



# Actividad in vitro de las equinocandinas ¿Cómo debe evaluarse?

F. Javier Pastor y Josep Guarro

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

## Resumen

Las equinocandinas constituyen el grupo más reciente de antifúngicos con una excelente actividad sobre *Candida* spp y *Aspergillus* spp y con una muy buena toxicidad selectiva que permite la utilización de dosis elevadas con pocos efectos adversos. Se ha revisado la bibliografía existente sobre la selección de los puntos de corte para la interpretación de las pruebas de sensibilidad in vitro de levaduras y hongos filamentosos a estos antifúngicos, así como los métodos utilizados para la realización de dichas pruebas. El método más utilizado es el de microdilución, y de los datos obtenidos parece deducirse que, aplicado al estudio de las levaduras, la CMI-1 (concentración mínima que produce el 80% de inhibición del crecimiento) es el punto de corte apropiado para las equinocandinas cuando actúan solas. También debería utilizarse este punto para el resto de los antifúngicos cuando se estudia su actividad en combinación con las mismas utilizando el método del damero. En los estudios de la sensibilidad in vitro de los hongos filamentosos, la CME (concentración mínima efectiva) constituye el punto de corte más adecuado, reflejando mejor que la CMI la actividad in vivo de estos fármacos. En los estudios de sensibilidad in vitro de estos hongos a combinaciones de equinocandinas con otros antifúngicos, el punto de corte apropiado parece ser la CMI-2 (50% de inhibición del crecimiento) para todos ellos. La reciente introducción de la farmacodinámica al uso experimental de los antifúngicos debe permitir definir con mayor precisión los puntos de corte de las equinocandinas, correlacionándolos con su eficacia in vivo.

## Palabras clave

Equinocandinas, Puntos de corte, Farmacodinamia

## In vitro activity of the echinocandins. How it can be evaluated?

## Summary

Echinocandins are a novel class of antifungal drugs. They have good activity against *Candida* spp and *Aspergillus* spp. Their low selective toxicity allows their administration at high doses with few secondary side effects. We have reviewed the available data on the endpoints for these drugs in their in vitro susceptibility testing on yeasts and moulds. The microdilution broth method is the most commonly used technique and MIC-1 (80% of growth inhibition) seems to be the most reliable endpoint when yeasts are tested. This endpoint also seems to be the most appropriate for the different drugs when they are combined with echinocandins using the checkerboard method for testing yeasts. By contrast, in the case of moulds, the minimum effective concentration (MEC) correlates better with the in vivo activity than the MIC when echinocandins are tested, and when these drugs are combined with other antifungals, MIC-2 (50% of growth inhibition) seems the most appropriate endpoint. Criteria based on drug pharmacodynamics is the most useful to define the echinocandin endpoints that best correlate with their in vivo efficacy.

## Key words

Echinocandins, Endpoints, Pharmacodynamics

### Dirección para correspondencia:

Dr. F. Javier Pastor  
Unitat de Microbiologia  
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut  
Universitat Rovira i Virgili  
C/ Sant Llorenç, 21  
43201- Reus, España  
Tel.: +34 977 759 359  
Correo electrónico: franciscojavier.pastor@urv.net

La incidencia de infecciones fúngicas como causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos ha aumentado de modo notable desde la última década del siglo pasado [17,43,58]. Los tratamientos con antibióticos, los trasplantes de médula ósea y de órganos sólidos, la quimioterapia oncológica y las inmunodeficiencias primarias o adquiridas constituyen circunstancias favorecedoras del desarrollo de infecciones fúngicas graves [1,35,38,46,80,83,99,102]. La mayoría de las especies causantes de estas infecciones oportunistas suelen presentar resistencia múltiple, y generalmente impredecible, a los antifúngicos de uso clínico [19,27,36,45]. Ello ha dado lugar a un buen número de investigaciones en torno a la actividad in vitro e in vivo de nuevos agentes antifúngicos y de las combinaciones de estos entre sí o con aquellos de uso clínico establecido [55,84].

Una de las características más importantes de los antibióticos es su toxicidad selectiva, propiedad basada en el hecho de que el fármaco debe actuar sobre estructuras microbianas no presentes en las células del huésped, o cuando menos suficientemente distintas. Las células procariontas poseen estructuras y rutas metabólicas que constituyen excelentes blancos de acción para los antibióticos. Por el contrario los hongos son células eucariotas con un limitado número de dianas no compartidas por las células de nuestros tejidos, lo cual explica la escasa cantidad de fármacos de acción antifúngica existente, en comparación con la de antibióticos antibacterianos [36,48].

El grupo de sustancias activas frente a los hongos de más reciente introducción está constituido por las equinocandinas, las cuales representan el paradigma de la toxicidad selectiva por cuanto ejercen su acción sobre una diana inexistente en las células humanas. Estos antifúngicos actúan inhibiendo la glucano sintasa, enzima responsable de la síntesis del 1,3-β-glucano, polisacárido de la pared de la mayoría de hongos patógenos y responsable junto con la quitina de la morfología y rigidez de la pared celular, y por tanto de la integridad osmótica, crecimiento y división de la célula [16,48]. La naturaleza del blanco de acción de las equinocandinas y la pobre o nula metabolización de las mismas por los enzimas del sistema CYP450, explican probablemente su baja toxicidad, su excelente tolerancia y las escasas interacciones con otros antifúngicos tales como los azoles [40,95]. En la actualidad sólo está autorizado el uso clínico de la caspofungina (CSP) (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ), hallándose la micafungina (MFG) (FK463, Fujisawa Inc., Deerfield, IL) y la anidulafungina (ADF) (LY303366, Vicuron Pharmaceuticals, Fremont, CA), en fases avanzadas de investigación clínica.

Las equinocandinas poseen una buena actividad in vitro frente a *Candida* spp y *Aspergillus* spp [30,95], aunque su espectro de acción incluye también a otras especies de hongos tales como *Paecilomyces variotii*, *Scedosporium apiospermum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* [18,30]. Por el contrario son inactivas frente a zygomycetos, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp y *Trichosporon* spp [18,30]. A pesar de ello, se ha descrito un importante aumento de la actividad in vitro de la MFG frente a *Trichosporon asahii* cuando esta equinocandina se combina con anfotericina B (AMB), demostrándose la eficacia de la asociación de ambos antifúngicos en un modelo animal de infección invasiva en el ratón [88]. Recientemente se ha descrito la interacción sinérgica in vitro entre la MFG y la AMB frente a *Cryptococcus neoformans* [86].

Las equinocandinas comparten características farmacocinéticas similares. Administradas por vía oral no presentan una buena biodisponibilidad, por lo que deben administrarse por vía parenteral [18]. Dichas similitudes

son más evidentes entre la CSP y la MFG. Tras su administración a humanos, ambas equinocandinas alcanzan una concentración máxima ( $C_{max}$ ) parecida, una vida media similar, y valores elevados de las concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo (área bajo la curva o AUC), mientras que los valores de  $C_{max}$  y AUC son mucho menores en el caso de la ADF [18, 93]. Estudios farmacodinámicos in vitro han demostrado que la CSP y la MFG poseen un buen efecto post-antibiótico sobre *Candida* spp y *C. neoformans* [24,26] y desarrollan una actividad fungicida dependiente de la concentración frente a *Candida* spp [23,39,78]. Estas características farmacodinámicas han podido ser comprobadas in vivo en modelos animales de candidiasis diseminada [4,79]. Sin embargo, parecen existir algunas diferencias en algunos aspectos farmacodinámicos de las equinocandinas frente a *Aspergillus* spp. Estudios experimentales in vitro e in vivo realizados con estos hongos sugieren que la CSP posee actividad fungicida dependiente de la concentración [11,101], mientras que para la MFG dicha actividad es tiempo dependiente [12,79]. Los parámetros farmacodinámicos más estrechamente relacionados con la actividad óptima de la ADF no se han podido determinar en modelos animales [42].

### Sensibilidad in vitro: determinación de los puntos de lectura

#### Concentración mínima inhibitoria (CMI)

El estudio de la sensibilidad in vitro de los microorganismos a los antibióticos se basa generalmente en la determinación de la mínima concentración de fármaco capaz de inhibir la multiplicación de los mismos (CMI). La metodología para la determinación de las CMI ha sido bien establecida para bacterias de crecimiento rápido [66-68], y para algunas levaduras y hongos filamentosos [65,69]. Los valores de CMI indicativos de sensibilidad y resistencia (concentraciones críticas o puntos de corte) para cada fármaco y especie microbiana se definen en base a la distribución de los valores de CMI frente a los aislamientos de una misma especie, y a los caracteres farmacocinéticos y farmacodinámicos del antibiótico. Los datos obtenidos deben correlacionarse con la respuesta clínica obtenida en un número representativo de pacientes afectados del mismo proceso infeccioso y tratados con el mismo antimicrobiano bajo las mismas pautas de administración [96]. Hasta el momento, y para el estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos, solamente se han propuesto valores de CMI para AMB, flucitosina (5FC), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITC) correspondientes a concentraciones críticas de estos antifúngicos para *Candida* y *Aspergillus* [32,65,69].

Actualmente no existen recomendaciones acerca de la metodología apropiada para la determinación de la sensibilidad in vitro a las equinocandinas, ni de las concentraciones de las mismas indicativas de sensibilidad y resistencia. Son varias las técnicas descritas en la bibliografía, y de ellas la más empleada es la de microdilución en medio líquido, con diversas valoraciones de los puntos de corte: 100% de inhibición del crecimiento (CMI-0) [34,60,64,81,94], 50% de inhibición del crecimiento (CMI-2) [28,74], o 80% de inhibición del crecimiento (CMI-1) [26].

En referencia a las levaduras, aún cuando no se hayan observado diferencias sustanciales entre los resultados obtenidos con las tres valoraciones de CMI [30], la actividad fungicida de las equinocandinas sobre *Candida* spp parece sugerir que la CMI-0 sea el punto de corte adecuado. Sin embargo las observaciones de Klepser et al [51]

acerca de los cambios ultraestructurales producidos por la exposición de *Candida* spp a la ADF pueden constituir otra base de valoración de los puntos de corte. Dichas alteraciones ultraestructurales se inician a concentraciones del fármaco correspondientes a la CMI-1, y consisten en mínimos cambios tales como pequeñas depresiones o pliegues en la superficie de las células que evolucionan a alteraciones evidentes a concentraciones superiores a la CMI-1. En el trabajo de Klepser et al, la actividad fungicida de la ADF, valorada por medio de curvas de mortalidad, se relaciona con las alteraciones ultraestructurales observadas por los autores, por lo que los mismos proponen la CMI-1 como punto de corte en el estudio de la sensibilidad in vitro de *Candida* spp a dicha equinocandina. Más recientemente Ernst et al [26] han propuesto la utilización de la CMI-1 como punto de corte para la valoración de la actividad in vitro de la MFG sobre *Candida* spp, relacionando dicha CMI con la actividad fungicida del fármaco. La relación existente entre cambios estructurales, actividad fungicida y CMI-1 parece constituir una buena base para considerar los valores de esta como punto de corte para la valoración de la actividad in vitro de las equinocandinas sobre dichas levaduras. Sin embargo, esta consideración debería apoyarse también en trabajos realizados en modelos animales.

Tal y como ocurre con las levaduras, no existe unanimidad acerca de cuales son los puntos de corte adecuados para la valoración de la sensibilidad in vitro de los hongos filamentosos frente a las equinocandinas. Se han considerado la CMI-0 [15,59,90] y la CMI-1 [77] como puntos de corte para la CSP frente a *Aspergillus* spp, y la CMI-2 para la CSP y la MFG frente a *Aspergillus* spp y otros hongos filamentosos [8,31,49,64,94]. Con el método de microdilución, y especialmente cuando se considera la CMI-0 como punto de corte, estos valores de CMI son muy elevados y no se corresponden con la eficacia clínica de las equinocandinas frente a las infecciones por *Aspergillus* [95]. Por ello se han valorado otros puntos de corte y otras técnicas para determinar la sensibilidad in vitro de los hongos filamentosos a estos antifúngicos.

### Concentración mínima efectiva (CME)

En 1994 Kurtz et al [56] describieron algunos cambios morfológicos producidos en *Aspergillus* spp por la acción de la neomicandina B<sub>0</sub>, relacionándolos con la actividad del fármaco sobre la síntesis del 1,3-β-D-glucano. Los cambios microscópicos consistían en una profusa ramificación de los extremos de las hifas y en la aparición de formas globosas hinchadas que se traducían macroscópicamente por la formación de agregados muy compactos en medio líquido. La concentración de fármaco en que se iniciaban se podía determinar utilizando el método tradicional de microdilución. Kurtz et al definieron como punto de corte para los lipopéptidos la mínima concentración que daba lugar a los cambios morfológicos citados, denominándola "concentración mínima efectiva" (CME). La CME ha sido empleada por varios autores como único punto de corte en la valoración de la actividad in vitro de la ADF sobre *Aspergillus* spp [72,89,97]. Se ha demostrado que en algunos casos los cambios correspondientes a la CME se inician a concentraciones bajas del antifúngico, manteniéndose en todas las concentraciones superiores presentes en la placa de microtitulación, y no produciéndose un segundo punto de corte que correspondería a la CMI-0 [72]. En esta situación, *Aspergillus* puede ser aislado por subcultivo del contenido de los pocillos con concentraciones de ADF superiores a la CME, y las células

fúngicas desarrolladas en los subcultivos recuperan su morfología y sensibilidad a la ADF. Este crecimiento paradójico ha sido observado en estudios de sensibilidad in vitro de *Scedosporium* spp (datos no publicados) y *Chaetomium* spp [87] a la MFG, habiéndose descrito también recientemente en *Candida albicans* bajo la acción de la CSP [92]. Este fenómeno, de modo similar a lo que ocurre con el "trailing" o arrastre que puede producirse con los azoles frente a levaduras, puede significar que las equinocandinas tengan una actividad in vitro fungistática sobre algunas especies fúngicas. Aunque también se podría explicar por el "efecto Eagle", según el cual un antibiótico con actividad microbicida a bajas concentraciones puede comportarse como "estático" a concentraciones mayores [21,48]. Los trabajos realizados con tinciones vitales fluorescentes parecen apuntar a esta última posibilidad, dado que en ellos se evidencia que tanto la CSP como la MFG dan lugar a la inviabilidad de la hifas de *Aspergillus fumigatus* en crecimiento [11,100]. Probablemente las lesiones apicales en las hifas sean insuficientes para provocar un efecto fungicida in vitro, pero los cambios osmóticos y la respuesta inmune inespecífica pueden contribuir a obtener un efecto fungicida in vivo [100]. Esta hipótesis parece demostrada por la disminución de la carga fúngica pulmonar en la aspergilosis diseminada en el ratón tratada con CSP administrada en base a las CME [101]. De todo ello parece deducirse que la CME se corresponde con la actividad fungicida in vitro e in vivo de las equinocandinas frente a *Aspergillus*. Estudios comparativos han puesto de manifiesto que la CME es menos dependiente de las condiciones de trabajo que la CMI [6,31], siendo de fácil lectura y con una buena correlación con la eficacia experimental in vivo [37,97,101]. Todo ello hace que la CME sea probablemente el punto de corte más adecuado en el estudio de la sensibilidad in vitro de los hongos filamentosos a las equinocandinas.

### Concentración mínima fungicida (CMF)

Dadas las características de los pacientes y la gravedad de las micosis sistémicas, el conocimiento de la actividad fungicida de los antifúngicos empleados en el tratamiento de las mismas puede ser de especial importancia para la resolución de estos procesos infecciosos [84]. Incluso algunos autores han sugerido que los valores correspondientes a la concentración mínima fungicida (CMF) podrían ser de mayor interés predictivo que la CMI en las determinaciones de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos en cualquier situación clínica [70,85]. Por todo ello cabe pensar también en la posible utilidad de la CMF como punto de corte para evaluar la sensibilidad de las cepas fúngicas a las equinocandinas.

No existen métodos estandarizados para la determinación de la CMF, aunque se han descrito varias técnicas aplicadas al estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Varios autores han utilizado el subcultivo en medio sólido del contenido de los pocillos de las placas de microdilución en los cuales se observa la inhibición total de crecimiento [28,32,87]. Las dificultades de estandarización de este método son las mismas que las encontradas en la determinación de la CMI, y a ellas deben añadirse el arrastre de fármaco, y la elección del volumen a sembrar y del punto de corte [84]. De mayor complejidad es la metodología basada en la determinación de las curvas de mortalidad-tiempo [52], usada con frecuencia en estudios farmacodinámicos [23,25,44,53,54,57].

Existen pocos datos publicados acerca de la utilidad de la CMF como punto de corte para el estudio de la sen-

sibilidad in vitro a las equinocandinas. Klepser et al [51] han descrito una buena correlación entre la CMI-1 y la actividad fungicida de la ADF sobre *Candida* spp valorada por las dos técnicas citadas anteriormente. Estos resultados han sido corroborados posteriormente por otros autores utilizando las curvas de mortalidad-tiempo para el estudio de la actividad de la MFG [26,60]. De los trabajos citados pueden deducirse dos aspectos importantes: i) la CMI-1 puede considerarse como el punto de corte apropiado para el estudio de la sensibilidad de *Candida* spp a las equinocandinas, y ii) estos antifúngicos poseen actividad fungicida sobre este género.

De modo parecido a lo que ocurre con las CMI, los valores de CMF de las equinocandinas frente a *Aspergillus* spp exceden en varias diluciones a los de la CME [72]. Tal y como hemos citado anteriormente, las equinocandinas producen probablemente un efecto Eagle ante *Aspergillus* spp actuando in vitro como fungistáticas a concentraciones elevadas, pudiendo recuperarse el hongo por subcultivo a partir de los pocillos de microdilución correspondientes a dichas concentraciones. Por esta misma razón no es de extrañar que no se haya podido demostrar, mediante la determinación de las curvas de mortalidad-tiempo, que la CSP ejerza una actividad fungicida sobre *Aspergillus fumigatus*. La viabilidad in vitro de *Aspergillus* spp y otros hongos filamentosos expuestos a concentraciones elevadas de equinocandinas parece demostrar que la determinación de la CMF no es útil como punto de corte para el estudio de la sensibilidad in vitro de dichos hongos a estos antifúngicos.

#### Otros métodos de estudio de la sensibilidad in vitro a las equinocandinas

Se han propuesto otros métodos distintos al de microdilución para el estudio de la actividad in vitro de las equinocandinas sobre levaduras y hongos filamentosos, obteniéndose con frecuencia resultados concordantes con las CME.

Se han usado técnicas basadas en la difusión en agar comparando los resultados con los obtenidos con el método de microdilución. Bartizal et al [9] emplearon la técnica de difusión en agar en un estudio de la actividad in vitro de la CSP sobre *Aspergillus fumigatus*. Al no poder obtener puntos de corte por microdilución, no pudieron realizar el estudio comparativo entre ambas técnicas. Recientemente, utilizando discos de papel impregnados con MFG, se ha demostrado una correlación entre el diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento de *Aspergillus* spp y los valores de CME [8]. También se ha encontrado una buena correlación entre el Etest y la técnica de microdilución en el estudio de la actividad in vitro de la CSP sobre levaduras [82]. La misma metodología ha sido empleada por Espinel-Ingroff [31] para el estudio de la sensibilidad in vitro de *Aspergillus* spp a la CSP, demostrándose buena correlación entre los valores de CMI obtenidos con el Etest y las CME cuando se utiliza medio M3 en la técnica de microdilución, pero no cuando se emplea medio RPMI.

El método de dilución en agar ha sido empleado en el estudio de la sensibilidad in vitro de *Aspergillus* spp a la CSP, obteniéndose una buena correspondencia entre los valores obtenidos y las CME conseguidas por microdilución [49].

Son necesarios más estudios para la estandarización y valoración de las técnicas de dilución y difusión en agar para el estudio de la actividad antifúngica de las equinocandinas. El Etest puede constituir una alternativa fiable y

fácil de realizar, aunque cara, a la técnica de microdilución, pero existen pocos datos publicados acerca de su utilidad en el estudio de la sensibilidad de los hongos filamentosos a las equinocandinas.

#### Estudios in vitro de combinaciones de antifúngicos

Con frecuencia las especies fúngicas implicadas en infecciones graves presentan resistencias a los antifúngicos de uso clínico. Por otra parte, la situación clínica de algunos pacientes, determinada por sus patologías de base, condiciona una mayor posibilidad de manifestación de los efectos tóxicos de los antifúngicos empleados en el tratamiento. El uso de asociaciones de antifúngicos puede disminuir los efectos tóxicos de los mismos y aumentar su tolerancia, al disminuir las dosis administradas. Además la combinación de antifúngicos puede ampliar su espectro de actividad [63]. Por todo ello puede ser útil el estudio de la eficacia in vitro de asociaciones de dichos fármacos como fase previa a su utilización terapéutica.

El uso clínico de los tratamientos con asociaciones de antifúngicos se inició con el estudio comparativo entre la eficacia de la monoterapia con AMB y la de este antifúngico asociado a la 5FC en la meningitis criptocócica [10]. La introducción de las asociaciones de antifúngicos para el tratamiento de las micosis diseminadas ha sido lenta, y limitada al uso empírico de la AMB con la 5FC, o de esta con el FLC [63]. La incorporación de nuevos antifúngicos como el voriconazol (VRC) y las equinocandinas ha suscitado de nuevo el interés por el posible uso clínico de las terapéuticas combinadas, especialmente con este tipo de antifúngicos que poseen blancos de acción distintos. Como consecuencia de ello son numerosos los trabajos realizados acerca de la actividad in vitro de las combinaciones de antifúngicos, aunque no se hayan definido métodos de referencia para su estudio. Una de las técnicas más fáciles de realizar es la técnica del damero, basada en la de microdilución, que ha sido ampliamente utilizada [22], a pesar de sus limitaciones [63]. En ella, los términos sinergia, indiferencia y antagonismo se definen en base al índice de concentraciones inhibitorias fraccionadas (FICI), calculado por medio de las CMI obtenidas con cada antifúngico solo y en combinación [73]. Obviamente el criterio de selección de los puntos de corte debe ser el mismo para cada antifúngico en las dos situaciones.

En el caso del estudio de la sensibilidad de las levaduras a combinaciones de equinocandinas con otros antifúngicos, debe tenerse en cuenta que, como se ha citado anteriormente, probablemente el punto de corte adecuado para las primeras sea la CMI-1 [26,51]. Por otra parte, no parecen existir diferencias sustanciales entre los valores de CMI-0, CMI-1 o CMI-2, cuando se aplican como puntos de corte de los restantes antifúngicos [30]. Por ello parece lógico considerar a la CMI-1 como punto de corte para todas las combinaciones.

Las dificultades en la selección de los puntos de corte de las equinocandinas frente a hongos filamentosos, ya comentadas, se evidencian aún más cuando estas se hallan en asociación con otros antifúngicos. Si se seleccionan las CME como puntos de corte para las equinocandinas, surge el problema de cuáles deben ser los de la AMB y de los azoles cuando se combinan con ellas. Dado que la CME traduce los cambios inducidos en las hifas únicamente por los antifúngicos polipeptídicos, no puede ser empleada como punto de corte de otros antifúngicos [15]. Una de las dificultades que pueden surgir en la interpretación de los puntos de corte para los azoles son los cambios descritos como consecuencia de la actividad de concentra-

ciones subinhibitorias de ITC en las hifas de *Aspergillus* spp. Su posible interpretación como el efecto de interacciones sinérgicas podría dificultar el establecimiento de los puntos de corte de este antifúngico combinado con equinocandinas [55]. De todos modos, estos cambios estructurales no han sido observados por otros autores [98], o han sido descritos afectando con poca intensidad solamente a un pequeño número de hifas apicales, a diferencia de la afectación masiva producida por la CSP [11]. Otros antifúngicos como el bifonazol y el tebuconazol (fungicida de uso en viticultura) también han sido descritos como posibles inductores de cambios en las hifas [50,75].

Si el punto de corte seleccionado es la CMI, el primer problema que surge es la elección del grado de inhibición del crecimiento como criterio de lectura. Los resultados de FICI pueden variar en función del punto de corte elegido, de modo que una interacción sinérgica obtenida con lecturas de CMI-2 puede resultar antagonista si se utiliza la CMI-0 [14]. La CMI-0 es la recomendada por el NCCLS [65,69] como punto de corte para la AMB, y el mismo criterio se ha aplicado a ITC, ravuconazol (RVC), VRC y posaconazol (PSC) [33]. Sin embargo, tal y como se ha citado anteriormente, las concentraciones elevadas de equinocandinas pueden producir un crecimiento paradójico tanto en levaduras [47,91,92] como en hongos filamentosos [48,72] que impida la lectura de la CMI-0 y por tanto su uso como punto de corte.

En conclusión, deben considerarse cuatro aspectos para dilucidar cuál es el punto de corte óptimo para el estudio de la sensibilidad de levaduras y hongos filamentosos a las equinocandinas usando la técnica del damero: i) La CME parece ser el punto de corte más apropiado para el estudio de la actividad de las equinocandinas, pero no es utilizable para el resto de antifúngicos, para los cuales la CMI-0 sería la más indicada. ii) En algunas ocasiones es imposible obtener lecturas de CMI-0 para las equinocandinas. iii) La CMI-0 y la CME, cuando pueden ser interpretadas, difieren generalmente de modo llamativo, siendo la primera mucho más elevada [6,37,87,90]. iv) El grado de inhibición de crecimiento seleccionado para establecer la CMI puede dar lugar a variaciones del FICI y por tanto a diferentes interpretaciones sobre el tipo de interacciones entre los antifúngicos. Se ha demostrado que la CME de las equinocandinas sobre *Aspergillus* spp se corresponde con la CMI-2 [6-8], por ello, y de forma tentativa, parece aconsejable la utilización de este punto de corte para todos los antifúngicos en los estudios de sensibilidad de los hongos filamentosos a combinaciones de equinocandinas con otros antifúngicos.

### Estudios experimentales farmacodinámicos

El estudio farmacodinámico constituye la relación entre la farmacocinética del fármaco y el efecto terapéutico, permitiendo correlacionar los datos obtenidos in vitro e in vivo. En muchos estudios, el establecimiento de los puntos de corte de fármacos antibacterianos [66], la elección de antibiótico y dosis a administrar [5,20] y la predicción de la eficacia de tratamientos con antibacterianos combinados [62], se han basado en criterios farmacodinámicos.

Las observaciones experimentales y clínicas han permitido sugerir o definir los puntos de corte indicativos de sensibilidad y resistencia de *Candida* spp y *C. neoformans* a AMB, 5FC y algunos azoles [29,84], y existen algunos datos sobre los puntos de corte indicativos de la resistencia de *Aspergillus* spp a los azoles [61]. Sin embargo no se poseen datos que correlacionen la actividad in vitro e in vivo de otros antifúngicos sobre otros hongos filamentosos. Debido a la rareza de las infecciones causadas por estos, y por tanto a la escasez de datos clínicos, el estudio de la farmacodinamia de los antifúngicos en modelos animales constituye un camino apropiado para evaluar la eficacia in vivo de la monoterapia o de la terapia combinada de estos fármacos, pudiendo correlacionar los resultados clínicos con las pruebas de sensibilidad in vitro [2,3,13].

Actualmente, en las guías para el uso terapéutico de los antifúngicos figuran pocos datos referentes a sus parámetros farmacodinámicos [76]. Tal y como se ha citado en la introducción, los estudios farmacodinámicos en modelos animales demuestran que la CSP y la MFG poseen un prolongado efecto post-antibiótico sobre *Candida* spp y que su actividad fungicida es dependiente de la concentración administrada [2,79], siendo la relación entre el pico máximo de concentración en plasma del fármaco y su CMI para la cepa infectante ( $C_{max}/CMI$ ) el parámetro farmacodinámico más predictivo de su eficacia en la candidiasis diseminada. En este caso, la farmacodinamia de estos antifúngicos permite la administración de dosis elevadas con intervalos prolongados entre las mismas [2]. La actividad fungicida de la CSP frente a *Aspergillus* spp es también dependiente de la concentración [79,101], mientras que la MFG parece poseer una actividad fungicida dependiente del tiempo en que los niveles plasmáticos se hallan por encima de la CMI [79]. Por ello los índices predictivos de su eficacia serían la relación entre el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas y la CMI ( $AUC/CMI$ ), o entre el tiempo en que exceden a la CMI y esta ( $T/CMI$ ). En este caso sería aconsejable el uso de intervalos cortos de administración entre las dosis. En cualquier caso la farmacocinética de la CSP, la MFG y de las nuevas equinocandinas (HMR3270) ( $C_{max}$ , vida media, AUC, T, etc.) es bien conocida en el ratón, la rata y el conejo [4,41,71]. Asimismo están bien establecidas las bases para la evaluación experimental de la eficacia in vivo de los antifúngicos, como el estudio del tiempo medio de supervivencia o la recuperación fúngica de los órganos de los animales infectados. Por ello, dado que la eficacia terapéutica es el resultado de la relación entre los parámetros farmacocinéticos y la actividad in vitro, parece evidente que los estudios experimentales en modelos animales han de permitir establecer cuál es el punto de corte óptimo para las equinocandinas a partir de una administración adecuada basada en los aspectos farmacodinámicos y correlacionando los resultados in vitro e in vivo.

## Bibliografía

- Anaïsse E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: Experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* 1992; 14 (Suppl.): S43-S53.
- Andes D. In vitro pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1179-1186.
- Andes D. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics: understanding the implications for antifungal drug resistance. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 185-194.
- Andes D, Marchillo K, Lowther J, Bryskier A, Stamstad T, Conklin R. In vivo pharmacodynamics of HMK 3270, a glucan synthase inhibitor, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1187-1192.
- Anon JB, Jacobs MR, Poole MD, Ambrose PG, Benninger MS, Hadley JA, Craig WA; Sinus and Allergy Health Partnership. Antimicrobial treatment guidelines for acute bacterial rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130 (Suppl. 1): 1-45.
- Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 327-330.
- Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 245-247.
- Arikan S, Yurdakul P, Hascelik G. Comparison of two methods and three end points in determination of in vitro activity of micafungin against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2640-2643.
- Bartizal K, Gill CJ, Abruzzo GK, Flattery AM, Kong L, Scott PM, Smith JG, Leighton CE, Bouffard A, Dropinski JF, Balkovec J. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal agent MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2326-2332.
- Bennet JE, Dismukes WE, Duma RJ, Medoff G, Sande MA, Gallis H, Leonard J, Fields BT, Bradshaw M, Haywood H, McGee ZA, Cate TR, Cobbs CG, Warner JF, Alling DW. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N Engl J Med* 1979; 19: 126-131.
- Bowman JC, Scott Hicks P, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA, Douglas CM. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3001-3012.
- Chiou CC, Mavroggiorgos N, Tillem E, Hector R, Walsh TJ. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomyacin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3310-3321.
- Craig WA. Pharmacokinetic/ pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-12.
- Dannaoui E, Lorthoraly G, Dromer F. Techniques d'étude des associations d'antifongiques *in vitro* and *in vivo* chez l'animal. *J Mycol Med* 2003; 13: 73-85.
- Dannaoui E, Lorthoraly G, Dromer F. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 970-978.
- Debono M, Gordee RS. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Ann Rev Microbiol* 1994; 48: 471-497.
- Denning DW. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 608-615.
- Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003; 362: 1142-1151.
- Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 401-414.
- Dowell SF, Butler JC, Geibink GS. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance - a report from the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Working Group. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 1-9.
- Eagle H, Musselman AD. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med* 1948; 88: 99-131.
- Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. En: V. Lorian (Ed.) *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, Williams & Wilkins 1991: 432-492.
- Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. In vitro pharmacodynamics properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33: 75-80.
- Ernst E, Klepser ME, Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1108-1111.
- Ernst ME, Klepser ME, Wolfe EJ, Pfaller MA. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 33: 125-131.
- 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.
- Espinel-Ingroff A. Clinical relevance of antifungal resistance. *Infect Dis Clin N Am* 1997; 11: 929-944.
- Espinel-Ingroff A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeast. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2950-2956.
- Espinel-Ingroff. Clinical utility of in vitro antifungal susceptibility testing. *Rev Esp Quimioterap* 2000; 13: 161-166.
- Espinel-Ingroff A. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 121-136.
- Espinel-Ingroff A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991). *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 41: 403-409.
- Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, Ghannoum M, Hazen KC, Pfaller MA, Rinaldi M, Walsh TJ. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative evaluation. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1828-1835.
- Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimal fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3776-3781.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 718-721.
- Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1747-1751.
- Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microb Rev* 1999; 12: 501-517.
- González GM, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Luther M, Rinaldi MG, Graybill JR. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis* and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1854-1859.
- Gonzalez C, Venzon D, Lee S, Mueller BM, Pizzo PA, Walsh TJ. Risk factors for fungemia in children infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 515-521.
- Green LJ, Marder P, Mann LL, Chio LC, Current WL. LY303366 exhibits rapid and potent fungicidal activity in flow cytometric assays of yeasts viability. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 830-835.
- Groll AH, Kolve H. Antifungal agents: in vitro susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 256-270.
- Groll AH, Mickiene D, Petraitis V, Petraitiene R, Ibrahim KH, Pisticelli SC, Bekersky I, Walsh TJ. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal echinocandin lipopeptide micafungin (FK463) in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3322-3327.
- Groll AH, Mickiene D, Petraitiene R, Petraitis V, Lyman CA, Bacher JS, Pisticelli SC, Walsh TJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of anidulafungin (LY303366): reappraisal of its efficacy in neutropenic animal models of opportunistic mycoses using optimal plasma sampling. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2845-2855.
- Guarro J, Gené J. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 741-754.
- Gunderson SM, Hoffman H, Ernst EJ, Pfaller MA, Klepser ME. In vitro pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2887-2890.
- Hadfield TL, Smith MB, Winn RE, Rinaldi MG, Guerra C. Mycoses caused by *Candida lusitanae*. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 1006-1012.

46. Hadley S, Karchmer AW. Fungal infections in solid organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9: 1045-1074.
47. Hall GS, Myles C, Pratt KJ, Washington JA. Cilofungin (LY121019), an antifungal agent with specific activity against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1331-1335.
48. Hector RF. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 1-21.
49. Imhof A, Balajee SA, Marr KA. New methods to assess susceptibilities of *Aspergillus* isolates to caspofungin. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5683-5688.
50. Kang Z, Huang L, Krieg U, Mauler-Machnik A, Buchenauer H. Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* in vitro. *Pest Manag Sci* 2001; 57: 491-500.
51. Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1387-1391.
52. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1207-1212.
53. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1392-1395.
54. Klepser ME, Wolfe EJ, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 397-401.
55. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Combination chemotherapy for invasive fungal infections: what laboratory and clinical studies tell us so far. *Drug Resist Update* 2003; 6: 257-269.
56. Kurtz MB, Heat IB, Marrinan J, Dreikorn S, Onishi J, Douglas C. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1480-1489.
57. Lewis RE, Klepser ME, Pfaller MA. In vitro pharmacodynamic characteristics of flucytosine determined by time-kill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36: 101-105.
58. Lin S, Schranz J, Teutsch S. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358-366.
59. Manavathu EK, Alangaden GJ, Chandrasekar PH. Differential activity of triazoles in two-drug combinations with the echinocandin caspofungin against *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1423-1425.
60. Mikamo H, Sato Y, Tamaya T. In vitro antifungal activity of FK463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 485-487.
61. Moore CB, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *J Infect* 2000; 41: 203-220.
62. Mouton JW, van Ogtrop ML, Andes D, Craig WA. Use of pharmacodynamic indices to predict efficacy of combination therapy in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2473-2478.
63. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 163-194.
64. Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M. In vitro antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1376-1381.
65. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, USA, 1997.
66. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters: approved guidelines, 2<sup>nd</sup> ed. Document M23-A2. National Comité for clinical laboratory standards, Wayne, PA 2000.
67. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, USA, 2000.
68. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M7-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, USA, 2000.
69. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, USA, 2002.
70. Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YV, Morris AJ, Snyderman DR, Sutton DA, Rinaldi MG. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 1998; 177: 425-430.
71. Niwa T, Yokota Y, Tokunaga A, Yamato Y, Kagayama A, Fujiwara T, Hatakeyama J, Anezaki M, Ohtsuka Y, Takagi A. Tissue distribution after intravenous dosing of micafungin, an antifungal drug, to rats. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1154-1156.
72. Oakley KL, Moore CB, Denning DW. In vitro activity of the echinocandin antifungal agent LY303,366 in comparison with itraconazole and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2726-2730.
73. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1.
74. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, Lee J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3149-3154.
75. Osumi M, Yamada N, Yamada Y, Yamaguchi H. The effect of bifonazole on the structure of *Trichophyton mentagrophytes*. *Dermatologica* 1984; 169 (Suppl.1): 19-31.
76. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 161-189.
77. Perea S, Gonzalez G, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, Patterson TF. In vitro interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3039-3041.
78. Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, Candelario M, Sein T, Bell A, Lyman CA, McMillan CL, Bacher J, Walsh TJ. Antifungal activity of LY303366, a novel echinocandin B, in experimental disseminated candidiasis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2148-2155.
79. Petraitis V, Petraitiene R, Groll AH, Roussillon K, Hemmings M, Lyman CA, Sein T, Bacher J, Bekersky I, Walsh TJ. Comparative antifungal activities and plasma pharmacokinetics of micafungin (FK463) against disseminated candidiasis and invasive pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1857-1869.
80. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 1996; 22 (Suppl. 2): S89-S94.
81. 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: 1068-1071.
82. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Mills K, Bolmstrom A, Jones RN. Evaluation of Etest method for determining caspofungin susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4387-4389.
83. Pontón J, Rùchel R, Clemons KV, Colemans DC, Grillot R, Guarro J, Aldebert D, Ambroise-Thomas P, Cano J, Carrillo-Muñoz AJ, Gené J, Pínel C, Stevens DA, Sullivan DJ. Emerging pathogens. *Med Mycol* 2000; 38 (Suppl.1): 225-236.
84. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microb Rev* 2001; 14: 643-658.
85. Rodero L, Coroba S, Cahn P, Soria M, Lucarini M, Davel G, Kaufman S, Canteros C, Guelfand L. Timed-kill curves for *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. *Med Mycol* 2000; 38: 201-207.
86. Serena C, Fernández-Torres B, Pastor FJ, Trilles L, Lazera MS, Nolar N, Guarro J. In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* (In press).
87. Serena C, Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Sutton DA, Rinaldi MG, Guarro J. In vitro activities of new antifungal agents against *Chaetomium* spp. and inoculum standardization. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3161-3164.
88. Serena C, Pastor FJ, Gilgado F, Mayayo E, Guarro J. Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 497-502.
89. Serrano MC, Valverde-Conde A, Chavez MM, Bernal S, Claro RM, Peman J, Ramirez M, Martín-Mazuelos E. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 131-135.
90. Shalit I, Shadkhan Y, Samra Z, Oshero N. In vitro synergy of caspofungin and itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus minimal effective concentration end points. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1416-1418.

91. Spitzer ED, Travis SJ, Kobayashi GS. Comparative *in vitro* activity of LY121019 and amphotericin B against clinical isolates of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 80-81.
92. Stevens DA, Espiritu M, Parmar R. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3407-3411.
93. Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C, Hesney M, Winchel GA, Deutsch PJ, Greenberg H, Hunt TL, Waldman SA. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 739-745.
94. Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F, Kuwahara S. *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 57-62.
95. Theuretzbacher U. Pharmacokinetics/ pharmacodynamics of echinocandins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 805-812.
96. Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility test methods: general considerations. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC, ASM Press, 2003; 1102-1107.
97. Verweij PE, Oakley KL, Morrissey J, Morrissey G, Denning DW. Efficacy of LY303,366 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in a murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 873-878.
98. Vitale RG, Mouton JW, Afeltra J, Meis JF, Verweij PE. Method for measuring postantifungal effect in *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1960-1965.
99. Walter EA, Bowden RA. Infection in the bone marrow transplant recipient. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9: 823-847.
100. Watabe E, Nakai T, Matsumoto S, Ikeda F, Hatano K. Killing activity of micafungin against *Aspergillus fumigatus* hyphae assessed by specific fluorescent staining for cell viability. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1995-1998.
101. 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: 1464-1471.
102. Wingard JR, Eiflenbein GJ. Host immunologic augmentation for the control of infection. *Infect Dis Clin N Am* 1996; 10: 345-364.