$ ) of 24 hours up to 6 days) and then applied to the adapted  $E_{\max}$  model to simulate in vivo kill curves.

## 3. Results

### 3.1. MIC determination

Anidulafungin MICs, ranged from 0.03 to 0.06 mg/L for *C. albicans* complex strains, 0.06 mg/L for *C. glabrata* complex strains and 1 mg/L for *C. parapsilosis* complex strains.

### 3.2. Dynamic time-kill curves and pharmacodynamic model

The fitted curves for the described model against the nine strains of *Candida* in the absence of anidulafungin (control) or in the presence of changing concentrations of anidulafungin are shown in Fig. 1. It can be observed that anidulafungin did not show lethality against *C. albicans* NCPF 3153 and *C. dubliniensis* NCPF 3949, and it was fungistatic against *C. africana* ATCC 2669.

Anidulafungin showed fungicidal activity against the strains of *C. glabrata* clade. However, the activity of the drug was fungistatic against *C. bracarensis* NCYC 3397. Finally, anidulafungin

resulted fungistatic against *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. orthopsilosis* ATCC 96139, and fungicidal against *C. metapsilosis* ATCC 96143.

The determined PD parameters and their standard error estimates (SEE%) for each individual strain are listed in Table 1. The results indicate that the model chosen is appropriate for fitting the data (Table 1 and Fig. 2). The growing rates ( $K_g$ ) in the absence of antifungal were similar for the studied strains (0.23 – 0.62 h<sup>-1</sup>), except for *C. dubliniensis* NCPF 3949, which showed higher growth rate in the absence of anidulafungin (1.01 h<sup>-1</sup>). The maximum number of fungal,  $N_{max}$ , which accounts for the saturation, ranged from 6.66 to 8.26 UFC/mL. Median effective concentration (EC<sub>50</sub>) values indicated that anidulafungin was highly effective against each isolate at easily achievable serum levels (range 0.01 to 1.2 mg/L). The maximum killing rate constant ( $E_{max}$ ) estimated values were similar for the nine strains (0.14 – 0.41 h<sup>-1</sup>). No statistical correlation was obtained between fungal growing rate and anidulafungin maximum effect (maximum killing rate constant).

### 3.3. Model diagnostics

For each anidulafungin-strain pairing, there was excellent goodness of fit with the dynamic time-kill data, with  $R^2 = 0.98$ . The diagnostic plots of the final model presented in Fig. 2, show random uniform scatter around the line of identity (Fig. 2A) and suggested the absence of any trend or bias. Weighted residuals were randomly scattered around 0 (Fig. 2B).

### 3.4. Simulations

Fig. 3 shows simulated time-kill curves in vivo and serum anidulafungin concentrations for the standard dosing schedule. The simulated kill curves predicted that anidulafungin at the standard dosing regimen would not exert lethality against *C. albicans* NCPF 3153 and *C. dubliniensis* NCPF 3949. Conversely, anidulafungin would exert fungicidal activity against *C. africana* ATCC 2669 after the third dose.

A rapid fungicidal activity would be obtained against *C. nivariensis* CECT 11998, but this activity would disappear after 30 hours. Anidulafungin would exert a sustained fungicidal activity against *C. glabrata* ATCC 90030 and *C. braccarensis* NCYC 3397 with the same dosing schedule.

Finally, anidulafungin would show fungistatic activity against the strains of *C. parapsilosis* complex, except for a fungicidal activity against *C. metapsilosis* ATCC 96143.

#### 4. Discussion

MICs do not provide a very detailed characterization of antimicrobial activity (Schuck and Derendorf, 2005a). Because of this, in vitro PK/PD models based on time-kill curves have been proposed to assess the efficacy of antimicrobials as most sophisticated approach (Nielsen and Friberg, 2013). In this study, we have used a PK/PD approach based on dynamic time-kill curves to evaluate the efficacy of anidulafungin against nine strains of the *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* complexes. In in vitro models, drug concentration may be kept constant (static experiments) or vary with time (dynamic experiments) (Mueller et al., 2004). The main advantage of the dynamic experiments is that in vivo concentration-time profiles can be simulated under various dosing regimens to investigate antimicrobial effects (Meletiadis et al., 2012). In a previous study, we analyzed static time-kill data of anidulafungin (data not published) and in the present work we have improved the model to analyze dynamic time-kill data of anidulafungin against *Candida*. This new model accounts for the changing concentrations of anidulafungin during the experiment, and on the other hand, it also considers the outflow of *Candida* cells from the central compartment.

Furthermore, we have developed an in vitro model that simulates the PK/PD of anidulafungin in humans after the intravenous administration of standard doses. At this stage, a PK/PD model

was considered and the experimental data were analyzed using a nonlinear mixed-effect approach.

Simulations of expected time-kill curves in vivo for recommended multiple dosing regimen of anidulafungin revealed the importance of relating the antifungal effect to the serum concentration time profiles. In this sense, according to the fitted time-kill curves (Fig. 1), anidulafungin would not exert fungicidal effect against *C. braccarensis* NCYC 3397. However, simulations of expected curves for the selected dosing regimen revealed a fungicidal activity after the second dose.

The lack of correlation between the  $E_{\max}$  parameter for each strain and the growth rates of the isolates, suggests that the highest kill rates were not achieved against the most rapidly proliferating strains. Conversely, a significant correlation was obtained for voriconazole in a dynamic previous study (Li et al., 2009); these differences can be related to the mechanisms of action of the two drugs or to the strain variability. Nevertheless, the biggest growth rate observed with *C. dublineinsis* NCPF 3949 was in accordance with the lowest  $N_{\max}$  value estimated for this strain, as a more rapid proliferating rate would saturate the in vitro system. This finding also confirms the adequacy of the  $E_{\max}$  model for describing the fungal behaviour in the absence of drug.

The  $EC_{50}$  values estimated with the developed PD model demonstrated that anidulafungin was effective in a species-dependent way at easily achievable serum levels ( $C_{\max} = 3,44 - 7,5$  mg/L) (Catalán González and Montejo Gonzalez, 2008). In a future, the  $EC_{50}$  parameter of anidulafungin could be used in vitro to compare potencies of other echinocandins, and to study drug combinations.

Similar mechanism-based PK/PD models have been successfully used by other authors for caspofungin (Venisse et al., 2008). Approaches that combine in vitro time-kill data with PK data

collected in vivo, have been used for other antifungal agents (Li et al., 2009; Lignell et al., 2011). However, to our knowledge, no such dynamic experiments have previously been conducted with anidulafungin against *Candida*. The usefulness of these models in the clinical setting requires further evaluation, particularly in vivo.

### **Acknowledgments**

Sandra Gil-Alonso had a scholarship from the Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. This work was supported by Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (SPR12UN002, S-PE13UN025) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, and UPV/EHU (UFI 11/25).

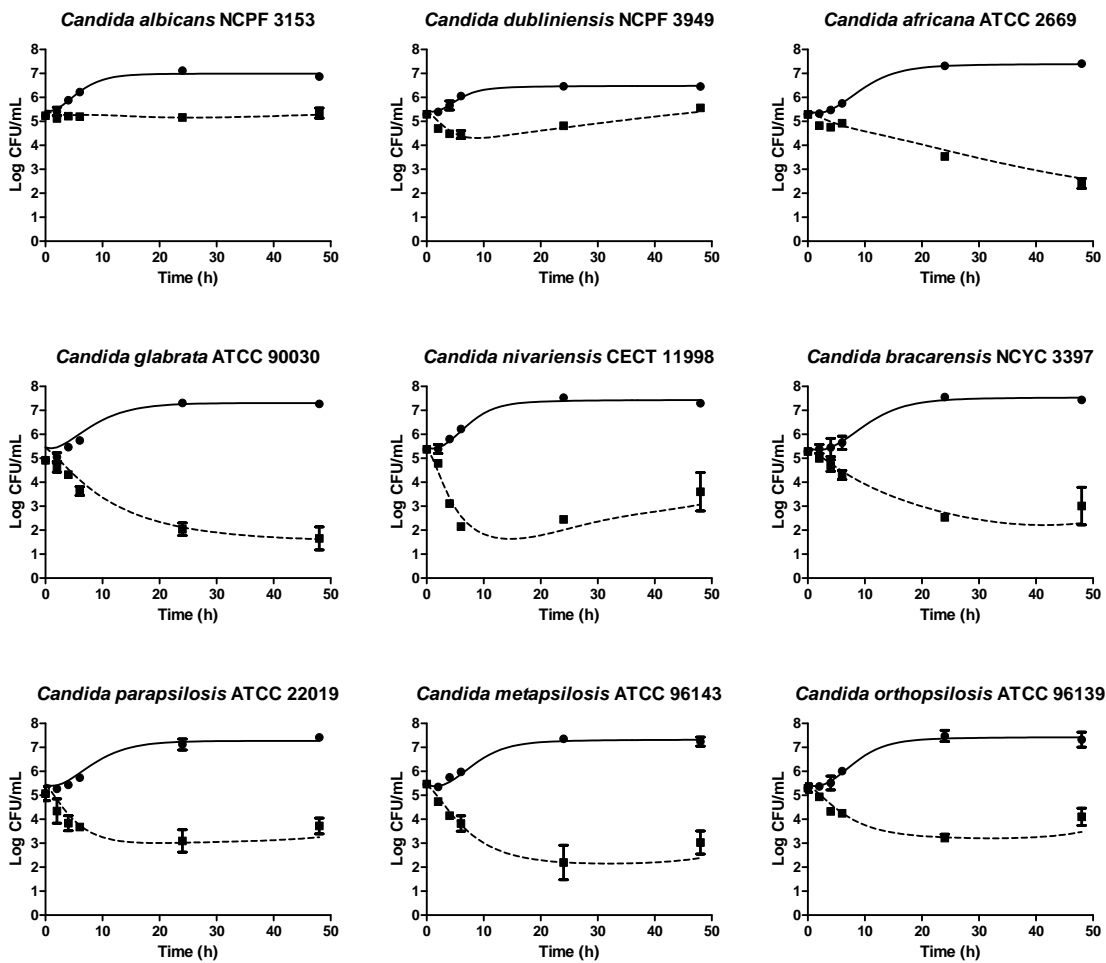
## References

- Cantón E, Pemán J, Valentín A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M (2009) In vitro activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3108-3111.
- Catalán González M, Montejo Gonzalez JC (2008) Anidulafungin: a new therapeutic approach in antifungal therapy. Pharmacology of anidulafungin. *Rev Iberoam Micol* 25:92-100.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) M27-A3 S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth International Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
- Li Y, Nguyen MH, Cheng S, Schmidt S, Zhong L, Derendorf H, Clancy CJ (2008) A pharmacokinetic/pharmacodynamic mathematical model accurately describes the activity of voriconazole against *Candida* spp. in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 31:369-374.
- Li Y, Nguyen MH, Schmidt S, Zhong L, Derendorf H, Clancy CJ (2009) Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and in vitro simulation of dynamic voriconazole-*Candida* interactions. *Int J Antimicrob Agents* 34:240-245.
- Lignell A, Lowdin E, Cars O, Sanglard D, Sjolín J (2011) Voriconazole-induced inhibition of the fungicidal activity of amphotericin B in *Candida* strains with reduced susceptibility to voriconazole: an effect not predicted by the MIC value alone. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1629-1637.
- Meletiadiis J, Al-Saigh R, Velegraki A, Walsh TJ, Roilides E, Zerva L (2012) Pharmacodynamic effects of simulated standard doses of antifungal drugs against *Aspergillus* species in a new in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 56:403-410.
- Mouton JW, Vinks AA (2005) Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. *Clin Pharmacokinet* 44:201-210.
- Mueller M, de la Pena A, Derendorf H (2004) Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother* 48:369-377.
- Nielsen EI, Friberg LE (2013) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev* 65:1053-1090.
- Venisse N, Gregoire N, Marliat M, Couet W (2008) Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic models of in vitro fungistatic and fungicidal effects against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:937-943.

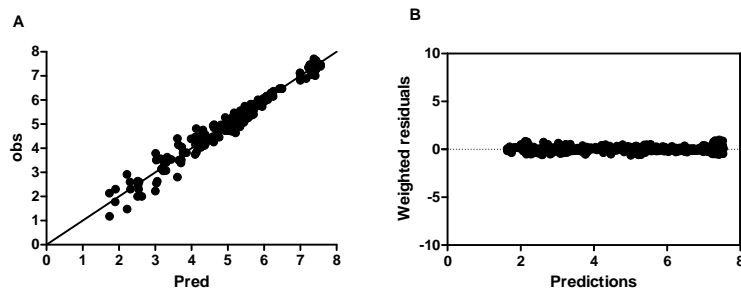
Table 1. Pharmacodynamic parameters estimates and residual variability against *Candida* strains.

Strains	Parameter	$K_g$ ( $h^{-1}$ )	$E_{max}$ ( $h^{-1}$ )	$EC_{50}$ (mg/L)	$N_{max}$ (CFU/mL)	$\alpha$	$\beta$	$h$	RV
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	Value	0.41	0.14	0.45	7.48	0.25	0.16	0.54	0.02
	SEE (%)		20.28	12.9			1.72	66.67	6.52
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	Value	1.01	0.24	1.2	6.66	0.1	0.16	5	0.01
	SEE (%)		0.02	0.01			0.04		33.26
<i>C. africana</i> ATCC 2669	Value	0.42	0.33	0.01	7.9	0.1	0.03	6	0.02
	SEE (%)		7.07	1.05			8.41		33.4
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	Value	0.23	0.31	0.5	8.26	0.3	0.2	0.08	0.04
	SEE (%)		0.1				0.05	0.48	44.41
<i>C. nivariensis</i> CECT 11998	Value	0.62	0.37	0.94	7.77	0.1	0.24	5	0.1
	SEE (%)		1.63	15.24			4.39		45.15
<i>C. braccarensis</i> NCYC 3133	Value	0.38	0.41	1.07	8.12	0.1	0.04	2	0.08
	SEE (%)		36.74	5.83			57.14		31.16
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Value	0.29	0.15	0.93	8.02	0.2	0.35	5	0.06
	SEE (%)		8.15	2.29			13.79		17.7
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96143	Value	0.5	0.34	0.95	7.74	0.1	0.1	5	0.08
	SEE (%)		11.91	4.55			2.18		40.97
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	Value	0.51	0.28	1.02	7.84	0.1	0.09	5	0.04
	SEE (%)		8.59	0.26			19.54		11.54

$K_g$ , fungal growth rate constant in the absence of anidulafungin;  $E_{max}$ , maximum killing rate constant (maximum effect);  $EC_{50}$ , concentration of anidulafungin necessary to produce 50% of maximum effect;  $\alpha$ , constant used to fit the initial lag phase for the growth;  $\beta$ , constant used to fit the initial lag phase for the inhibition or killing;  $N_{max}$ , maximum number of *Candida*; CFU, colony forming units;  $h$ , Hill factor; RV, residual variability; SEE, standard error estimate.

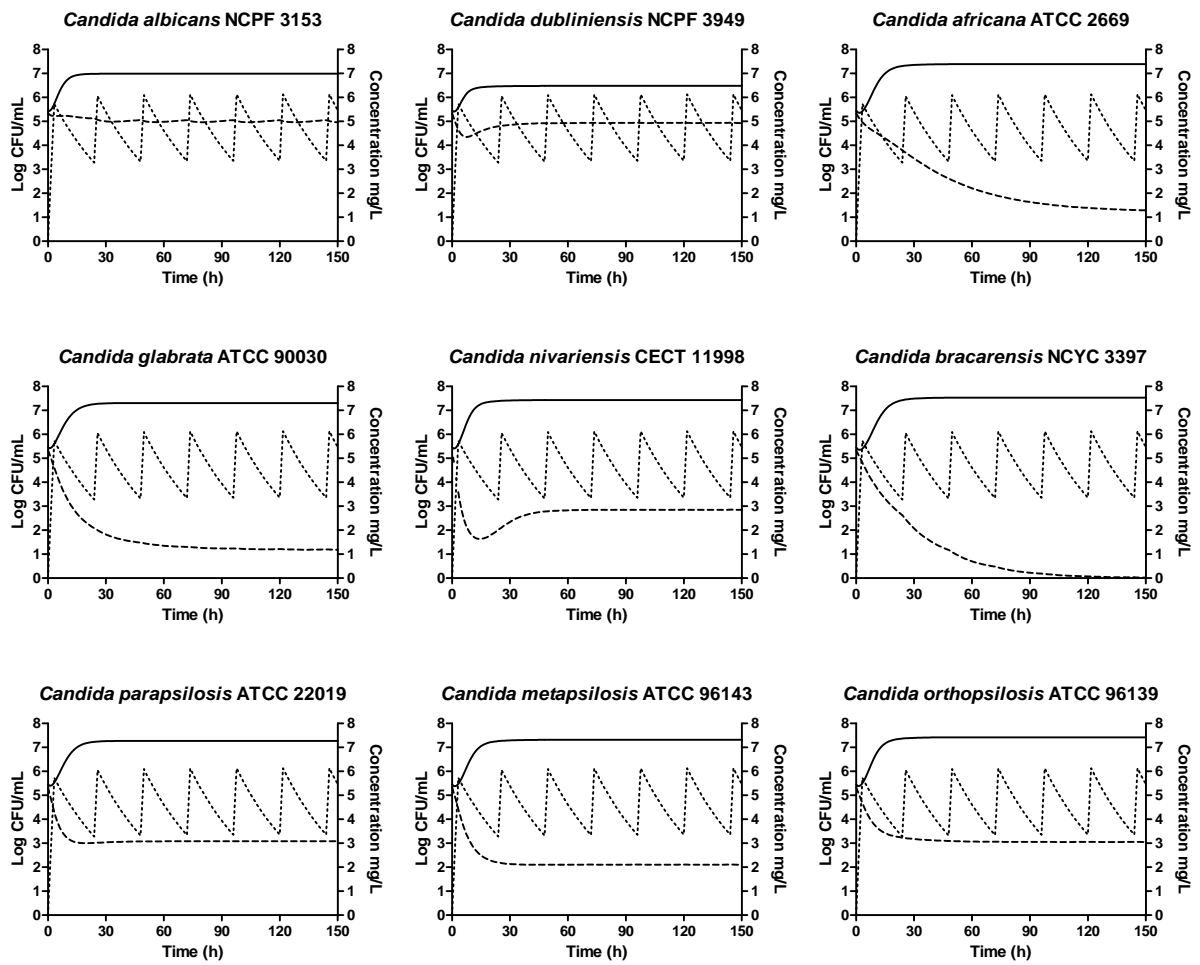


**Fig. 1.** Fitted time-kill curves derived by the mathematical model for changing concentrations of anidulafungin. The plots show the number of colony forming units per milliliter (CFU/mL) (means  $\pm$  standard deviation) of the different *Candida* strains for the control experiments without anidulafungin and after exposure to anidulafungin. The lines represent the curve fits from the respective data analysis.



**Fig. 2.** Diagnostic plots. (A) Observations versus predictions for anidulafungin against nine reference strains of *Candida*; (B) weighted residuals versus predictions for anidulafungin against nine reference strains of *Candida*.





**Fig. 3.** Simulations of candidal time-kill log CFU/mL (---) and plasma anidulafungin concentration-time profiles (...) for recommended multiple dosing regimen of anidulafungin (Loading dose/maintenance dose, 200/100 mg with a dosing interval ( $\tau$ ) of 24 h up to 7 days). Control growth is in the absence of drug (—)



# 5

---

## DISCUSIÓN





El desplazamiento etiológico en las candidiasis invasoras es una causa importante de complicaciones diagnósticas y terapéuticas, porque *C. glabrata* y *C. krusei* son menos sensibles o resistentes a los azoles y algunos aislamientos clínicos de *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*, presentan una sensibilidad disminuida a los fármacos antifúngicos [5-9,18,21,25-34]. Además, *C. albicans*, que es habitualmente sensible a los fármacos antifúngicos, también incluye un número bajo de aislamientos con una menor sensibilidad a fluconazol, anidulafungina, caspofungina y micafungina [143,144]. A este problema se une que el número de fármacos antifúngicos es limitado y que estos fármacos presentan interacciones farmacológicas que complican el tratamiento en determinados pacientes que reciben tratamientos múltiples. Las tres especies más relevantes como causa de candidiasis invasiva incluyen a otras especies crípticas. Dentro del complejo de especies de *C. albicans* están *C. dubliniensis* y *C. africana*, dentro de *C. glabrata* se incluyen *C. nivariensis* y *C. bracarensis*, e incluidas en el clado de *C. parapsilosis*, se hallan *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* [6-9,18,21,25-34].

Anidulafungina, caspofungina y micafungina comparten el mismo mecanismo de acción, ya que inhiben la actividad de la enzima 1,3- $\beta$ -D-glucano sintetasa. Su perfil de seguridad y sus escasas interacciones farmacológicas las convierten en los fármacos de primera elección para el tratamiento y profilaxis de las candidiasis invasoras en pacientes con inmunodeficiencias, enfermos críticos o con una probabilidad alta de sufrir interacciones medicamentosas.

Los estudios de curvas de letalidad realizados en esta Tesis doctoral nos han permitido describir el comportamiento de las equinocandinas, anidulafungina, caspofungina y micafungina, contra los tres complejos de especies más relevantes en clínica del género *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Así, se ha podido determinar qué fármaco antifúngico es más activo sobre una especie determinada y a qué tiempo alcanza una actividad fungicida o fungistática. Además ha permitido estudiar la sensibilidad de especies de las que sólo se habían determinado las CMI, como *C. nivariensis*, *C. bracarensis* o *C. africana*. Las curvas de letalidad estáticas se obtuvieron con

un método de microdilución en una incubadora automática que supone una semiautomatización, que conlleva una reducción en el tiempo de procesado y un volumen menor del medio de cultivo, pero que respeta el resto de las condiciones experimentales de la técnica clásica de macrodilución [134,145].

Además, en esta Tesis doctoral se ha evaluado el PAFE o supresión del crecimiento del hongo después de una exposición limitada a un fármaco antifúngico, cuyo interés clínico se relaciona con el diseño de los regímenes de dosificación farmacológica, pues los fármacos con PAFE elevados podrían ser administrados con menor frecuencia que los que poseen PAFE cortos [140,146,147]. Finalmente, en la Tesis hemos utilizado un modelado FC/FD basado en curvas de letalidad, para evaluar la eficacia de anidulafungina contra estos complejos de especies y estudiar estrategias

de tratamiento antifúngico. En este trabajo de Tesis se ha comparado por primera vez la actividad antifúngica in vitro y el PAFE de las tres equinocandinas contra las especies incluidas en los complejos de especies *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Además, es el primer estudio de modelado FC/FD de anidulafungina basado en curvas de tiempo-letalidad in vitro.

Las CMI de las tres equinocandinas fueron similares para los tres complejos de especies estudiados. Sin embargo, se observaron diferencias en la actividad fungicida o fungistática de las equinocandinas tanto en las curvas de letalidad como en el PAFE. En el clado de *C. albicans*, *C. albicans* era la especie más sensible in vitro a las equinocandinas, seguida de *C. dubliniensis* y *C. africana*. Szilagyí et al. [148] también han visto que *C. albicans* era más sensible que *C. dubliniensis* a la caspofungina. Micafungina fue la más activa contra *C. glabrata* pero no fue candidada contra *C. nivariensis*. Estos datos no coinciden con lo descrito por Smith et al. [140] que observaron que caspofungina fue la equinocandina más activa contra *C. glabrata*. La anidulafungina fue la equinocandina más activa contra *C. braccarensis*, *C. nivariensis*, *C. parapsilosis* y *C. metapsilosis*, e igual de activa que micafungina contra *C. orthopsilosis*. Estos resultados son similares a los obtenidos

por otros autores [140,149,150]. *C. glabrata sensu stricto* era más sensible in vitro que *C. albicans sensu stricto* o *C. parapsilosis sensu stricto* a las tres equinocandinas, resultados que corroboran los obtenidos por otros autores [134,139,146-148,151]. Este orden de sensibilidad no se observa con la anfotericina B [145] ni con el voriconazol [152].

Las concentraciones ensayadas influyen en el efecto del fármaco. En los estudios con curvas de letalidad se ha demostrado que la actividad de las equinocandinas es mayor cuando se expone al hongo a concentraciones superiores a la CMI [119,153,154] con una actividad dependiente de la concentración [133,155].

La actividad candidacida de la anidulafungina depende tanto de la especie de *Candida* como de la diversidad cepas estudiadas de cada especie. En este trabajo de Tesis doctoral, dosis relativamente bajas de anidulafungina (0,12-0,5 µg/ml) mostraron una actividad fungicida contra varias cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Nguyen et al. [139] describieron también esta actividad candidacida contra una de las cuatro cepas de *C. albicans* que estudiaron con 0,25 µg/ml de anidulafungina. Por ello se sugiere que la respuesta de la anidulafungina varía entre las cepas de la misma especie. Este hecho puede explicar que Roling et al. [156] no observaran la actividad fungicida de  $\leq 2$  µg/ml de anidulafungina contra *C. albicans*. Además, en nuestro estudio de Tesis, la anidulafungina también fue candidacida contra *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. braccarensis*. También han descrito este efecto candidacida Nguyen et al. [139] y Smith et al. [140] contra *C. glabrata*. La actividad candidacida de la anidulafungina fue mayor contra el clado de *C. glabrata* que contra el de *C. albicans*. Además la anidulafungina también fue fungicida contra algunas cepas de *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* pero con concentraciones más altas, de 2 µg/ml; para alcanzar el mismo efecto contra *C. parapsilosis* fueron necesarios 8 µg/ml de anidulafungina. Esta necesidad de emplear concentraciones más elevadas para obtener un efecto fungicida contra *C. parapsilosis* ha sido descrita por otros autores, como Nguyen et al. [139] y Smith et al. [140]. Sin embargo, Spreghini et al. [150] describieron un efecto fungicida contra las especies del clado *C. parapsilosis*,

con 2 µg/ml de anidulafungina. Por otra parte, Canton et al. [149] concluyeron que no se conseguía alcanzar el límite fungicida ni siquiera con concentraciones de 32 µg/ml. Estas discrepancias pueden estar relacionadas con la duración de los estudios, así, Cantón et al. [149] estudiaron las curvas de letalidad de anidulafungina hasta las 24 h lo que pudo impedir que observaran una posible actividad fungicida ya que la letalidad de las cepas de *C. parapsilosis* evaluadas en nuestro trabajo de Tesis, se observó entre 27,75 y 29,67 h. Sin embargo, Cantón et al. [149] sí observaron una actividad fungicida de anidulafungina contra *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* con 1 y 4 µg/ml, respectivamente, aunque el efecto fue más tardío contra *C. orthopsilosis*. También en nuestro trabajo se requirió más tiempo para alcanzar el límite fungicida contra *C. orthopsilosis* que contra *C. metapsilosis*. Tanto en el trabajo de Cantón et al. [149] como en el nuestro se ha observado que *C. parapsilosis* era la especie menos sensible a la anidulafungina.

A pesar de su importancia clínica, el PAFE de anidulafungina ha sido poco estudiado. Hay estudios contra *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* [133,139,140] pero no contra *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. bracarensis* o *C. nivariensis*. Las concentraciones más altas ensayadas de anidulafungina ejercen un PAFE fungistático prolongado contra las especies de los clados *C. albicans* y *C. parapsilosis* ( $39,6 \pm 6,81$ h y  $37,6 \pm 14,32$  h, respectivamente). El PAFE prolongado de las equinocandinas también ha sido descrito en otros estudios [133,157]. Ernst et al. [133] describieron un PAFE superior a 12 h contra *C. albicans* con concentraciones de anidulafungina menores, pero las CMI de partida también fueron inferiores a las de nuestro estudio. En las candidiasis causadas por cepas contra las que el PAFE es prolongado, el régimen terapéutico habitual de anidulafungina podría variar, espaciándose la administración de las dosis. Además, en nuestro estudio de Tesis, el PAFE de la anidulafungina fue fungicida contra una cepa de *C. albicans*, otra de *C. dubliniensis* y otra de *C. metapsilosis*. Nguyen et al. [139] también observaron un PAFE fungicida contra *C. parapsilosis* con concentraciones a partir de 16 µg/ml de anidulafungina. Smith et al. [140] no detectaron un efecto fungicida con 8 µg/ml de



anidulafungina. En este estudio de Tesis no se encontraron diferencias significativas en el PAFE de anidulafungina entre los complejos *C. albicans* y *C. parapsilosis*, pero sí entre las diferentes cepas incluidas en las especies de cada complejo. Las características de crecimiento del propio microorganismo, la afinidad de la anidulafungina por cada cepa o la variabilidad de la concentración de 1,3- $\beta$ -D-glucano en la pared de la célula fúngica podrían explicar estas diferencias.

La caspofungina, al igual que la anidulafungina, ejerció una actividad fungistática contra *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Sin embargo, la caspofungina fue fungicida contra una de las siete cepas de *C. albicans* y contra dos de las cinco cepas de *C. dubliniensis*, con 0,12 y 2  $\mu$ g/ml, respectivamente. Este efecto fungicida también ha sido descrito por otros autores, como Szilagyi et al. [148] que observaron una acción candidicida contra una cepa de *C. albicans* con 0,12  $\mu$ g/ml de caspofungina después de 48 h, mientras que su acción era fungistática contra dos cepas de *C. dubliniensis* con concentraciones de 0,12 a 16  $\mu$ g/ml. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Shields et al. [158] que describieron que la caspofungina sólo fue fungicida contra una de las cinco cepas de *C. albicans* estudiadas. Sin embargo, Clancy et al. [146] no observaron actividad fungicida con concentraciones inferiores o iguales 4  $\mu$ g/ml de caspofungina contra ninguna de las cuatro cepas de *C. albicans* ensayadas. Varga et al. [159] tampoco encontraron un efecto fungicida contra *C. dubliniensis*. Otros autores también han observado que el efecto antifúngico, fungicida o fungistático, de la caspofungina depende de la especie, la cepa, la concentración ensayada y el medio empleado [155,160].

Con respecto a la actividad de caspofungina contra el complejo de *C. glabrata*, en el trabajo de Tesis se observó que este fármaco fue fungistático, frente a *C. glabrata* y *C. nivariensis* y fungicida contra *C. bracarensis*. Clancy et al. [146] no observaron este efecto fungicida con concentraciones inferiores a 4  $\mu$ g/ml, aunque sí un efecto fungistático contra *C. glabrata*. Sin embargo, Szilagyi et al. [148] describieron que caspofungina ejercía tanto un efecto fungistático como fungicida contra

*C. glabrata*. Además, Smith et al. [140] describieron un efecto candidacida contra *C. glabrata* con concentraciones superiores a 2 µg/ml de caspofungina. Estos trabajos ponen de manifiesto la gran variabilidad entre las cepas de una misma especie en la respuesta a caspofungina.

La actividad candidacida de la caspofungina contra las especies incluidas en el clado *C. parapsilosis* fue menor que contra los otros dos complejos de especies estudiados. En el presente estudio de Tesis, caspofungina sólo resultó ser fungicida contra una cepa de *C. metapsilosis*. La caspofungina, al igual que la anidulafungina, fue fungistática contra *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Sin embargo, este efecto fungistático solo se observó contra una de las tres cepas de *C. parapsilosis*. Clancy et al. [146] tampoco observaron una actividad fungicida contra *C. parapsilosis* con concentraciones de caspofungina inferiores a 32 µg/ml. Varga et al. [161] detectaron un efecto fungistático contra seis de siete cepas de *C. parapsilosis*, entre éstas la cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 de nuestro estudio. Además, coincidiendo con nuestros resultados, observaron un efecto fungicida con concentraciones superiores a 4 µg/ml de caspofungina contra *C. metapsilosis*. Sin embargo, el efecto fue fungistático contra *C. orthopsilosis*. Szilagyi et al. [148] encontraron un efecto candidacida contra *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* con concentraciones de caspofungina inferiores a 16 µg/ml. La discordancia sobre el efecto fungicida contra *C. orthopsilosis* podría deberse a que la concentración más alta de caspofungina evaluada en nuestro trabajo de Tesis fue de 8 µg/ml mientras que Szilagyi et al. [148] observaron este efecto con 16 µg/ml. Cantón et al. [149] observaron un efecto fungicida contra *C. metapsilosis*, con 16 µg/ml de caspofungina, pero no contra las otras dos especies del complejo *C. parapsilosis* y, como en nuestro trabajo, *C. parapsilosis* fue la especie menos sensible a caspofungina. Sin embargo, Spreghini et al. [150] y Smith et al. [140] han descrito que la caspofungina tiene un efecto candidacida contra las tres especies del complejo. Diferentes estudios han mostrado que la caspofungina muestra una actividad fungicida o fungistática dependiente de la especie, la cepa, el inóculo inicial y el medio [155,160,162]. Así,

con caspofungina se ha observado mayor actividad fungicida en medio antibiótico 3 que en RPMI [133,159-161].

El PAFE de caspofungina se ha evaluado de forma limitada [133,140,146,158]. De hecho, este trabajo de Tesis incluye el primer estudio que ha evaluado y comparado el PAFE de caspofungina contra las especies emergentes de los complejos *C. albicans* y *C. parapsilosis*. El PAFE contra el complejo *C. albicans* fue más prolongado que el obtenido contra el de *C. parapsilosis* ( $38,41 \pm 9,42$  h y  $13,96 \pm 13,54$  h, respectivamente). Smith et al. [140] observaron que el PAFE de caspofungina contra dos cepas de *C. parapsilosis* fue superior a 12 h. En nuestro estudio de Tesis, el PAFE fue fungistático contra todas las cepas de ambos complejos y fungicida contra una cepa de *C. albicans*. De forma similar, Shields et al. [158] demostraron actividad fungicida en los experimentos de PAFE con caspofungina contra una de cinco cepas *C. albicans*. En nuestro trabajo, el PAFE prolongado de caspofungina contra *C. albicans* fue dependiente de la concentración. Ernst et al. [133] también observaron que con concentraciones inferiores a la CMI, se obtenía un PAFE inferior a 2 h, mientras que concentraciones de caspofungina superiores inducían un PAFE superior a 12 h, y sugirieron que son necesarias concentraciones mayores de caspofungina que de anidulafungina para conseguir el mismo PAFE contra *C. albicans*. De forma similar, Clancy et al. [146] no encontraron un PAFE fungicida contra *C. albicans* o *C. parapsilosis* con concentraciones de caspofungina semejantes a las empleadas en nuestro estudio. Sin embargo, obtuvieron una alta correlación entre los datos de tiempo-letalidad y el PAFE en *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Micafungina mostró una actividad fungistática contra el complejo de especies *C. albicans* y a la concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  una actividad fungicida contra algunas cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Foldi et al. [163] también describieron un efecto fungistático con micafungina contra *C. albicans*. Nguyen et al. [134] describieron efecto fungistático o fungicida de micafungina contra *C. albicans*, dependiendo de la cepa. El efecto de micafungina, similar al de las otras

equinocandinas estudiadas en este trabajo de Tesis, fue dependiente de la concentración, de la cepa y de la especie, como describieron Ernst et al. [147].

Micafungina presentó un efecto fungicida contra *C. glabrata* y *C. braccarensis* similar a los de la anidulafungina y la caspofungina. Sin embargo, este efecto no se observó contra *C. nivariensis*. Por otro lado, se detectó un efecto paradójico aparente, con 0,125 µg/ml de micafungina contra *C. braccarensis*. Efectos similares han sido descritos con caspofungina y micafungina pero varían en función del medio de ensayo, la especie, la cepa y el fármaco [149,158,164-166]. Mariné et al. [165] estudiaron el efecto de anidulafungina, caspofungina y micafungina contra aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* y vieron que las tres equinocandinas producían efecto paradójico con concentraciones superiores a la CMI. Estudiaron el efecto paradójico de las equinocandinas en un modelo murino de candidiasis sistémica y concluyeron que el efecto paradójico no tenía consecuencias in vivo ya que las tres equinocandinas tuvieron una actividad antifúngica similar con independencia de que se observara o no un efecto paradójico in vitro. Rueda, Cuenca-Estrella y Zaragoza sugirieron que el crecimiento paradójico de *C. albicans* en presencia de caspofungina no era debido a la degradación del fármaco antifúngico o a su inestabilidad, sino a un proceso de adaptación de las células a la caspofungina. Además, las células cultivadas en presencia de concentraciones altas de caspofungina eran menos virulentas que las cultivadas con concentraciones inferiores, en un modelo de infección en *Galleria mellonella* [166].

Foldi et al. [163] estudiaron la actividad de micafungina contra *C. glabrata*, observando que fue fungicida con concentraciones superiores a 0,06 µg/ml. También Nguyen et al. [134] observaron un efecto fungicida con 0,25-2 µg/ml de micafungina contra *C. glabrata*. Ernst et al. [147] observaron el efecto candidicida con 0,06 µg/ml de micafungina contra *C. glabrata* en 12,9-13,4 h, resultados muy similares a los nuestros (13,08 h con 0,125 µg/ml). Sin embargo, en el trabajo de Smith et al. [140] fueron necesarios 0,5 µg/ml de micafungina para conseguir un efecto fungicida contra *C. glabrata*.

La actividad de micafungina y anidulafungina observada en nuestro estudio contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* fue fungicida. Sin embargo, caspofungina, con 8 µg/ml consiguió este efecto solo contra una cepa de *C. metapsilosis*. Foldi et al. [163] incluso obtuvieron actividad fungicida con concentraciones menores de micafungina contra las tres especies de este complejo. *C. metapsilosis* fue la especie de este complejo más sensible a micafungina mientras que *C. parapsilosis* fue la menos sensible. En el mismo sentido, Spreghini et al. [150] observaron una actividad fungicida con 2 µg/ml de micafungina contra *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, siendo también *C. parapsilosis* la especie menos sensible. Cantón et al. [149] realizaron un trabajo comparativo del tiempo que tardaba la micafungina en llevar a cabo una acción fungicida contra las especies del complejo *C. parapsilosis*, y vieron que contra *C. parapsilosis* no alcanzó efecto fungicida. En nuestro trabajo sí se alcanzó este efecto contra una de las tres cepas de *C. parapsilosis* pero después de 28,38 h, periodo de tiempo no estudiado en el trabajo de estos autores. Cantón et al. [149] no detectaron diferencias (14,29-16,59 h) en la actividad candidacida contra *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Estos resultados son similares a las 12,74-13,54 h observadas en nuestro estudio, excepto con una cepa de *C. orthopsilosis* (más de 48 h). Otros investigadores encontraron actividad fungicida de micafungina contra *C. parapsilosis* con 2 µg/ml [140] y a partir de 8 µg/ml [134].

El PAFE de micafungina ha sido estudiado con muy pocas cepas [134,140,147,157]. Este es el primer trabajo en el que se ha estudiado y comparado el PAFE de micafungina contra las especies de los complejos *C. albicans* y *C. parapsilosis*. El PAFE contra el complejo *C. albicans* fue más prolongado que contra el complejo *C. parapsilosis* ( $41,83 \pm 2,18$  y  $8,07 \pm 4,2$  h, respectivamente). Se observó un PAFE fungistático contra la mayoría de las cepas del complejo *C. albicans* y el PAFE resultó candidacida contra una cepa de *C. albicans* y otra de *C. dubliniensis*. Sin embargo, el PAFE de micafungina apenas mostró actividad letal contra el complejo *C. parapsilosis*. Nguyen et al. [134] observaron un PAFE de micafungina fungicida contra una cepa de *C. albicans* y otra de

*C. parapsilosis*. En los estudios realizados por Ernst et al. [147] con *C. albicans*, se describió un PAFE en  $\geq 9,8$  h con  $\geq 0,015$   $\mu\text{g/ml}$  de micafungina. En nuestro trabajo, el PAFE contra *C. albicans* comenzó con 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de micafungina. Esta diferencia puede relacionarse con que las CMI de las cepas eran más bajas en el estudio de Ernst et al. que en el nuestro. Smith et al. [140] observaron un PAFE mínimo contra *C. parapsilosis* con 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de micafungina. Este PAFE de micafungina se prolongó hasta 10 a 11 h con 2  $\mu\text{g/ml}$  y más de 24 h con 16  $\mu\text{g/ml}$ . Nuestro estudio corrobora estos hallazgos ya que 8  $\mu\text{g/ml}$  de micafungina dieron lugar a un PAFE de entre 3,8 h hasta 15,7 h para *C. parapsilosis*.

Las diferencias en el PAFE entre las tres equinocandinas fueron dependientes de la cepa y de la concentración. Con todas las concentraciones de equinocandinas ensayadas se observó PAFE contra el complejo de especies *C. albicans*, sin diferencias significativas entre anidulafungina, caspofungina y micafungina. Sin embargo, el PAFE de las tres equinocandinas se detectó casi exclusivamente con la concentración más alta estudiada contra el complejo de especies *C. parapsilosis*, siendo el PAFE de anidulafungina significativamente más prolongado que los de micafungina y caspofungina. Smith et al. [140] evaluaron el PAFE de las tres equinocandinas contra *C. parapsilosis* y *C. glabrata* y observaron que los PAFE de anidulafungina y caspofungina fueron más prolongados que el de micafungina, y también superiores contra *C. glabrata* que contra *C. parapsilosis*.

El PAFE observado en nuestro estudio no pudo ser predicho en base a la CMI de cada cepa, ni por el grado de actividad fungicida inicial. Aunque con la anidulafungina se observó un PAFE importante con CMI bajas especialmente contra las cepas del complejo *C. albicans*, esta relación no se observó con las otras dos equinocandinas. La CMI, en consonancia con lo descrito por Smith et al. [140], no permitió predecir el PAFE de las equinocandinas contra *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Es importante resaltar que en esta Tesis doctoral el PAFE ha sido estudiado con concentraciones que se alcanzan en el suero humano con las dosis habituales de las tres

equinocandinas. Los rangos de las concentraciones máximas de equinocandinas alcanzadas en ensayos clínicos son de 3,44-7,5 µg/ml para anidulafungina, 7,1-10 µg/ml para micafungina y de 10-12,1 µg/ml para caspofungina [88].

El PAFE ha sido estudiado con otros fármacos antifúngicos con resultados muy dispares, sobre todo contra *C. albicans*. Ernst, Klepser y Pfaller [133] comprobaron que fluconazol no producía PAFE contra *C. albicans* mientras que las equinocandinas y la anfotericina B mostraban un PAFE prolongado (> 12 h) con concentraciones por encima de la CMI. Manavathu et al. [157] detectaron PAFE prolongado de la anfotericina B, la caspofungina y la micafungina contra *C. albicans* que no se observaba con los triazoles, sugiriendo que los fármacos antifúngicos con actividad fungicida muestran PAFE más prolongado que los fármacos fungistáticos. En esta Tesis doctoral, las tres equinocandinas mostraron un PAFE prolongado sobre todo contra *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana*, mientras que este efecto fue menor contra las especies que conforman el complejo de *C. parapsilosis*.

Estos resultados PAFE también han sido observados en modelos experimentales. Andes et al. [119] demostraron que con concentraciones séricas de 0,12 y 0,06 µg/ml de anidulafungina se alcanzaba un prolongado periodo de supresión del crecimiento de *C. albicans* (56- 96 h) y de *C. glabrata* (19-67 h). En un estudio similar, Gumbo et al. [167] concluyeron que una dosis única semanal de micafungina era tan eficaz como una dosis única diaria contra la infección invasiva por *C. glabrata* en ratones con neutropenia, sugiriendo la posibilidad de reducir la frecuencia de administración de las equinocandinas. Loïue et al. (Loïue et al, 2005) sugirieron, tras estudiar los resultados del PAFE de caspofungina en un modelo de candidiasis en ratón, que la prolongada semivida tisular de la caspofungina (59 h versus 20.5 h de semivida sérica) podría ser la causa de la prolongada actividad de este fármaco antifúngico.

Estas diferencias en el PAFE entre fármacos dependientes de las concentraciones y de las especies estudiadas podrían deberse a diferencias en la necesidad de los tiempos de exposición al fármaco o a diferencias en el grado de afinidad por los sitios de unión del fármaco a la diana terapéutica. Nuestros experimentos de PAFE se realizaron tras una exposición del hongo durante una hora con el fármaco antifúngico, al igual que en otros estudios [134,135,139,140,146,168]. Ernst et al. [133] expusieron *Candida* a caspofungina y anfotericina B durante 0,25, 0,5 y 1 h y observaron que el PAFE no variaba con el tiempo de exposición. Paradójicamente, Shields et al. [158] demostraron que el PAFE de caspofungina contra *C.albicans* fue mayor tras exposiciones de 5 y 15 minutos que con exposiciones de 30 y 60 minutos. Además, observaron que una exposición breve a la caspofungina eliminaba el efecto paradójico que se observaba en las curvas de letalidad.

El mecanismo por el cual se explicaría el PAFE es desconocido. Se ha sugerido que las equinocandinas se asocian rápidamente a su diana, la 1,3- $\beta$ -D-glucano sintetasa, sobre la que ejercen un efecto prolongado. De forma alternativa, las equinocandinas, lipopéptidos de gran tamaño, se podrían intercalar rápidamente en la doble capa de fosfolípidos de la membrana celular de *Candida* y acceder a su diana de una forma progresiva, a lo largo del tiempo.

Un aspecto muy importante para la adecuada terapia de las candidiasis invasoras es conocer la dinámica de la acción de los fármacos antifúngicos y la relación entre la concentración de estos y su actividad antimicrobiana. Aunque la CMI es el parámetro más utilizado en los laboratorios de microbiología clínica, no proporciona una información tan detallada de la actividad antimicrobiana [169]. Las curvas de tiempo-letalidad son herramientas válidas y atractivas para el estudio de esta actividad antifúngica ya que aportan información sobre los efectos de los fármacos contra las diferentes especies fúngicas de las que se desconoce o se conoce de forma escasa sus patrones de sensibilidad. Permiten establecer con exactitud el tiempo que tarda un fármaco en alcanzar un efecto in vitro, fungistático o fungicida, contra un determinado hongo



patógeno ya que contemplan la evolución temporal tanto del crecimiento como de la letalidad de *Candida* en presencia de un fármaco concreto [122]. Además, ofrecen la posibilidad de predecir y simular diferentes escenarios terapéuticos y son especialmente útiles en el diseño de nuevos estudios, así como en la búsqueda de esquemas de dosificación alternativos [94].

En el presente trabajo de Tesis, una vez obtenidas las curvas de letalidad con las diferentes concentraciones de anidulafungina y su PAFE para las diferentes especies de *Candida*, se ajustaron los datos de UFC/ml en función del tiempo con un modelo matemático de efecto máximo sigmoide. Los resultados indican que este modelo se ajusta satisfactoriamente a los datos obtenidos a partir de curvas de letalidad estáticas para anidulafungina. Además, este modelo se empleó para estudiar un régimen de dosificación estándar de anidulafungina y simular curvas de letalidad con dicho régimen. Una de las limitaciones de los modelos FC/FD basados en curvas de letalidad estáticas, es que la concentración de fármaco permanece constante a lo largo de todo el experimento. Por ello se llevaron a cabo los estudios in vitro dinámicos, que consiguen una mayor aproximación a la situación in vivo en la que las concentraciones de fármaco cambian a lo largo del tiempo dependiendo de las características FC. En el modelo empleado para ajustar los datos de tiempo-letalidad dinámicos, a diferencia del modelo matemático estático, el término de concentración cambió para cada tiempo, y se introdujo un nuevo parámetro para corregir la pérdida de *Candida* por dilución. El resultado fueron unos excelentes ajustes y la estimación de diferentes parámetros FD. Éstos parámetros, combinados con datos FC de humanos, fueron posteriormente empleados para llevar a cabo simulaciones de curvas de letalidad. A partir de estas simulaciones se obtuvo una información importante sobre la evolución temporal del efecto de anidulafungina contra las cepas de los complejos *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, con la dosis habitual de este fármaco.

Los estudios in vivo de comparación de eficacia de varios regímenes de dosificación son laboriosos, complicados y caros [114]. La aproximación basada en combinar datos de curvas de

letalidad *in vitro*, con parámetros FC *in vivo* previamente publicados, ha resultado muy útil para el diseño y optimización de nuevos regímenes de dosificación en fármacos antimicrobianos, principalmente antibacterianos como el cefaclor [170], la cefpodoxima, la cefixima [171], la azitromicina [172] o, más recientemente, la vertilmicina y la ceftazidima [173]. En menor medida, se han desarrollado para fármacos antifúngicos, como el voriconazol [141], el fluconazol o la caspofungina [120]. Por otro lado, varios investigadores han sugerido que el comportamiento *in vitro* del microorganismo no es equivalente a lo que sucede *in vivo*, debido, entre otras causas, a las diferencias en el crecimiento, la viabilidad del microorganismo, el efecto de la unión a proteínas, la influencia del sistema inmune, etc. La ventaja de los modelos *in vitro* de curvas de letalidad, es que permiten la comparación entre diferentes fármacos antifúngicos, diferentes regímenes de dosificación, son reproducibles, más rápidos y más baratos que los modelos *in vivo* [141,171].

Los resultados del PAFE y las curvas de letalidad, obtenidos en esta Tesis doctoral, así como el posterior modelado FC/FD, podrían ser de utilidad en los tratamientos de las candidiasis más prevalentes de nuestro medio. Por un lado, se ha demostrado la importancia de estudiar la sensibilidad de las diferentes especies de *Candida* a las equinocandinas porque hay importantes diferencias dependientes del fármaco y la concentración, así como de complejo, especie y cepa del hongo, tanto en lo referente a la actividad fungistática y/o fungicida como en el PAFE. Por otro lado, tanto los resultados de los estudios de PAFE como los modelados FC/FD, podrían ayudar en la toma de decisiones sobre las pautas posológicas de estos antifúngicos de reciente incorporación en el arsenal terapéutico de las candidiasis invasoras.

# 6

---

## CONCLUSIONES





1. En base a las CMI, las tres equinocandinas mostraron una actividad antifúngica semejante contra todas las especies de *Candida* estudiadas.
2. El estudio de las curvas de letalidad reveló diferencias en la actividad fungicida de las tres equinocandinas que dependían de la concentración, el fármaco, la especie de *Candida* y la cepa estudiada.
3. Anidulafungina fue la equinocandina más activa contra *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. bracarensis*, *C. nivariensis*, *C. parapsilosis* y *C. metapsilosis*.
4. Anidulafungina y micafungina tuvieron una actividad fungicida similar contra *C. orthopsilosis*.
5. Micafungina fue el fármaco con mayor actividad fungicida contra *C. glabrata*.
6. Las tres equinocandinas mostraron un PAFE fungistático y, en ocasiones fungicida contra *Candida*.
7. El PAFE de caspofungina y micafungina fue más prolongado contra las especies del complejo *C. albicans*. Sin embargo, anidulafungina mostró un PAFE prolongado y semejante contra los complejos de especie de *C. albicans* y *C. parapsilosis*.
8. Anidulafungina mostró mayor PAFE que micafungina y caspofungina contra el complejo *C. parapsilosis*. Contra el complejo *C. albicans*, sin embargo, las tres equinocandinas mostraron el mismo PAFE.
9. Los modelos  $E_{\max}$  sigmoides desarrollados para anidulafungina fueron apropiados para simular los efectos que se obtendrían con el régimen clínico de dosificación habitual.



# 7

---

## BIBLIOGRAFÍA







- [1] Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:45-8
- [2] Wenzel RP, Gennings C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: Identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis* 2005;41:389-93
- [3] Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, et al. The epidemiology of candidemia in two united states cities: Results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999;29:1164-70
- [4] Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, et al. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 2002;40:1298-302
- [5] Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 2014;31:42-8
- [6] Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005;43:1829-35
- [7] Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sánchez F, Ayats J, et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: Case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2006;44:1681-5
- [8] Almirante B. Proyecto CandiPop. estudio multicéntrico nacional sobre candidemia: Presentación de estudios clínicos. in: IV jornada científica del grupo de estudio de micología médica de la SEIMC. 2013
- [9] Bergamasco MD, Garnica M, Colombo AL, Nucci M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in brazil. *Mycoses* 2013;56:256-63
- [10] Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006;10:6:21
- [11] Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sa M, Johnson EM, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med* 2009;35:55-62
- [12] Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1181-7
- [13] Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: Comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:561-6

- [14] Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: A population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O245-54
- [15] Tortorano AM, Prigitano A, Biraghi E, Viviani MA, FIMUA-ECMM Candidaemia Study Group. The european confederation of medical mycology (ECMM) survey of candidaemia in italy: In vitro susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:777-9
- [16] Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer* 2008;112:2493-9
- [17] Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 2012;50:3435-42
- [18] Colombo AL, Garnica M, Aranha Camargo LF, Da Cunha CA, Bandeira AC, Borghi D, et al. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* 2013;51:38-44
- [19] Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK,Jr, Reed SD. *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: Comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:433-5
- [20] Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK,Jr, Reed SD. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *Am J Infect Control* 2010;38:78-80
- [21] Playford EG, Nimmo GR, Tilse M, Sorrell TC. Increasing incidence of candidaemia: Long-term epidemiological trends, queensland, australia, 1999-2008. *J Hosp Infect* 2010;76:46-51
- [22] Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the united states: A propensity analysis. *Clin Infect Dis* 2005;41:1232-9
- [23] Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: A prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:377-84
- [24] Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: Update on current guidelines. *Mycoses* 2015;58:10-21
- [25] Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, Ellis D, et al. Active surveillance for candidemia, australia. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1508-16
- [26] Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA, et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in scotland. *J Med Microbiol* 2007;56:1066-75
- [27] González GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in monterrey, mexico, to seven antifungal agents: Results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* 2008;46:2902-5

- [28] Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect* 2008;56:126-9
- [29] Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2315-22
- [30] Pemán J, Cantón E, Minana JJ, Flórez JA, Echeverría J, Ortega DN, et al. Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: Results from the FUNGEMYCA study. *Rev Iberoam Micol* 2011;28:91-9
- [31] Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Alvarez M, et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5590-6
- [32] Ericsson J, Chryssanthou E, Klingspor L, Johansson AG, Ljungman P, Svensson E, et al. Candidaemia in Sweden: A nationwide prospective observational survey. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:218-21
- [33] Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, de Oliveira Cardoso LG, et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol* 2013;51:225-30
- [34] Santolaya ME, Alvarado Matute T, de Queiroz Telles F, Colombo AL, Zurita J, Tiraboschi IN, et al. Recommendations for the management of candidemia in neonates in Latin America. grupo proyecto epico. *Rev Iberoam Micol* 2013;30:158-70
- [35] Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol* 2002;42:207-27
- [36] Correia A, Sampaio P, James S, Pais C. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:313-7
- [37] Alonso-Vargas R, Elorduy L, Eraso E, Cano FJ, Guarro J, Pontón J, et al. Isolation of *Candida africana*, probable atypical strains of *Candida albicans*, from a patient with vaginitis. *Med Mycol* 2008;46:167-70
- [38] Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995;141:1507-21
- [39] Odds FC, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin Microbiol* 1998;36:2869-73
- [40] van Hal SJ, Stark D, Harkness J, Marriott D. *Candida dubliniensis* meningitis as delayed sequela of treated *C. dubliniensis* fungemia. *Emerg Infect Dis* 2008;14:327-9
- [41] Ngouana TK, Krasteva D, Drakulovski P, Toghueo RK, Kouanfack C, Ambe A, et al. Investigation of minor species *Candida africana*, *Candida stellatoidea* and *Candida dubliniensis* in the *Candida albicans* complex among Yaounde (Cameroon) HIV-infected patients. *Mycoses* 2015;58:33-9

- [42] Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2.496 patients: Data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004-2008. PLoS One doi: 10.1371/journal.pone.0101510
- [43] Tietz HJ, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaika V. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? Mycoses 2001;44:437-45
- [44] Forche A, Schonian G, Graser Y, Vilgalys R, Mitchell TG. Genetic structure of typical and atypical populations of *Candida albicans* from Africa. Fungal Genet Biol 1999;28:107-25
- [45] Romeo O, Criseo G. Morphological, biochemical and molecular characterisation of the first italian *Candida africana* isolate. Mycoses 2009;52:454-7
- [46] Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. Med Mycol 2014;52:636-40
- [47] Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol 2005;43:284-92
- [48] Sena G, Aznar P, García-Agudo L, García-Martos P. Prevalence of *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in clinical samples. Enferm Infecc Microbiol Clin 2014
- [49] López-Soria LM, Bereciartua E, Santamaría M, Soria LM, Hernández-Almaraz JL, Mularoni A, et al. First case report of catheter-related fungemia by *Candida nivariensis* in the iberian peninsula. Rev Iberoam Micol 2013;30:69-71
- [50] Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: Comparison to the literature. J Clin Microbiol 2009;47:1216-7
- [51] Fujita S, Senda Y, Okusi T, Ota Y, Takada H, Yamada K, et al. Catheter-related fungemia due to fluconazole-resistant *Candida nivariensis*. J Clin Microbiol 2007;45:3459-61
- [52] Li J, Shan Y, Fan S, Liu X. Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in vulvovaginal candidiasis. Mycopathologia 2014;178:279-83
- [53] Quindós G. Micología clínica. Elsevier; 2015
- [54] Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12th ed. MacGraw Hill; 2011
- [55] Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Farmacología. 7th ed. Elsevier; 2012
- [56] Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2124-31
- [57] Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Trautmann M. In vitro activities of voriconazole (UK-109,496) against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus infection. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:575-7

- [58] Ally R, Schurmann D, Kreisel W, Carosi G, Aguirrebengoa K, Dupont B, et al. A randomized, double-blind, double-dummy, multicenter trial of voriconazole and fluconazole in the treatment of esophageal candidiasis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2001;33:1447-54
- [59] Skiest DJ, Vazquez JA, Anstead GM, Graybill JR, Reynes J, Ward D, et al. Posaconazole for the treatment of azole-refractory oropharyngeal and esophageal candidiasis in subjects with HIV infection. *Clin Infect Dis* 2007;44:607-14
- [60] Vazquez JA, Skiest DJ, Tissot-Dupont H, Lennox JL, Boparai N, Isaacs R. Safety and efficacy of posaconazole in the long-term treatment of azole-refractory oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients with HIV infection. *HIV Clin Trials* 2007;8:86-97
- [61] Van't Wout JW. Fluconazole treatment of candidal infections caused by non-*albicans* *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:238-42
- [62] Samaranayake LP. *Candida krusei* infections and fluconazole therapy. *Hong Kong Med J* 1997;3:312-4
- [63] White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:382-402
- [64] Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, et al. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001;357:1674-5
- [65] Brammer KW, Farrow PR, Faulkner JK. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev Infect Dis* 1990;12:318-26
- [66] Arias A, Arévalo MP, Andreu A, Rodríguez C, Sierra A. In vitro susceptibility of 545 isolates of *Candida* spp. to four antifungal agents. *Mycoses* 1994;37:285-9
- [67] Chen A, Sobel JD. Emerging azole antifungals. *Expert Opin Emerg Drugs* 2005;10:21-33
- [68] Koks CH, Meenhorst PL, Bult A, Beijnen JH. Itraconazole solution: Summary of pharmacokinetic features and review of activity in the treatment of fluconazole-resistant oral candidosis in HIV-infected persons. *Pharmacol Res* 2002;46:195-201
- [69] Pirofski LA, Casadevall A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Exp Med* 2009;206:269-73
- [70] Maertens J, Boogaerts M. The place for itraconazole in treatment. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:33-8
- [71] Pagano L, Verga L, Busca A, Martino B, Mitra ME, Fanci R, et al. Systemic antifungal treatment after posaconazole prophylaxis: Results from the SEIFEM 2010-C survey. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:3142-7
- [72] Li Y, Theuretzbacher U, Clancy CJ, Nguyen MH, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of posaconazole. *Clin Pharmacokinet* 2010;49:379-96
- [73] Hossain MA, Ghannoum MA. New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9:1797-813

- [74] Hossain MA, Ghannoum MA. New developments in chemotherapy for non-invasive fungal infections. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1501-11
- [75] Castanheira M, Messer SA, Jones RN, Farrell DJ, Pfaller MA. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:320-6
- [76] Philip A, Odabasi Z, Rodríguez J, Paetznick VL, Chen E, Rex JH, et al. In vitro synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3572-4
- [77] Betts R, Glasmacher A, Maertens J, Maschmeyer G, Vazquez JA, Teppler H, et al. Efficacy of caspofungin against invasive *Candida* or invasive *Aspergillus* infections in neutropenic patients. *Cancer* 2006;106:466-73
- [78] Mariné M, Serena C, Fernández-Torres B, Pastor FJ, Guarro J. Activities of flucytosine, fluconazole, amphotericin B, and micafungin in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4757-9
- [79] Chaturvedi V, Ramani R, Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA, et al. Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1543-8
- [80] Chatzimoschou A, Katragkou A, Simitsopoulou M, Antachopoulos C, Georgiadou E, Walsh TJ, et al. Activities of triazole-echinocandin combinations against *Candida* species in biofilms and as planktonic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1968-74
- [81] Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic & clinical pharmacology. 11th ed. MacGraw Hill; 2010
- [82] McCormack PL, Perry CM. Caspofungin: A review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* 2005;65:2049-68
- [83] Mazzei T, Novelli A. Pharmacological properties of antifungal drugs with a focus on anidulafungin. *Drugs* 2009;69:79-90
- [84] Morris MI, Villmann M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. *Am J Health Syst Pharm* 2006;63:1693-703
- [85] Kurtz MB, Rex JH. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. *Adv Protein Chem* 2001;56:423-75
- [86] Espinel-Ingroff A. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12.052 fungal isolates: Review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003;20:121-36
- [87] Autmizguine J, Guptill JT, Cohen-Wolkowicz M, Benjamin DK, Jr, Capparelli EV. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children: Clinical implications. *Drugs* 2014;74:891-909
- [88] Catalán González M, Montejo Gonzalez JC. Anidulafungin: A new therapeutic approach in antifungal therapy. *Pharmacology of anidulafungin. Rev Iberoam Micol* 2008;25:92-100

- [89] Ferrer R, Gómez de la Cámara A, Jarque I, Quindós G, Tejerina T. Estudio comparativo multidisciplinar de las equinocandinas, anidulafungina, caspofungina y micafungina. *Actualidad en torno al medicamento* 2013;11:146-159
- [90] Cortes LJA, Russi NJA. Echinocandins. *Rev Chilena Infectol* 2011;28:529-36
- [91] Kauffman CA, Carver PL. Update on echinocandin antifungals. *Semin Respir Crit Care Med* 2008;29:211-9
- [92] Mensa J, Gatell J, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E, Marco F. Guía de la terapéutica antimicrobiana. Antares; 2014
- [93] Rowland M., Tozer T. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: Concepts and applications*, lippincott williams & wilkins, baltimore. MD; 2011
- [94] Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev* 2013;65:1053-90
- [95] Beal SL, Sheiner LB, Boeckmann A, Bauer RJ. NONMEM user's guides. (1989-2009), icon development solutions, ellicott city, MD. 2009
- [96] Holford NH, Kimko HC, Monteleone JP, Peck CC. Simulation of clinical trials. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:209-34
- [97] Holford N, Ma SC, Ploeger BA. Clinical trial simulation: A review. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88:166-82
- [98] Sheiner LB, Beal SL, Sambol NC. Study designs for dose-ranging. *Clin Pharmacol Ther* 1989;46:63-77
- [99] Yano Y, Beal SL, Sheiner LB. Evaluating pharmacokinetic/pharmacodynamic models using the posterior predictive check. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001;28:171-92
- [100] Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin; importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. *Am J Med* 1950;9:280-99
- [101] Mouton JW, Vinks AA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: The minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:201-10
- [102] Mueller M, de la Pena A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: Kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:369-77
- [103] Espinel-Ingroff A. Clinical relevance of antifungal resistance. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11:929-44
- [104] Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2008

- [105] Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3 S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. 2012
- [106] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for the determination of broth dilution of antifungal agents for fermentative yeasts. 2012:[http://www.eucast.org/astof\\_fungi/methods\\_of\\_antifungal\\_susceptibility\\_testing/susceptibility\\_testing\\_of\\_yeasts/](http://www.eucast.org/astof_fungi/methods_of_antifungal_susceptibility_testing/susceptibility_testing_of_yeasts/)
- [107] Canut Blasco A, Aguilar Alfaro L, Cobo Reinoso J, Giménez Mestre MJ, Rodríguez-Gascón A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis in microbiology: A tool for the evaluation of the antimicrobial treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33:48-57
- [108] Andes D, Marchillo K, Conklin R, Krishna G, Ezzet F, Cacciapuoti A, et al. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:137-42
- [109] Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Chi J, Prince RA, Tam VH, Lewis RE. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: Evidence of concentration-dependent activity. *J Infect Dis* 2004;190:1464-71
- [110] Gumbo T. Impact of pharmacodynamics and pharmacokinetics on echinocandin dosing strategies. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:587-91
- [111] Louie A, Drusano GL, Banerjee P, Liu QF, Liu W, Kaw P, et al. Pharmacodynamics of fluconazole in a murine model of systemic candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1105-9
- [112] Andes D, van Ogtrop M. Characterization and quantitation of the pharmacodynamics of fluconazole in a neutropenic murine disseminated candidiasis infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2116-20
- [113] Andes D. In vivo pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1179-86
- [114] Andes D, Marchillo K, Stamstad T, Conklin R. In vivo pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1193-9
- [115] Andes D, Marchillo K, Stamstad T, Conklin R. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3165-9
- [116] Louie A, Deziel M, Liu W, Drusano MF, Gumbo T, Drusano GL. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: Importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5058-68
- [117] Gumbo T, Drusano GL, Liu W, Kulawy RW, Fregeau C, Hsu V, et al. Once-weekly micafungin therapy is as effective as daily therapy for disseminated candidiasis in mice with persistent neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:968-74
- [118] Andes D, Marchillo K, Lowther J, Bryskier A, Stamstad T, Conklin R. In vivo pharmacodynamics of HMR 3270, a glucan synthase inhibitor, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1187-92



- [119] Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Prince RA, Marchillo K, Ashbeck J, et al. In vivo pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:539-50
- [120] Venisse N, Gregoire N, Marliat M, Couet W. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic models of in vitro fungistatic and fungicidal effects against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:937-43
- [121] Hoffman A, Stepensky D. Pharmacodynamic aspects of modes of drug administration for optimization of drug therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1999;16:571-639
- [122] Cantón E, Pemán J. Antifungal time-kill curves. *Rev Iberoam Micol* 1999;16:82-5
- [123] Gloede J, Scheerans C, Derendorf H, Kloft C. In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:186-201
- [124] Lignell A, Lowdin E, Cars O, Sanglard D, Sjolín J. Voriconazole-induced inhibition of the fungicidal activity of amphotericin B in *Candida* strains with reduced susceptibility to voriconazole: An effect not predicted by the MIC value alone. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1629-37
- [125] Meletiadis J, Al-Saigh R, Velegraki A, Walsh TJ, Roilides E, Zerva L. Pharmacodynamic effects of simulated standard doses of antifungal drugs against *Aspergillus* species in a new in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:403-10
- [126] Li Y, Nguyen MH, Schmidt S, Zhong L, Derendorf H, Clancy CJ. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and in vitro simulation of dynamic voriconazole-*Candida* interactions. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:240-5
- [127] Trivedi A, Lee RE, Meibohm B. Applications of pharmacometrics in the clinical development and pharmacotherapy of anti-infectives. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2013;6:159-70
- [128] de Oliveira RB, Atobe JH, Souza SA, de Castro Lima Santos DW. Epidemiology of invasive fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome at a reference hospital for infectious diseases in Brazil. *Mycopathologia* 2014;178:71-8
- [129] Elefanti A, Mouton JW, Krompa K, Al-Saigh R, Verweij PE, Zerva L, et al. Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against *Aspergillus* species in the presence of serum. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:1625-31
- [130] McDonald PJ, Craig WA, Kunin CM. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J Infect Dis* 1977;135:217-23
- [131] Scalarone GM, Mikami Y, Kurita N, Ichihara Y, Yazawa K, Miyaji M. Turbidometric characterization of the postantifungal effect: Comparative studies with amphotericin B, 5-fluorocytosine and miconazole on *Candida albicans*. *Mycoses* 1991;34:297-302
- [132] Procedimientos en Microbiología Clínica. Análisis farmacocinético/farmacodinámico en microbiología: Herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. SEIMC. ISBN-13: 978-84-616-4130-7. 2013

- [133] Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1108-11
- [134] Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, et al. Characterising the post-antifungal effects of micafungin against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:80-4
- [135] Oz Y, Kiremitci A, Dag I, Metintas S, Kiraz N. Postantifungal effect of the combination of caspofungin with voriconazole and amphotericin B against clinical *Candida krusei* isolates. *Med Mycol* 2013;51:60-5
- [136] Kovacs R, Gesztelyi R, Perlin DS, Kardos G, Doman M, Berenyi R, et al. Killing rates for caspofungin against *Candida albicans* after brief and continuous caspofungin exposure in the presence and absence of serum. *Mycopathologia* 2014;178:197-206
- [137] Ellepola AN, Joseph BK, Chandy R, Khan ZU. The postantifungal effect of nystatin and its impact on adhesion attributes of oral *Candida dubliniensis* isolates. *Mycoses* 2014;57:56-63
- [138] Warn PA, Sharp A, Parmar A, Majithiya J, Denning DW, Hope WW. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel triazole, isavuconazole: Mathematical modeling, importance of tissue concentrations, and impact of immune status on antifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3453-61
- [139] Nguyen KT, Ta P, Hoang BT, Cheng S, Hao B, Nguyen MH, et al. Anidulafungin is fungicidal and exerts a variety of postantifungal effects against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3347-52
- [140] Smith RP, Baltch A, Bopp LH, Ritz WJ, Michelsen PP. Post-antifungal effects and time-kill studies of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71:131-8
- [141] Li Y, Nguyen MH, Cheng S, Schmidt S, Zhong L, Derendorf H, et al. A pharmacokinetic/pharmacodynamic mathematical model accurately describes the activity of voriconazole against *Candida* spp. in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:369-74
- [142] Okusanya OO, Tsuji BT, Bulitta JB, Forrest A, Bulik CC, Bhavnani SM, et al. Evaluation of the pharmacokinetics-pharmacodynamics of fusidic acid against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* using in vitro infection models: Implications for dose selection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:101-11
- [143] Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Non-*albicans Candida* infection: An emerging threat. *Interdiscip Perspect Infect Dis* doi: 10.1155/2014/615958
- [144] Li W, Hu YA, Li FQ, Shi LN, Shao HF, Huang M, et al. Distribution of yeast isolates from invasive infections and their in vitro susceptibility to antifungal agents: Evidence from 299 cases in a 3-year (2010 to 2012) surveillance study. *Mycopathologia* 2015 [Epub ahead of print]
- [145] Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2477-82
- [146] Clancy CJ, Huang H, Cheng S, Derendorf H, Nguyen MH. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by

simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2569-72

- [147] Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3846-53
- [148] Szilagyi J, Foldi R, Bayegan S, Kardos G, Majoros L. Effect of nikkomycin Z and 50% human serum on the killing activity of high-concentration caspofungin against *Candida* species using time-kill methodology. *J Chemother* 2012;24:18-25
- [149] Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2194-7
- [150] Spreghini E, Orlando F, Tavanti A, Senesi S, Giannini D, Manso E, et al. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2195-202
- [151] Foldi R, Kovacs R, Gesztelyi R, Kardos G, Berenyi R, Juhasz B, et al. Comparison of in vitro and in vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia* 2012;174:311-8
- [152] Li Y, Nguyen MH, Derendorf H, Cheng S, Clancy CJ. Measurement of voriconazole activity against *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* isolates using time-kill methods validated by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2985-7
- [153] Walsh TJ, Lee JW, Kelly P, Bacher J, Lecciones J, Thomas V, et al. Antifungal effects of the nonlinear pharmacokinetics of cilofungin, a 1,3-beta-glucan synthetase inhibitor, during continuous and intermittent intravenous infusions in treatment of experimental disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1321-8
- [154] Sandoval-Denis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J. In vitro pharmacodynamics and in vivo efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitanae*. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:161-4
- [155] Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:75-80
- [156] Roling EE, Klepser ME, Wasson A, Lewis RE, Ernst EJ, Pfaller MA. Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:13-7
- [157] Manavathu EK, Ramesh MS, Baskaran I, Ganesan LT, Chandrasekar PH. A comparative study of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B, triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:386-9
- [158] Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Clancy CJ. Five-minute exposure to caspofungin results in prolonged postantifungal effects and eliminates the paradoxical growth of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3598-602

- [159] Varga I, Soczo G, Kardos G, Majoros L. Time-kill studies investigating the killing activity of caspofungin against *Candida dubliniensis*: comparing RPMI-1640 and antibiotic medium 3. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:149-52
- [160] Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1068-71
- [161] Varga I, Soczo G, Kardos G, Borbely A, Szabo Z, Kemeny-Beke A, et al. Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1466-8
- [162] Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Arzeni D, Giannini D, Scalise G. Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4989-92
- [163] Foldi R, Szilagyi J, Kardos G, Berenyi R, Kovacs R, Majoros L. Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:338-42
- [164] Jacobsen MD, Whyte JA, Odds FC. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* respond differently to echinocandin antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1882-4
- [165] Mariné M, Pastor FJ, Sahand IH, Pontón J, Quindós G, Guarro J. Paradoxical growth of *Candida dubliniensis* does not preclude in vivo response to echinocandin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5297-9
- [166] Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:1071-83
- [167] Gumbo T, Drusano GL, Liu W, Kulawy RW, Fregeau C, Hsu V, et al. Once-weekly micafungin therapy is as effective as daily therapy for disseminated candidiasis in mice with persistent neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:968-74
- [168] Ellepola AN, Joseph BK, Khan ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate. *Mycoses* 2014;57:553-9
- [169] Schuck EL, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of anti-infective agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005;3:361-73
- [170] de la Pena A, Grabe A, Rand KH, Rehak E, Gross J, Thyroff-Friesinger U, et al. PK-PD modelling of the effect of cefaclor on four different bacterial strains. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:218-25
- [171] Liu P, Rand KH, Obermann B, Derendorf H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibacterial activity of cefpodoxime and cefixime in in vitro kinetic models. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:120-9

- [172] Treyaprasert W, Schmidt S, Rand KH, Suvanakoot U, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of in vitro activity of azithromycin against four different bacterial strains. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:263-70
- [173] Zhuang L, Sy SK, Xia H, Singh RP, Mulder MB, Liu C, et al. Evaluation of in vitro synergy between vertilmicin and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* using a semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:151-60





