

**Josep Guarro i Artigas**, Catedrático de Universidad del Departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut (Universitat Rovira i Virgili):

CERTIFICO QUE:

La Tesis Doctoral titulada **“Estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la actividad de nuevos antifúngicos frente a hongos filamentosos oportunistas”** presentada por Javier Capilla Luque, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al título de Doctor.

Para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmo la presente.

Reus, 25 de Junio de 2003

Dr. Josep Guarro i Artigas

**Universidad ROVIRA i VIRGILI**

**Facultad de Medicina i Ciències de la Salut**

**Departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques**

**Estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la actividad de  
nuevos antifúngicos frente a hongos  
filamentosos oportunistas**

**Javier Capilla Luque**

**Reus, Noviembre de 2003**

A todas las personas que  
de una forma u otra  
me han guiado hasta aquí,  
especialmente a mi familia.

A los que han sido, son y  
serán, porque ese soy yo.

El trabajo experimental de la presente tesis ha sido realizado en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili bajo la dirección del Profesor Josep Guarro i Artigas y en el California Institute for Medical Research de Stanford University en Santa Clara bajo la supervisión de los doctores David Stevens y Karl Clemons. Ello ha sido posible gracias a las becas y ayudas recibidas de la Universitat Rovira i Virgili, del Institut d'Estudis Avançats de la misma Universidad y de la Fundació Ciència i Salut.

## **AGRADECIMIENTOS**

Han sido muchas las personas que han permitido adentrarme en la ciencia gracias a su espíritu crítico, constructivo y humano. A todas ellas quiero agradecer el haberme servido de guía tanto en el ámbito profesional como en el personal. A todas ellas, ¡MUCHAS GRACIAS!

Al Prof. Josep Guarro por haberme guiado inagotablemente durante todo este tiempo. Por haberme enseñado acerca de la ciencia y la profesionalidad sin que haya faltado nunca una dosis de humor. Espero haber retenido algo de todo ello.

Al Dr. Javier Pastor por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio. Por su inestimable ayuda en mi formación y su valiosísima amistad.

Quiero agradecer al Dr. Emili Mayayo su ayuda y sus esfuerzos en acercarme a la histología, su gran amistad y su apoyo en la realización de este trabajo.

A los Dres. Josep Cano, M<sup>a</sup> José Figueras y Fina Gené que desinteresadamente se han esforzado en mejorar el trabajo en el laboratorio. Gracias por la confianza que habéis depositado en mí.

Al Dr. David Stevens del California Institute for Medical Research (CIMR) de la Universidad de Stanford, California, E.E.U.U. por haberme brindado la

oportunidad de trabajar en su laboratorio y adquirir nuevos conocimientos y gratas experiencias.

Al Dr. Karl V. Clemons del CIMR por haberme adoptado dentro y fuera del laboratorio, por ser un excelente investigador y un gran amigo.

A Frederic Ballester, Beli Pujol y al Dr. Alberto Stchigel por haberme ayudado a dar los primeros pasos en los laboratorios de microbiología.

A Montserrat Plans por haber hecho que me interese la biología y al Dr. Josep Girbal, por ser culpable de que los hongos y yo seamos amigos.

También quiero agradecer a todos los amigos y compañeros de la Universidad Rovira i Virgili, a Montse, Lara, Mati, Mabel, Dania, Kendra, Belkis, Cori, Clara, María, Pilar, Arantxa, Josepa, Núria, Carme Sant Martí, Juan, Amparo, Carol, Félix, Antonio, Ester, Marta, Carme, Isabel y Mar que han hecho que el trabajo haya sido divertido. A Mònica Oliva. También a los compañeros del CIMR por la estupenda bienvenida que me otorgaron, al Dr. Brumer, Dr. Kamberri, a Claudia, Mónica, Lani, Marta, Roxane y Miguel.

Con cariño a Gemma que siempre ha creído en mi, por su apoyo y confianza.

A todos aquellos profesores, micólogos, amigos y familiares que, aunque sin saberlo, me han conducido hasta aquí.

## ***Índice de abreviaturas***

<b>a. c:</b>	Antes de Cristo
<b>APD:</b>	Agar de patata y dextrosa
<b>CMI:</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CPD:</b>	Caldo de patata y dextrosa
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dióxido de carbono
<b>CXC:</b>	Carboximetil celulosa
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E.E.U.U:</b>	Estados Unidos
<b>g:</b>	Gramo
<b>G-CSF:</b>	Granulocyte Colony Stimulating Factor (Factor estimulador de colonias de granulocitos).
<b>GM-CSF:</b>	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos).
<b>i.p:</b>	Por via intraperitoneal
<b>i.v:</b>	Intravenosamente
<b>kg:</b>	Kilogramo
<b>m<sup>3</sup>:</b>	Metro cúbico
<b>M-CSF:</b>	Macrophages Colony Stimulating Factor (Factor estimulador de colonias de macrófagos).
<b>ml:</b>	Mililitro
<b>NCCLS:</b>	National Comitee for Clinical Laboratory Standards
<b>PEG 200:</b>	Polietilenglicol 200
<b>p.o:</b>	Por via oral
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico

<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>SIDA:</b>	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
<b>SNC:</b>	Sistema nervioso central
<b>TMS:</b>	Tiempo medio de supervivencia
<b>UFC:</b>	Unidades formadoras de colonias
<b><math>\beta</math>-CDX:</b>	$\beta$ -ciclodextrina
<b><math>\mu</math>g:</b>	Microgramo
<b><math>\mu</math>l:</b>	Microlitro

# ÍNDICE

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los orígenes de la micología médica .....	2
1.2. Enfermedades causadas por hongos .....	5
1.2.1. Micosis superficiales .....	5
1.2.2. Micosis cutánea .....	6
1.2.3. Micosis subcutáneas .....	6
1.2.4. Micosis sistémicas .....	9
1.2.4.1. Los hongos dimórficos .....	9
1.2.4.2. Los hongos oportunistas .....	9
1.2.4.2.1. Aspergilosis .....	12
1.2.4.2.2. Scedosporiosis .....	13
1.2.4.2.3. Fusariosis .....	15
1.3. El tratamiento de las infecciones fúngicas .....	17
1.3.1. Derivados poliénicos .....	18
1.3.2. Compuestos azólicos .....	21
1.3.3. Análogos de los precursores de ácidos nucleicos .....	24
1.3.4. Derivados peptídicos .....	25
1.3.5. Alilaminas .....	27
1.3.6. Nuevas estrategias en el tratamiento de las micosis sistémicas .....	28

1.4. Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i> a los antifúngicos .....	31
1.4.1. Estandarización de la metodología .....	31
1.4.2. Métodos comercializados .....	32
1.4.2.1. Etest® .....	33
1.4.2.2. Sensititre Yeast One® .....	35
1.4.2.3. ASTY Colorimetric Panel® .....	36
1.4.2.4. Fungitest® .....	36
1.5. Estudios de sensibilidad <i>in vivo</i> a los antifúngicos .....	38
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
3.1. Estudios <i>in vitro</i> .....	48
3.1.1. Cepas .....	48
3.1.2. Conservación de las cepas .....	48
3.1.3. Agentes antifúngicos .....	49
3.1.4. Metodología .....	49
3.1.4.1. Preparación de los antifúngicos .....	49
3.1.4.2. Preparación de los inóculos .....	51
3.1.4.3. Dispensación en las microplacas .....	51
3.1.4.4. Lectura e interpretación de los resultados .....	52
3.2. Estudios <i>in vivo</i> .....	54
3.2.1. Cepas .....	54

3.2.2. Animales .....	54
3.2.3. Inmunosupresión .....	54
3.2.4. Infección de los animales .....	55
3.2.5. Antifúngicos .....	55
3.2.6. Tratamientos .....	57
3.2.7. Recuperación fúngica a partir de los órganos del animal infectado .....	58
3.2.8. Análisis estadístico .....	58
3.2.9. Histopatología .....	60
3.2.9.1. Observación macroscópica .....	60
3.2.9.2. Observación microscópica .....	60
3.2.9.2.1. Deshidratación de las muestras .....	61
3.2.9.2.2. Parafinado .....	61
3.2.9.2.3. Realización de los cortes histológicos .....	61
3.2.9.2.4. Desparafinado y rehidratación de las muestras .....	62
3.2.9.2.5. Tinción de las muestras .....	62
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
4.1. Evaluación de un método colorimétrico para determinar la susceptibilidad <i>in vitro</i> de hongos dermatofitos	
<b>4.1.1. Use of the Sensititre Colorimetric Microdilution Panel for             Antifungal Susceptibility of Dermatophytes</b>	
Antimicrob. Agents Chemother. <b>40</b> :2618:2621	

4.2. Determinación de la actividad *in vitro* del albaconazol (UR-9825) frente a hongos filamentosos oportunistas

**4.2.1. In vitro Antifungal Activities of the New Triazole UR-9825 Against Clinically Important Filamentous Fungi**

Antimicrob. Agents Chemother. **45**:2635-2637

4.3. Determinación de la eficacia *in vivo* de nuevos antifúngicos frente a hongos filamentosos oportunistas

4.3.1. Scedosporiosis

**4.3.1.1. Efficacy of Albaconazole (UR-9825) in the Treatment of Disseminated Infection by *Scedosporium prolificans***

Antimicrob. Agents Chemother. **40**:2618-2621

**4.3.1.2. Efficacy of Voriconazole in the Treatment of systemic Scedosporiosis in Neutropenic Mice**

Antimicrob. Agents Chemother. En prensa

**4.3.1.3. Eficacia de Voriconazol en el Tratamiento de Scedosporiosis Sistémica en Cobayas. Correlación *in vitro* / *in vivo***

En preparación

**4.3.1.4. Fracaso terapéutico de Anfotericina B desoxicolato, Anfotericina B Liposomal y Ravuconazol en un Modelo Animal de Scedosporiosis**

En preparación

4.3.2. Aspergilosis

4.3.2.1. **Development of a Murine Model of Cerebral Aspergillosis**

J. Infect. Dis. **186**:574-577

4.3.2.2. **Efficacy of Amphotericin B or Itraconazole in a Murine Model of Central Nervous System *Aspergillus* Infection**

Antimicrob. Agents Chemother. **47**:813-815

4.3.2.3. **Efficacy of Micafungin Alone or in Combination Against Systemic Murine Aspegilosis**

Antimicrob. Agents Chemother. **47**:1452-1455

4.3.3. Paecilomicosis

4.3.3.1. **Infección experimental por *Paecilomyces lilacinus* en Ratones Inmunocomprometidos. Fracaso en la Monoterapia con Ravuconazol o Terbinafina y en la Combinación de Ambos**

En preparación

4.3.4. Fusariosis

4.3.4.1. **Desarrollo de Modelos de Infección Sistémica por *Fusarium* spp. en Cobayas**

En preparación

<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	150
5.1. Evaluación de un método colorimétrico para determinar la susceptibilidad <i>in vitro</i> de hongos dermatofitos	
5.2. Determinación de la actividad <i>in vivo</i> del albaconazol frente a hongos filamentosos oportunistas	
5.3. Determinación de la eficacia <i>in vivo</i> de nuevos antifúngicos frente a hongos filamentosos oportunistas	
5.3.1. Scedosporiosis	
5.3.2. Aspergilosis	
5.3.3. Paecilomicosis	
5.3.4. Fusariosis	
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	168
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	172

# INTRODUCCIÓN

## 1.1. LOS ORÍGENES DE LA MICOLOGÍA MÉDICA

La micología es una ciencia relativamente moderna a pesar de que los hongos eran conocidos por el hombre ya en la prehistoria. El estudio de coprolitos nos ha permitido conocer algunos de los hábitos alimenticios del hombre en aquellas épocas, entre los que se incluía el consumo de algunas especies de basidiomicetos, especialmente pertenecientes al género *Lactarius*. El 19 de Septiembre de 1991, un grupo de alpinistas encontró en perfecto estado de conservación los restos de un hombre prehistórico en un glaciar de Hauslabjoch, en la frontera Austro-Italiana. Existe todavía controversia acerca de la antigüedad de los restos recuperados, pero se estima que datan de entre 5.500 y 4.500 a.c. Entre las diferentes pertenencias, se encontraron dos especies de setas, *Piptoporus betulinus* y *Fomes fomentarius*, atadas a sendas tiras de cuero (Peintner *et al.*, 1998). Aunque no se conozca con exactitud su utilidad, el hallazgo ha contribuido a demostrar que el conocimiento de los hongos ya existía, con una finalidad distinta a la nutricional, en el neolítico

Los antiguos griegos y romanos fueron grandes conocedores de los hongos, a los cuales apreciaban por sus propiedades gastronómicas. Así por ejemplo, *Amanita cesarea*, a la que llamaban “boleti”, fue una de la especies más valoradas por los emperadores. Conocían también los efectos tóxicos de algunas especies de basidiomicetos que fueron

usados con fines criminales. Así por ejemplo *Amanita phalloides*, fue utilizada para asesinar a Claudio permitiendo erigir a Nerón como nuevo emperador.

Las culturas precolombinas también hicieron uso deliberado de las propiedades tóxicas de algunas especies de basidiomicetos, que introdujeron en sus ritos con fines místicos y religiosos tal como relata el dominico español del siglo XVI Diego Durán (Heim, 1960)

A lo largo de la historia encontramos descritas numerosas enfermedades asociadas a las propiedades tóxicas de algunos hongos. Una de las mayores epidemias de las que tenemos constancia se produjo en el siglo XI cuando una extraña enfermedad afectó a gran parte del oeste de Europa. Recibió el nombre de “Fuego de San Antonio” o *Ignis Sacer* debido a la sensación de quemazón que sentían quienes la padecían. La enfermedad ocasionaba una gangrena seca progresiva con mutilación de los miembros (Fig. 1). En el año 1771 el Abad de Tesier descubrió la etiología del proceso al comprobar que el centeno con el que se elaboraba el pan para consumo humano estaba contaminado por esclerocios del hongo *Claviceps purpurea*. En la actualidad esta intoxicación se conoce como ergotismo y es sumamente infrecuente debido sobretodo a que los procesos utilizados para la limpieza y el molido del grano eliminan la mayor parte del cornozuelo del centeno quedando unos niveles de alcaloides muy bajos. El último brote registrado de ergotismo gangrenoso se produjo en Etiopía en 1977-1978

afectando a 140 personas y alcanzando un mortalidad del 34 % (Peraica *et al.*, 2000)



Figura 1. Pintura medieval de Pieter Breughel (1525-1569) donde se representan personajes con las secuelas del ergotismo.

Las propiedades tóxicas de algunas especies de hongos han sido conocidas y utilizadas a lo largo de la historia por numerosas culturas, sin embargo, el concepto de los hongos como organismos vivos con capacidad de producir infecciones en animales y humanos, es relativamente moderna. Uno de los pioneros de la micopatología fue Agostino Bassi (1773 – 1856) que en el año 1807 descubrió la causa de una extraña enfermedad que afectaba a los gusanos de seda y que estaba mermando la industria textil italiana, determinando que era causada por un hongo al que se denominó *Botrytis bassiana* (actualmente *Beauveria bassiana*). Treinta años después Remark

describió la primera micosis humana al observar que las costras de tiña favosa estaban compuestas por “cuerpos esféricos y fibras ramificadas” (hifas de *Trichophyton schoenleinii*), realizando así la primera observación y descripción de una hifa fúngica. Pero sin duda, uno de los personajes claves para la micología fue R. J. Andrien Sabouraud (1864 - 1938). Sabouraud estableció una clasificación de los dermatofitos basándose en su morfología e ideó los primeros medios sólidos de cultivo que aún en el momento actual siguen siendo utilizados con sólo pequeñas modificaciones. Un texto que fue fundamental en los inicios de la técnica microbiológica fue el “Manual of Clinical Mycology” de Norman Francis Conant (1944) que contribuyó a sentar las bases de la hasta entonces confusa micología médica (da Silva *et al.*, 2002)

## 1.2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS

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

Los hongos pueden originar patologías muy variadas que pueden ser clasificadas de acuerdo con su localización inicial en:

### 1.2.1. Micosis superficiales

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

### 1.2.2. Micosis cutáneas

Difieren de las superficiales en que pueden afectar a capas más profundas de la piel provocando la respuesta inmunitaria del huésped. Los dermatofitos son los principales causantes de este tipo de infecciones cutáneas siendo *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum* los géneros más frecuentemente implicados (de Hoog *et al.*, 2000). La etiología de las infecciones cutáneas no se encuentra limitada a este grupo de hongos ya que algunos hongos no dermatofitos pueden también estar implicados en dicha infección. Así por ejemplo

*Candida* spp. pueden originar candidiasis mucocutánea, *Scopulariopsis brevicaulis* puede ser causa de onicomicosis y *Nattrassia mangiferae* de hiperqueratosis en manos y pies. Las micosis cutáneas pueden evolucionar ocasionando lesiones subcutáneas (Smith et al., 1991; Erbagci, 2002).

### 1.2.3. Micosis subcutáneas

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

- **Eumicetoma.** Son lesiones supurativas cuyo exudado presenta microcolonias en forma de granos. Podemos diferenciar eumicetomas de “grano claro”, los agentes causantes de los cuales son principalmente *Acremonium* spp., *Neotestudina rossatii* y *Pseudallescheria boydii* y eumicetomas de “grano oscuro” cuyos agentes etiológicos son principalmente *Exophiala* spp. (Padhye et al., 1984 ; de Hoog et al., 2000), *Madurella* spp (McGinnis, 1996), *Leptosphaeria* spp. *Sporothrix*

*schenckii* (Pelzer *et al.*, 2000), *Curvularia* sp. (Subramanyam *et al.*, 1993) y *Scytalidium* spp. (Dhindsa *et al.*, 1998).

• **Esporotricosis.** Causada por *Sporothrix schenckii*, es una enfermedad infecciosa de distribución mundial. La adquisición es básicamente por inoculación traumática y cursa con formación de úlceras purulentas con márgenes rojos aunque es frecuente que la afectación se extienda a los ganglios linfáticos ocasionando esporotricosis linfocutánea (Lyon *et al.*, 2003). No obstante se puede producir la diseminación a estructuras osteo-articulares y vísceras en pacientes tanto sanos como inmunocomprometidos (Morris-Jones, 2002).

• **Lobomicosis.** El agente etiológico es *Lacazia loboi*, un hongo que hasta la fecha no se ha podido aislar en cultivo (de Hoog *et al.*, 2000; Belone *et al.*, 2002). La enfermedad se caracteriza por la formación de nódulos en la piel y placas de apariencia queloidea en las extremidades, nalgas y lóbulos de la orejas (Fuchs *et al.*, 1990). La mayoría de casos se han publicado en el Sur y Centro de América.

• **Rinosporidiosis.** Causada por *Rhinosporidium seeberi*, es una infección primaria de la mucosa nasal caracterizada por la formación de granulomas inflamatorios que pueden llegar a convertirse en pólipos (Van Der Coer *et al.*, 1992; Guarro, Atlas).

- **Rinitis zigomicótica.** Comúnmente producida por *Rhizopus* spp. afecta a mucosa nasal. Debido al rápido crecimiento del hongo, la infección puede invadir los vasos sanguíneos y llegar a afectar al SNC originando infartos cerebrales y meningitis (González *et al.*, 2002).

- **Cromoblastomicosis.** Dicha infección se caracteriza por la presencia de lesiones ulcerativas sin exudación, poco extensas y de localización preferentemente en extremidades. Pueden llegar a diseminarse por vía linfática. Los agentes responsables típicos de la cromoblastomicosis son: *Cladophialophora carrioni*, *Fonsecaea* spp. (de Hoog *et al.*, 2000), *Phialophora verrucosa* (Sharma *et al.*, 2002) o *Exophiala dermatitidis* (Clancy *et al.*, 2000)

#### 1.2.4. Micosis sistémicas

En las micosis sistémicas se produce la afectación de dos o más órganos. Pueden afectar a huéspedes sanos, siendo los hongos denominados dimórficos los agentes causales, los cuales han desarrollado mecanismos para proliferar en los tejidos del huésped inmunocompetente. Sin embargo, son mucho más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos, siendo en este caso ocasionadas por hongos oportunistas que usualmente no causan infección en el huésped sano.

#### **1.2.4.1. Los hongos dimórficos**

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

#### **1.2.4.2. Los hongos oportunistas**

Reciben el nombre de hongos oportunistas un grupo heterogéneo de hongos saprótrofos del suelo, que presentan una distribución geográfica amplia y que tradicionalmente son considerados como no patógenos. Sin embargo, en determinadas circunstancias en las que el huésped se encuentra inmunocomprometido, pueden causar un cuadro infeccioso. Generalmente suelen ser pacientes con alteraciones en la respuesta inmunitaria inespecífica, como los neutropénicos, o aquellos en los que la afectación inmunitaria incluye también la respuesta adaptativa, como es el caso de individuos sometidos a tratamientos

sistémicos con corticoides o radioterapia y/o quimioterapia antineoplásica (Spellberg y Edwards, 2001).

El incremento de la incidencia de las infecciones oportunistas está relacionado, y evoluciona paralelamente con el desarrollo de tratamientos antineoplásicos y con los avances en la cirugía de trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea que, aunque permiten prolongar la vida de pacientes con enfermedades malignas, provocan un estado de inmunodepresión severa que predispone al establecimiento de este tipo de infecciones. La aparición del SIDA a finales de la década de los 70 como enfermedad inmunosupresiva, ha contribuido también en gran parte a incrementar el desarrollo de infecciones oportunistas, entre las cuales las micosis ocupan un importante lugar. Si bien las infecciones oportunistas fueron consideradas antaño como afectaciones exóticas o raras, debido a su baja incidencia, a partir de las últimas décadas del siglo XX, se ha producido un aumento paralelo al aumento de pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo no puede excluirse la posibilidad, aunque rara, de la infección por hongos filamentosos oportunistas en individuos inmunocompetentes (Karim *et al.*, 1997; Greig *et al.*, 2001), especialmente en aquellos con implantaciones prolongadas de catéteres intravasculares, terapias antimicrobianas continuadas, prótesis o heridas traumáticas (Cimerman *et al.*, 1999; Mousa *et al.*, 1999; Lavy *et al.*, 2001).

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

- Alteraciones de las barreras naturales
  - Antibioterapia múltiple
  - Implantación de catéteres intravasculares durante periodos prolongados de tiempo
  - Quemaduras, úlceras o traumatismos
- Alteraciones cuantitativas y/o funcionales del sistema inmunitario
  - Radioterapia
  - Quimioterapia
  - Aplasia medular
  - Enfermedad granulomatosa crónica
  - Diabetes
  - SIDA
  - Leucemias
  - Uso de agentes inmunosupresores en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, así como en trasplantes de tejidos sólidos y de médula ósea.

Es difícil poder establecer un listado de hongos oportunistas ya que el número de especies involucradas incrementa constantemente.

Entre los hongos filamentosos oportunistas probablemente, los de mayor relevancia clínica por su elevada incidencia, mortalidad y dificultad en establecer un tratamiento efectivo son *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans* y *Fusarium solani*.

#### 1.2.4.2.1. Aspergilosis

La aspergilosis son aquellas infecciones causadas por una de las especies de *Aspergillus*. Las más comunes son *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*, siendo la primera la más frecuente. Dicha especie produce infecciones sistémicas generalmente en pacientes inmunodeprimidos (Dening, 1998), especialmente en receptores de transplante de células progenitoras hematopoyéticas o en aquellos que presentan alguna enfermedad hematológica de base tal como leucemia o linfoma (Patterson *et al.*, 2000).

*Aspergillus fumigatus* es un hongo hialino que produce gran cantidad de conidios de un diámetro aproximado de 3  $\mu\text{m}$ . Este pequeño tamaño junto con su lenta velocidad de sedimentación y la elevada viabilidad de los mismos en el medio aéreo, hacen que *A. fumigatus* sea uno de los hongos más frecuentemente aislados en los muestreos de aire (Arnou *et al.*, 1991). La elevada prevalencia de *A. fumigatus* en el aire es uno de los principales factores de riesgo para la adquisición de aspergilosis nosocomial. Numerosos autores han descrito la relación existente entre la presencia en el aire de determinadas concentraciones

de conidios viables de *Aspergillus* sp. y el aumento en la incidencia de aspergilosis invasora nosocomial (Hospenthal *et al.*, 1998). En este mismo sentido numerosos autores relacionan la aparición de brotes de aspergilosis invasora en pacientes inmunocomprometidos con las obras de construcción o remodelación de hospitales y áreas cercanas (Lentino *et al.*, 1982; Sarubbi *et al.*, 1982; Kraisinski *et al.*, 1985). En la mayoría de ocasiones la puerta de entrada de *A. fumigatus* es la vía respiratoria y el foco primario de infección el pulmón. Sin embargo, se han descrito otras localizaciones tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes tales como piel, peritoneo, ojos y tracto gastrointestinal (Latgé, 1999). En pacientes inmunocomprometidos se puede producir una colonización por *Aspergillus* que puede evolucionar a una aspergilosis broncopulmonar o a una aspergilosis sistémica. La aspergilosis broncopulmonar se da principalmente en pacientes de asma atópico o fibrosis quística (Basica *et al.*, 1981; Laufer *et al.*, 1984). En el caso de la aspergilosis pulmonar localizada, la manifestación clínica cursa como un aspergiloma en los pacientes inmunocompetentes. Radiológicamente las lesiones se observan como masas miceliales bien delimitadas ocupando cavernas pulmonares preexistentes. También se ha observado la formación de aspergilomas cutáneos en pacientes con quemaduras graves (Becker *et al.*, 1991). En pacientes con alteraciones inmunitarias, la infección se puede diseminar, a partir del foco primario, a diferentes tejidos como el epitelial, renal, cardíaco, ojos y también a tejido

nervioso (Wingard *et al.*, 1987; Bodey y Vartivarian, 1989; Pagano *et al.* 1996; Denning, 1998). Más raramente se han descrito formas de aspergilosis en epiglotis, pericardio, tracto gastrointestinal, peritoneo, hígado, tiroides y hueso (Denning, 1998).

#### **1.2.4.2.2. Scedosporiosis**

Reciben este nombre las infecciones causadas por *Scedosporium* spp. Existen dos especies de *Scedosporium* de importancia médica: *S. prolificans*, aislado por primera vez en 1909 a partir de un micetoma, y *S. apiospermum* descrita en 1921 (Cremer y Boiron, 1996). Desde la década de los 90 se ha producido un aumento significativo del número de infecciones causadas por este género entre los pacientes con enfermedades hematológicas graves de base (de Hoog *et al.*, 1994). La infección es similar, en cuanto a la variedad de su manifestación clínica y a su severidad, a la producida por *A. fumigatus*.

Las infecciones primarias por *Scedosporium* spp. son adquiridas generalmente por inhalación de conidios o inoculación traumática directa (Cremer *et al.*, 1996). También se han documentado casos de scedosporiosis en personas que han sufrido diferentes grados de asfixia por inmersión en aguas estancadas (Dworzack *et al.*, 1989). La evolución de la infección es variable en función del estado inmunológico del paciente, la vía de infección y la especie involucrada. Así, *S. apiospermum* produce principalmente micetomas subcutáneos después

de su inoculación traumática y más raramente puede afectar a hueso o músculo (Cremer *et al.*, 1996; Horré y de Hoog, 1999; Castiglioni *et al.*, 2000). Otra puerta de entrada importante para este hongo es la pulmonar. En el paciente inmunocomprometido y especialmente en los neutropénicos, se puede producir la diseminación del hongo a partir del foco primario (Gumbart, 1983) afectando diferentes órganos. Cabe destacar especialmente el tropismo de *S. apiospermum* por SNC, siendo unas de las principales especies responsables de infecciones cerebrales primarias (Horré y de Hoog, 1999). *S. prolificans* provoca principalmente infecciones localizadas post-traumáticas, pulmonares y diseminadas.

Las especies de *Scedosporium* son hongos dematiáceos que presentan una elevada resistencia *in vitro* a los antifúngicos tradicionales (Espinell-Ingroff, 2001) así como frente a los nuevos compuestos (Carrillo-Muñoz y Guarro, 2001). En general, *S. prolificans* posee una resistencia *in vitro* a los antifúngicos ligeramente mayor que *S. apiospermum* (Carrillo-Muñoz y Guarro, 2001; Meletiadis *et al.*, 2002a). Los modelos desarrollados en animales de experimentación con ambas especies, demuestran también diferencias en la virulencia de las mismas. *S. prolificans* ha demostrado una mayor virulencia, reflejada en la elevada mortalidad que provoca en ratones en comparación con la provocada por *S. apiospermum* (Drouhet *et al.*, 1991; Cano *et al.*, 1992; Ortoneda *et al.*, 2002;).

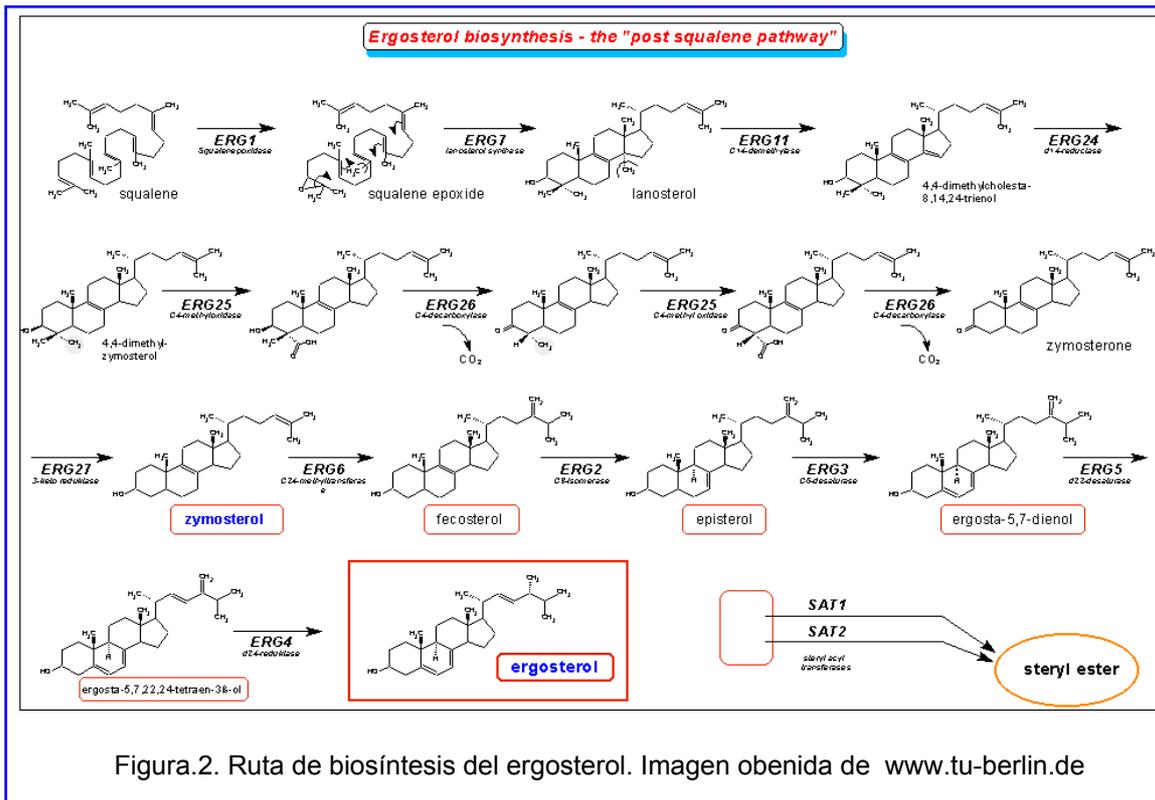
### 1.2.4.2.3. Fusariosis

Como en la mayoría de hongos filamentosos considerados oportunistas, *Fusarium* spp. son hongos saprótrofos del suelo y patógenos de plantas (Guarro *et al.*, 1995). Las especies de *Fusarium* poseen una limitada patogenicidad para el hombre. Tradicionalmente han sido causantes de infecciones cutáneas (Bodey *et al.*, 2002; Nucci y Anaissie, 2002; Cocuroccia *et al.*, 2003), infecciones superficiales tales como queratitis (Thomas, 1994), onicomycosis, otitis e infecciones de quemaduras o heridas en la piel (Whesler, *et al.*, 1982; Landau, *et al.*, 1992) y, más raramente, infecciones subcutáneas localizadas (Guarro y Gené, 1995). Algunas especies de *Fusarium* son capaces de elaborar micotoxinas tales como las fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> que pueden afectar al ser humano (Peraica *et al.*, 1999) y que causaron importantes brotes tóxicos en la India y China (Bath *et al.*, 1997). Sin embargo, a partir de la década de los 70, los casos de fusariosis diseminada han incrementado entre la población neutropénica (Guarro *et al.*, 1995; Khoury y Ball, 2003) afectando principalmente pulmón, senos, bazo, riñón, hígado y corazón (Guarro *et al.*, 1995). Las especies más comunes causantes de fusariosis son *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*. Aproximadamente la mitad de casos descritos de fusariosis están atribuidos a *F. solani* (de Hoog *et al.*, 2000). Aunque otras especies tales como *F. dimerum*, *F. sacchari* o *F. proliferatum* también han estado ocasionalmente involucrados en infecciones en humanos. Las especies de *Fusarium* de

interés clínico suelen presentar resistencia *in vitro* a los antifúngicos más utilizados (Guarro *et al.*, 1999; Masià y Gutiérrez, 2002).

### 1.3. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS

Las primeras sustancias utilizadas en el tratamiento de las infecciones fúngicas fueron compuestos tales como el yoduro potásico, metaloides y derivados azufrados. Posteriormente se introdujeron los primeros antifúngicos, denominados de primera generación por ser derivados de productos naturales o productos de la actividad metabólica de determinados microorganismos. Más tarde se desarrollaron los de segunda generación obtenidos predominantemente por síntesis química. No obstante existen importantes inconvenientes para el desarrollo de fármacos antimicóticos eficaces entre los que cabe destacar el hecho de que tanto el hongo como los tejidos huésped están constituidos por células eucariotas con características bioquímicas similares. Ello implica que los efectos secundarios sobre el huésped constituyen un importante obstáculo para la obtención de fármacos eficaces. La mayoría de antifúngicos comercializados o en fase de experimentación, tienen como diana de acción el ergosterol o alguno de sus precursores en la ruta de biosíntesis (Fig.2). A pesar de que el ergosterol es el compuesto mayoritario de la membrana fúngica existen otros componentes estructurales en la célula utilizados como blanco de acción de diversos antifúngicos tales como el manano, la quitina o el  $\beta$ -(1,3)-D-glucano.



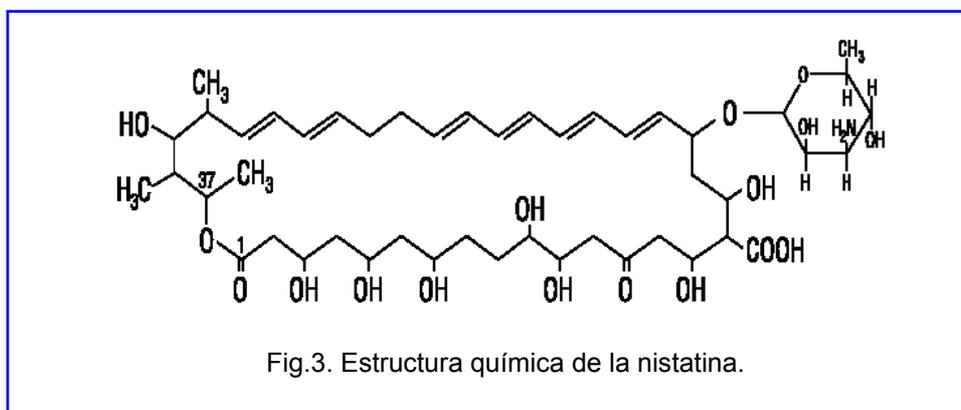
Una de las posibles clasificaciones de los diferentes compuestos antifúngicos se basa en su estructura química.

### 1.3.1. Derivados poliénicos

Los derivados poliénicos son antifúngicos producidos por diversas especies de *Streptomyces*. Su estructura química se caracteriza por la presencia de un anillo macrólido de 26 a 38 átomos de carbono. Una de sus características es su carácter anfipático debido a la disposición lateral de grupos hidroxilo. La diana de estos compuestos es el ergosterol de la membrana fúngica. La interacción de los polienos con la membrana produce poros consistentes en un anillo formado por moléculas de antifúngico unidas hidrofólicamente a los esteroides de membrana. La

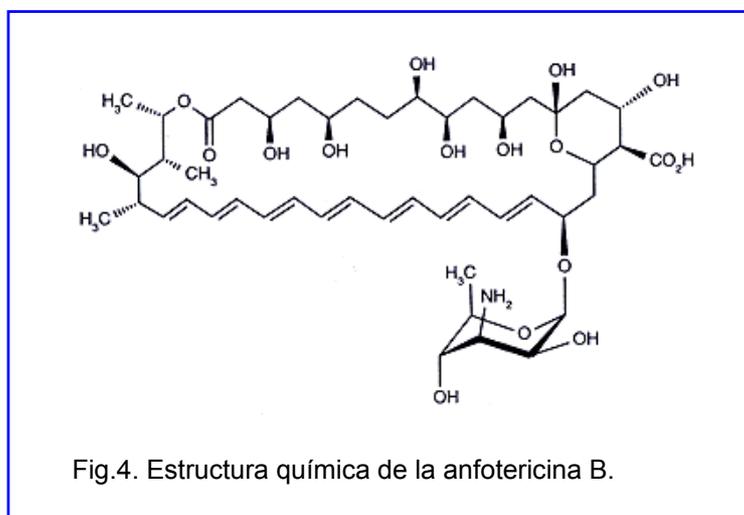
formación de estos poros conlleva una alteración en la permeabilidad de las células fúngicas con pérdida de componentes citoplasmáticos, situación que compromete la viabilidad del microorganismo. Uno de los principales problemas derivados del uso de éste grupo de fármacos, radica en su elevada toxicidad renal y hepática (Girmenia *et al.*, 2002). Actualmente la investigación sobre este tipo de compuestos se centra en el desarrollo de nuevas formulaciones para reducir los efectos tóxicos, como la encapsulación en liposomas o en partículas lipídicas (Juliano *et al.*, 1987; Hsieh *et al.*, 1998; Echevarria *et al.*, 2000). Los compuestos más representativos de esta familia son la nistatina y la anfotericina B

La **nistatina** (Fig.3), fue descubierta por Hazen y Brown en 1951 y obtenida a partir de *Streptomyces noursei* y fue el primer antifúngico poliénico comercializado. Ha demostrado actividad *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma* y *Coccidioides* aunque actualmente su uso se limita al tratamiento tópico de las candidiasis mucocutáneas debido a su elevada toxicidad en la administración sistémica (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999).



La forma liposómica de la nistatina (NyoTRAN<sup>®</sup>) posee una actividad antifúngica *in vitro* comparable a la de la nistatina tradicional, sin embargo su toxicidad es mucho menor (Arikan *et al.*, 2001, Larson *et al.*, 2001) y su administración alcanza niveles plasmáticos superiores a los de la formulación tradicional (Ramaswamy *et al.*, 1999) con lo que se consigue un valor terapéutico superior.

La **anfotericina B** (Fig. 4) se obtiene a partir de *Streptomyces nodosus* y fue comercializada para su uso clínico en el año 1958. A pesar de ser el compuesto de referencia para el tratamiento de las micosis sistémicas, su nefrotoxicidad limita su dosificación y administración (Hsieh *et al.*, 1998). La tasa de resistencia a este compuesto es baja en el caso de las levaduras, sin embargo el éxito terapéutico frente a hongos filamentosos es variable ya que las CMI de anfotericina son elevadas en el caso de algunas especies y/o cepas de hongos filamentosos como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y *Aspergillus* spp. (Walsh *et al.*, 1992; Arikan *et al.*, 1999; Sutton *et al.*, 1999; Kontoyiannis *et al.*, 2002; Serrano *et al.* 2003).



Para paliar la problemática asociada a su toxicidad, se han desarrollado tres formulaciones lipídicas: Abelcet<sup>®</sup> (anfotericina B en complejo lipídico), Amphocil<sup>®</sup> o Amphotec<sup>®</sup> (anfotericina B de dispersión coloidal) y AmBisome<sup>®</sup> (Anfotericina B liposómica). Estas formas lipídicas pueden administrarse a concentraciones mucho más elevadas que la formulación tradicional, hasta 5 mg/kg/día en el caso de AmBisome<sup>®</sup>, frente al 1 - 1.5 mg/kg/día de la anfotericina B clásica (Stevens *et al.*, 2000). Ello, unido a la baja toxicidad, representa una importante ventaja terapéutica (Walsh *et al.*, 2001).

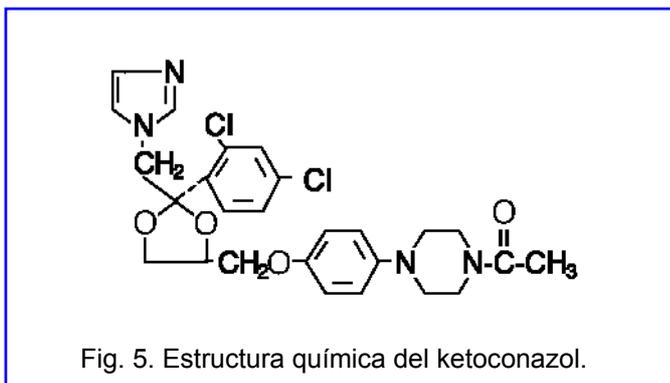
### **1.3.2. Compuestos azólicos**

Los azoles constituyen una de las familias de antifúngicos más numerosas, sin que en muchos casos se hayan demostrado grandes diferencias entre ellos. Su estructura química se basa en anillos heteropentacíclicos con dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno unidos por átomos de hidrógeno a otros anillos aromáticos. Estos compuestos actúan como fungistáticos sobre la célula fúngica impidiendo la síntesis de ergosterol al inhibir la enzima lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P-450 y, por lo tanto, produciéndose la acumulación de precursores del ergosterol que alteran la estructura y función de la membrana plasmática. Sus efectos sobre el

sistema endocrino y reproductor reduciendo la síntesis de colesterol, así como su toxicidad hepática y renal, son importantes inconvenientes a tener en cuenta antes de su uso terapéutico. La adquisición de resistencia y las bajas concentraciones plasmáticas alcanzadas en los pacientes sometidos al tratamiento con azoles, suponen una limitación añadida.

### 1.3.2.1. Imidazoles

En 1971 fue comercializado el primer compuesto de este grupo de azoles (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999), se trataba del miconazol. Más tarde fueron comercializados el clotrimazol, miconazol, econazol, ketoconazol (Fig. 5) y sertaconazol. Este grupo de azoles se utilizan de forma tópica para el tratamiento de micosis superficiales y cutáneas



### 1.3.2.2. Triazoles

En la década de los 80 fueron desarrollados los primeros triazoles. Éstos representan un grupo de antifúngicos que integra a numerosos compuestos. Aunque de mayor actividad y selectividad que los

imidazoles, dan lugar, de forma similar a los imidazoles, a la aparición de toxicidad hepática y renal y presentan efectos secundarios sobre el aparato reproductor y endocrino. Algunos de los compuestos comercializados más utilizados en el tratamiento de las infecciones fúngicas son:

- **Fluconazol** (Pfizer Inc.). Principalmente activo frente a *Cryptococcus neoformans* y *Candida* spp. sin embargo las cepas de dichas especie procedentes de enfermos de SIDA suelen presentar resistencia (Collin *et al.*, 1999). Fluconazol también se utiliza como antifúngico secundario en infecciones causadas por *Coccidioides immitis* (Galgiani, 1993), *Histoplasma capsulatum* (Wheat *et al.*, 1997) y *Blastomyces dermatitidis* (Pappas *et al.*, 1997). Sin embargo, en general, dicho compuesto no es activo frente a hongos filamentosos (Bodey, 1992; Denning *et al.*, 1992).

- **Itraconazol** (Fig.7) (Janssen Pharmaceutica). Es activo frente a hongos dimórficos (*Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*), levaduras (*Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*), dermatofitos y determinados hongos filamentosos tales como *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium marneffe* (Shehan *et al.*, 1999)

- **Voriconazol** (Fig. 6) (Pfizer Inc.) Aprobado en E.E.U.U. para el uso terapéutico en junio de 2002 (FDA approvals, 2003), está indicado para el

tratamiento de infecciones sistémicas por *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp. (Arikan *et al.*, 1999) y *Scedosporium apiospermum* (McGinnis *et al.*, 1998), aunque también ha demostrado actividad *in vitro* contra levaduras y hongos dimórficos. Su actividad es, en cambio, escasa frente a las zigomicosis (Sheehan *et al.*, 1999).

• **Posaconazol** (Schering-Plough), **ravuconazol** (Briston-Myers Squibb), y **albaconazol** (Fig. 8) (Uriach S.A.) son algunos de los triazoles que actualmente se encuentran en fase de desarrollo.

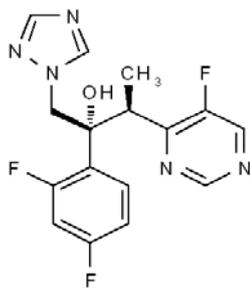


Fig. 6. Estructura química del voriconazol

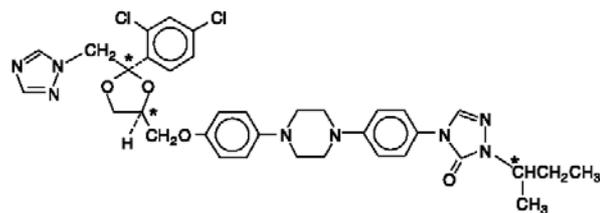


Fig. 7. Estructura química del itraconazol

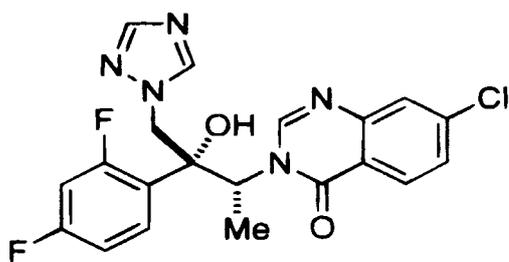


Fig. 8. Estructura química del albaconazol (UR-9825)

### 1.3.3. Análogos de precursores de ácidos nucleicos.

Son sustancias de estructura similar a la citosina o al 5-fluorouracilo. El compuesto más representativo de este reducido grupo de antifúngicos es la **5-fluorocitosina** (Roche Laboratoires). Este compuesto es una pirimidina fluorada (Fig. 9) desarrollada como resultado de un programa de investigación de compuestos citostáticos.

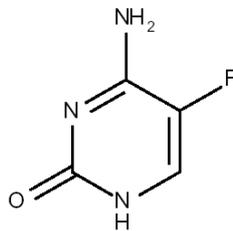


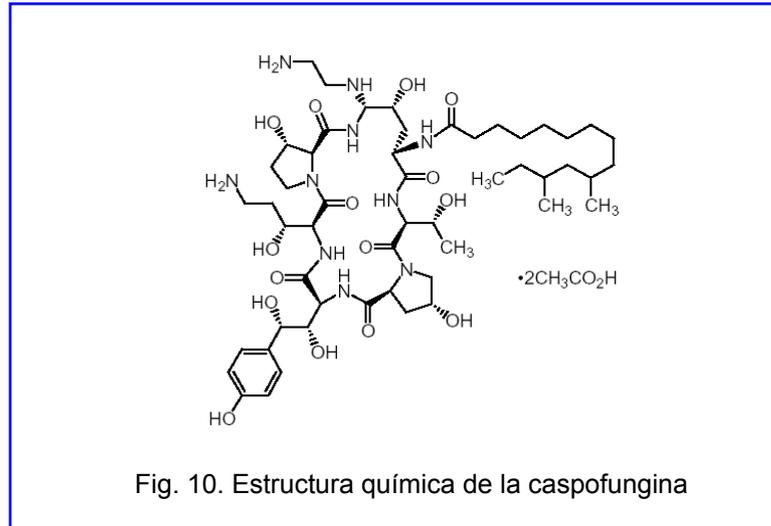
Fig. 9. Estructura química de la 5-fluorocitosina

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

#### 1.3.4. Derivados peptídicos

Estos compuestos poseen una buena toxicidad selectiva ya que actúan inhibiendo la síntesis de los mananos, la quitina o el  $\beta(1-3)$ -D-glucano, los cuales no se hallan presentes en las células eucariotas humanas. Existe una gran variedad de antifúngicos peptídicos con diferentes estructuras. La **nikomicina Z** o las polioxinas son péptidos nucleósidos que actúan inhibiendo competitivamente la enzima quitina sintetasa. El grupo de derivados peptídicos de mayor actividad antifúngica es el de las equinocandinas. Las equinocandinas constituyen una familia de lipopéptidos que actúan como inhibidores no competidores de la  $\beta$ -D-glucan sintetasa impidiendo la síntesis de  $\beta(1-3)$ -D-glucano, un componente integral de la pared fúngica. Sin embargo su espectro de acción se reduce a *Candida* spp y *Aspergillus* spp. La equinocandina B, obtenida de *Aspergillus nidulans* y sus análogos semisintéticos, como son la caspofungina y la micafungina (FK-463), son algunos representantes del grupo.

La **Caspofungina** (Fig. 10) (Merck Research Laboratoires) se halla disponible desde septiembre del 2002 en E.E.U.U. para el tratamiento de candidiasis orofaríngeas (Villanueva *et al.*, 2001; Arathoon *et al.*, 2002; FDA aprovals, 2003), aunque ha demostrado también efectividad en las candidiasis y aspergilosis sistémicas (Maertens *et al.*, 2000; Mora-Duarte *et al.*, 2002). Sin embargo, su eficacia frente a otros hongos filamentosos ha sido baja (Del Poeta *et al.*, 1997).



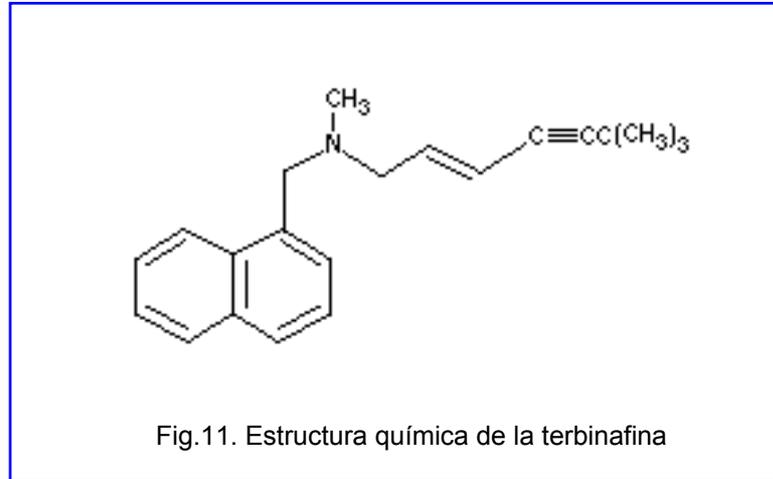
La **micafungina** (Fujisawa Healthcare Inc.) presenta un espectro de acción similar al de la caspofungina (Nakai *et al.*, 1999) y en la actualidad se encuentra en fase de desarrollo.

Existen péptidos con actividad antifúngica obtenidos a partir de mamíferos (defensinas, protegrinas y gallicinas), insectos (cecropina y drosomicina), anfibios (magainina y dermaseptina) o plantas (zeamatina y defensinas vegetales) que han demostrado cierta actividad antifúngica *in vitro* (Lucca y Walsh, 1999).

### 1.3.5. Alilaminas

La acción antifúngica de estas sustancias se debe al bloqueo de la ruta biosintética del ergosterol por inhibición de la esqualeno epoxidasa, una enzima no dependiente del citocromo P-450. Su efecto fungicida es debido en parte a la reducción del contenido en ergosterol de la membrana celular y a la acumulación de escualeno en el espacio

plasmático. El representante más importante de esta familia es la **terbinafina** (Fig. 11) (Novartis Pharmaceuticals).



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

### 1.3.6. Nuevas estrategias en el tratamiento de las micosis sistémicas

La baja incidencia de infecciones fúngicas en personas inmunocompetentes constituye una clara evidencia de que el sistema inmunitario es un mecanismo efectivo contra las infecciones causadas por hongos. Por ello numerosos autores coinciden en la necesidad de revertir el déficit inmunitario de los pacientes inmunodeprimidos con infecciones por hongos oportunistas mediante la aplicación de terapias de inmunomodulación. Entre ellas podemos distinguir (Casadevall y Pirofski, 2001b):

- **Inmunoterapia de sustitución.** Basada en la transfusión de leucocitos a partir de donadores previamente tratados con factor estimulador de colonias de granulocitos. Esta terapia ha aportado efectos beneficiosos en pacientes neutropénicos afectados de aspergilosis y candidiasis (Catalano *et al.*, 1997; Di Mario *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 1999).

- **Inmunoterapia inespecífica aumentativa.** Intenta reactivar la respuesta inmunitaria contra una variedad más o menos amplia de patógenos. Esta terapia incluye la administración de factores estimuladores de colonias de granulocitos (G-CSF), macrófagos (M-CFS), granulocitos y macrófagos (GM-CSF) interferón gamma (IFN $\gamma$ ) o interleuquinas (IL) tales como la IL-12. La administración de factores estimuladores de colonias promueve la proliferación y diferenciación de leucocitos.

- **Inmunoterapia específica.** Consiste en la administración de anticuerpos específicos contra un patógeno concreto o antígenos capaces de desarrollar inmunidad. Incluye la administración de vacunas, inmunoglobulinas y anticuerpos monoclonales. El uso de vacunas en la prevención de infecciones se ha aplicado con gran éxito en el caso de virus y bacterias. Actualmente la experimentación en este campo se centra fundamentalmente en determinar si un extracto fúngico protege a

los animales de experimentación de una infección a dosis letal. La siguiente fase consiste en identificar el o los antígenos específicos responsables del efecto protector. En la actualidad se están estudiando diversos antígenos como el HIS-62 de *Histoplasma capsulatum* (Gomez *et al.*, 1995), gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pinto *et al.*, 2000) o el WI-1 de *Blastomyces dermatitidis* (Wüthrich *et al.*, 2000) para el desarrollo de vacunas. Los ensayos realizados en animales de experimentación inmunizados con los antígenos previamente mencionados, han revelado un incremento en la supervivencia de éstos y una reducción de UFC/g en tejidos, resultados que animan a continuar esta línea de investigación. Cabe destacar el uso experimental de vacunas contra *Pythium insidiosum*, *Penicillium marneffeii*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* con resultados exitosos (Thitithanyanont *et al.* 1998; Wong *et al.* 2002).

## 1.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* A LOS ANTIFÚNGICOS

### 1.4.1. Estandarización de la metodología

Los resultados de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos pueden constituir una excelente referencia para el tratamiento de determinados procesos infecciosos. En el caso de los hongos filamentosos las dificultades son mayores ya que son varias las circunstancias que hacen que resulte difícil la evaluación de las pruebas *in vitro*. En primer lugar el crecimiento lento de dichos microorganismos condiciona periodos de incubación más largos con lo que las propiedades de los antifúngicos pueden alterarse perdiendo así parte de su actividad. En segundo lugar y debido a la baja incidencia de las infecciones fúngicas, la definición de los puntos de corte son difíciles de establecer.

En el año 1982, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de E.E.U.U., creó un subcomité para la estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. El objetivo principal fue el de tratar de unificar los criterios metodológicos, primero con las levaduras y más tarde con los hongos filamentosos. Tras varias publicaciones preliminares, en 2002 el NCCLS publicó el documento M27-A2 (NCCLS, 2002) para el ensayo de antifúngicos con levaduras y el M38-A (NCCLS, 2002) para los hongos filamentosos. Ambos documentos proponen un método de microdilución en medio líquido y establecen las variables experimentales críticas para los

ensayos *in vitro*. Describen la preparación del inóculo, el medio de cultivo, las temperaturas y tiempos de incubación más adecuados así como los criterios de lectura. Desde su aparición, los protocolos establecidos por el NCCLS, han sido aceptados universalmente como el método de referencia para el ensayo de la actividad *in vitro* de los compuestos antifúngicos. Sin embargo algunos estudios han puesto de manifiesto su falta de reproducibilidad (Carrillo-Muñoz y Torres-Rodríguez, 1993; Rex *et al.*, 1993; 2001; Llop *et al.*, 2000a, 2000b). El documento M38-A, a nuestro juicio, presenta limitaciones importantes. Así por ejemplo, tan sólo se centra en los ensayos *in vitro* de la anfotericina B, la 5-fluorocitosina y algunos azoles; sin hacer mención a los nuevos compuestos que actualmente se encuentran en una importante fase de desarrollo como son las sordarinas y las equinocandinas. Por otra parte establece las distintas variables a tener en cuenta para realizar los ensayos con *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix schenkii*, sin hacer mención a otras especies también importantes desde el punto de vista clínico como son los dermatofitos, los hongos dimórficos, y otras especies de hongos miceliares oportunistas de importancia clínica. Hasta la fecha no existe consenso acerca de cuales deben ser los puntos de corte para considerar a una cepa sensible o resistente a los diferentes compuestos antifúngicos. Existen muy pocos estudios que correlacionen los resultados obtenidos *in vitro* con la respuesta terapéutica *in vivo*. Se

acepta, sin embargo, que el hecho de que una cepa sea sensible *in vitro* no es suficiente para predecir el éxito terapéutico, pero un valor elevado de CMI de un determinado antifúngico puede predecir con mayor exactitud un posible un fallo terapéutico (Rex *et al.*, 1993).

#### **1.4.2. Métodos comercializados**

La laboriosidad y complejidad de la metodología propuesta por el NCCLS es poco compatible con su uso cotidiano en los centros hospitalarios. Se trata de un método poco práctico, laborioso y la interpretación de los resultados debe ser realizada por personal experimentado. Para intentar soslayar estos inconvenientes, se han comercializado diferentes métodos de una más sencilla y rápida ejecución e interpretación. Sin embargo los resultados obtenidos no siempre guardan una buena correlación con los obtenidos mediante el micrométodo siguiendo las directrices del NCCLS (Ramani y Chaturvedi, 2003).

##### **1.4.2.1. Etest<sup>®</sup>**

Este sistema desarrollado por AB BIODISK de Suecia, consiste en la utilización de unas tiras de plástico impregnadas con una concentración decreciente del antifúngico (Fig. 12). La tira se sitúa sobre el medio de cultivo sólido (RPMI) previamente inoculado con el hongo y se incuba. El antifúngico difunde en el medio de cultivo manteniendo en

éste la gradación de concentración presente en la tira. Tras el crecimiento fúngico, la CMI se interpreta como la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento del hongo en los márgenes de la tira. La aparente facilidad del método E-test<sup>®</sup> contrasta con la dificultad en la lectura e interpretación de los resultados obtenidos con algunas especies de hongos filamentosos. Estudios comparativos entre Etest<sup>®</sup> y el procedimiento estándar, han puesto de manifiesto la buena correlación entre ambos métodos en el caso de las levaduras (Espinell-Ingroff 1994; Colombo *et al.*, 1995a; 1995b; Chen *et al.*, 1996; Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001).

En el caso de los hongos filamentosos la correlación entre ambos sistemas es variable. Szekely y colaboradores, obtuvieron un excelente nivel de correlación (cercano al 100%) con algunas especies de *Aspergillus*, *Absidia* y *Scopulariopsis* ensayando anfotericina B e itraconazol. Sin embargo en el caso de otros hongos filamentosos tales como *Scedosporium*, el nivel de concordancia entre ambos métodos fue especialmente bajo en los ensayos con anfotericina B (20% de concordancia) (Szekely *et al.*, 1999).

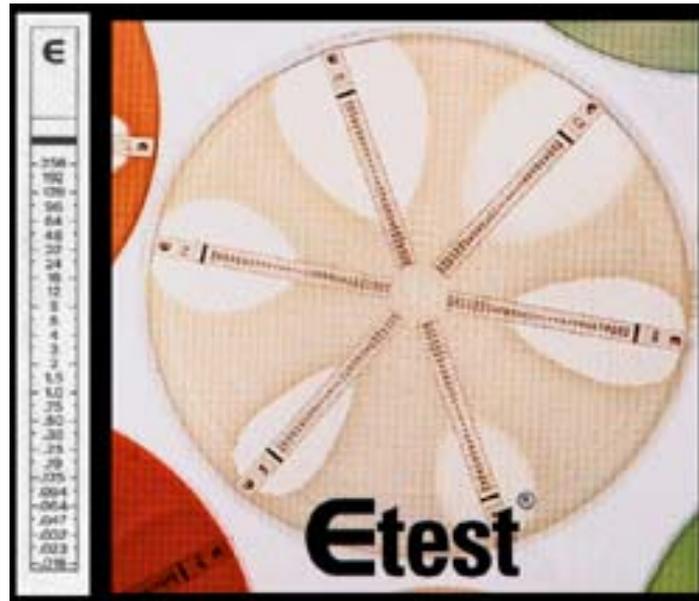


Fig.12. Técnica de Etest para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos

Se ha comprobado también que los valores de CMI obtenidos con Etest<sup>®</sup> varían según el tiempo de incubación y dependen de la cepa ensayada (Espinel-Ingroff 2001; Espinel-Ingroff y Rezusta, 2002; Fernández-Torres *et al.*, 2002). Otro inconveniente del método reside en el hecho de que algunos antifúngicos difunden mal en agar (Proctor y McKenzie, 1980; Saag y Dismukes, 1988) con lo que es necesario realizar estudios específicos con dichos compuestos para establecer condiciones más fiables y reproducibles.

#### 1.4.2.2. Sensititre Yeast One<sup>®</sup>

El sistema comercial desarrollado por Trek Diagnostic Systems Inc., se basa en la técnica de microdilución recomendada por el NCCLS. La diferencia entre ambos se basa en la incorporación en las microplacas de Sensititre Yeast One<sup>®</sup> de un indicador, el Alamar Blue<sup>®</sup>. Cuando se

produce el crecimiento del hongo, su actividad metabólica oxida el indicador y éste cambia de color (de azul a rosa). La lectura de las microplacas se realiza teniendo en cuenta el viraje del indicador, así se considera la CMI como la menor dilución de antifúngico, en la que no se observa cambio de color (Fig. 13).

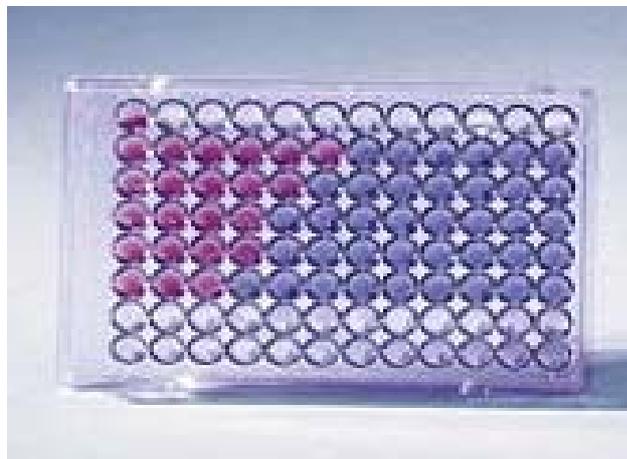


Fig. 13. Ejemplo de un panel de Sensititre Yeast One<sup>®</sup> donde se observa el viraje de color en los pocillos donde se ha producido la oxidación-reducción del indicador (pocillos rosa). Los pocillos azules indican que no se ha producido crecimiento.

Si bien este sistema ha demostrado una alta reproducibilidad y equivalencia en los resultados obtenidos según las recomendaciones del NCCLS, algunos autores han detectado una baja correlación entre Sensititre Yeast One<sup>®</sup> y el NCCLS en el caso de algunos hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* (Jahn *et al.*, 1996).

#### 1.4.2.3. ASTY colorimetric panel<sup>®</sup>

El ASTY colorimetric panel<sup>®</sup> es un método comercializado similar a Sensititre Yeast One<sup>®</sup> basado también en el micrométodo propuesto por el NCCLS e incorpora un indicador colorimétrico de pH. Ésta técnica permite determinar las CMI de anfotericina B, fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. Los estudios comparativos entre ASTY<sup>®</sup> y NCCLS en el ensayo de *Candida* spp. han mostrado un gran nivel de concordancia, superior al 95%. Sin embargo el tiempo de incubación es una importante variable que debe ser estandarizada a fin de obtener resultados fiables ya que se han observado cambios sustanciales en las CMI que dependían del tiempo de incubación (Pfaller *et al.*, 1998).

#### 1.4.2.4. Fungitest<sup>®</sup>

Fungitest<sup>®</sup> es otro de los sistemas colorimétricos comercializados. Al igual que los sistemas descritos anteriormente, presenta niveles de concordancia variables con el NCCLS en las especies ensayadas. Se ha observado buena correlación entre ambos métodos en el caso de la anfotericina B y la 5-fluorocitosina ensayando *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans* (Davey *et al.*, 1998; Willinger *et al.*, 2002). Sin embargo en los ensayos realizados con azoles Fungitest<sup>®</sup> posee muy escasa capacidad para detectar cepas de *Candida* resistentes (Witthuhn *et al.*, 1999)

Los sistemas comercializados aquí expuestos representan métodos sencillos para realizar los ensayos de sensibilidad *in vitro* con levaduras (Giammanco *et al.*, 2001; Morace *et al.*, 2002). En el caso de los hongos filamentosos es menor que y existen pocos trabajos al respecto con lo que es difícil sacar conclusiones generales su fiabilidad en el ensayo de estos microorganismos.

## 1.5. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD *IN VIVO* A LOS ANTIFÚNGICOS

En las primeras fases del desarrollo de un nuevo antifúngico (fase pre-clínica), los estudios *in vitro* son útiles para determinar su eficacia en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. Estos estudios determinarán el potencial valor terapéutico del antifúngico. Posteriormente los ensayos en cultivos celulares permitirán evaluar su potencial carcinogénesis así como otros efectos tóxicos. Antes de llevar a cabo los estudios clínicos es imprescindible realizar estudios pre-clínicos para determinar el potencial terapéutico del antifúngico en modelos animales. Los primeros estudios en animales de experimentación están orientados a elucidar la farmacocinética y farmacodinámica del nuevo compuesto. Estos estudios incluyen la elección de la ruta de administración más adecuada, su distribución en los tejidos, su metabolización y excreción y la interacción con otros fármacos (Graybill, 2000). Para demostrar su eficacia terapéutica, es necesario desarrollar previamente un modelo animal que emule el proceso de la enfermedad infecciosa observada en clínica humana. La eficacia de la terapia se puede evaluar mediante la prolongación de la supervivencia de los animales infectados y/o la reducción de la carga fúngica detectable en los órganos, así como la determinación de la patología tisular (Graybill 1986). La eficacia de un fármaco es altamente dependiente de las condiciones de experimentación, la absorción, distribución y

metabolización del fármaco, el tamaño del inóculo, la ruta de infección, el estado inmunitario del huésped y la duración del tratamiento (Graybill, 2000). El animal de experimentación será seleccionado de acuerdo a la farmacocinética, toxicidad y otras características del antifúngico en estudio. El animal más utilizado en el ensayo de nuevos compuestos antifúngicos es el ratón debido a la enorme experiencia acumulada, la facilidad en su manejo, adquisición y mantenimiento y a la similitud, en muchos casos, de la progresión de la infección con las observaciones realizadas en humanos (Graybill, 2000). En las ocasiones en las que el ratón no cumple estos requisitos o bien, cuando es necesario contrastar los resultados con los obtenidos en otros animales de experimentación, la rata, conejo o cobaya son los animales de elección. Sólo cuando se han obtenido resultados satisfactorios en los estudios pre-clínicos se inician los estudios clínicos. Aproximadamente sólo un 0.1% de los compuestos evaluados en los estudios pre-clínicos llegan a ser ensayados en clínica. En los ensayos experimentales clínicos se valora la dosis de administración en voluntarios sanos (Fase I), la efectividad y la afinidad por los tejidos diana en pacientes voluntarios (Fase II) así como la efectividad y los efectos en administraciones prolongadas (Fase III). En el año 2001 tan sólo un 0.05 % de los medicamentos experimentales fueron aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) de E.E.U.U para su uso clínico. El coste que representa

para la industria farmacéutica la aprobación de un fármaco alcanza los 30 mil millones de dólares (Spilker, 2000).

## **OBJETIVOS**

Las infecciones oportunistas constituyen un grave problema de la medicina actual que afecta principalmente a los enfermos inmunodeprimidos. Los hongos filamentosos oportunistas más frecuentes en nuestro medio son probablemente *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium spp.*, *Scedosporium prolificans*, *Scedosporium apiospermum* y *Paecilomyces spp.* Dichos hongos suelen ser resistentes a la mayoría de antifúngicos disponibles y causan una elevada tasa de mortalidad. Es por ello que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones constituye una necesidad de primer orden para el control de las mismas.

El objetivo principal de esta tesis ha sido evaluar la actividad de nuevos antifúngicos tales como albaconazol (Uriach), voriconazol (Pfizer), ravuconazol (Bristol-Myers Squibb), micafungina (Fujisawa) y nikomicina Z (Shaman Pharmaceutical) frente a los hongos oportunistas de mayor relevancia clínica. La utilización de los modelos animales adecuados para determinar la efectividad estas moléculas está en función de su farmacocinética. Para ello hemos tenido que desarrollar un modelo animal adecuado para cada fármaco. También nos hemos propuesto ensayar combinaciones de antifúngicos cuando la monoterapia no ha mostrado eficacia. Los objetivos concretos han sido:

- Considerando que nuestro grupo ha puesto a punto y ha demostrado la utilidad del método de microdilución en medio líquido para la

determinación de la sensibilidad a los antifúngicos de los hongos filamentosos, **evaluar** la utilidad del método colorimétrico Sensitre Yeast One®, comparando los resultados con los obtenidos siguiendo las recomendaciones del NCCLS. Este método colorimétrico es de interpretación menos subjetiva y de más sencilla realización.

- **Determinar** la actividad *in vitro* del albaconazol frente a hongos filamentosos oportunistas de interés clínico.

- **Desarrollar** un modelo de infección diseminada por *S. prolificans* en conejos y **evaluar** la eficacia del albaconazol en el tratamiento experimental de dicha infección.

- **Determinar** la eficacia *in vivo* de voriconazol en el tratamiento de la infección sistémica por *S. apiospermum* en ratón y cobaya.

- **Determinar** la eficacia de la anfotericina B, la anfotericina B liposómica y el ravuconazol en una infección sistémica experimental por *S. apiospermum* en ratón.

- **Determinar** la eficacia *in vivo* de la micafungina, sola o en combinación con itraconazol, anfotericina B o nikomicina Z, en el tratamiento de aspergilosis sistémica en ratones.

- **Desarrollar** un modelo de aspergilosis cerebral en ratones y **determinar** la eficacia del itraconazol y la anfotericina B para su tratamiento.
- **Desarrollar** un modelo de infección sistémica por *Paecilomyces lilacinus* en ratones y **determinar** la eficacia del tratamiento con ravuconazol y terbinafina solos o en combinación.
- **Desarrollar** un modelo de fusariosis en cobayas para el posterior de ensayo sobre la actividad de nuevos antifúngicos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. ESTUDIOS *IN VITRO*

#### 3.1.1. Cepas

Para efectuar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, se seleccionaron diferentes especies de hongos filamentosos oportunistas de interés clínico. Se estudiaron un total de 119 cepas que incluyeron 7 especies de hongos hialinos: *Fusarium solani* (10 cepas), *Paecilomyces variotii* (10 cepas), *Paecilomyces lilacinus* (10 cepas), *Aspergillus fumigatus* (10 cepas), *Aspergillus flavus* (11 cepas) y *Aspergillus niger* (11 cepas). Tres especies de hongos dematiáceos: *Chaetomium globosum* (10 cepas), *Scytalidium lignicola* (2 cepas) y *Scytalidium dimidiatum* (3 cepas). Se realizaron estudios con 6 especies de hongos dermatofitos: *Microsporum canis* (5 cepas), *Microsporum gypseum* (10 cepas), *Epidermophyton floccosum* (7 cepas), *Trichophyton tonsurans* (7 cepas), *Trichophyton rubrum* (5 cepas) y *Trichophyton mentagrophytes* (8 cepas).

#### 3.1.2. Conservación de las cepas

Las cepas se conservaron en bloques de agar patata y dextrosa (APD) en viales de vidrio con agua destilada estéril a temperatura ambiente. Otro sistema utilizado fue cubrir los cultivos fúngicos desarrollados en tubos de plástico de 10 ml de APD inclinado, con parafina y guardados a temperatura ambiente. Por último, algunas de las cepas se conservaron







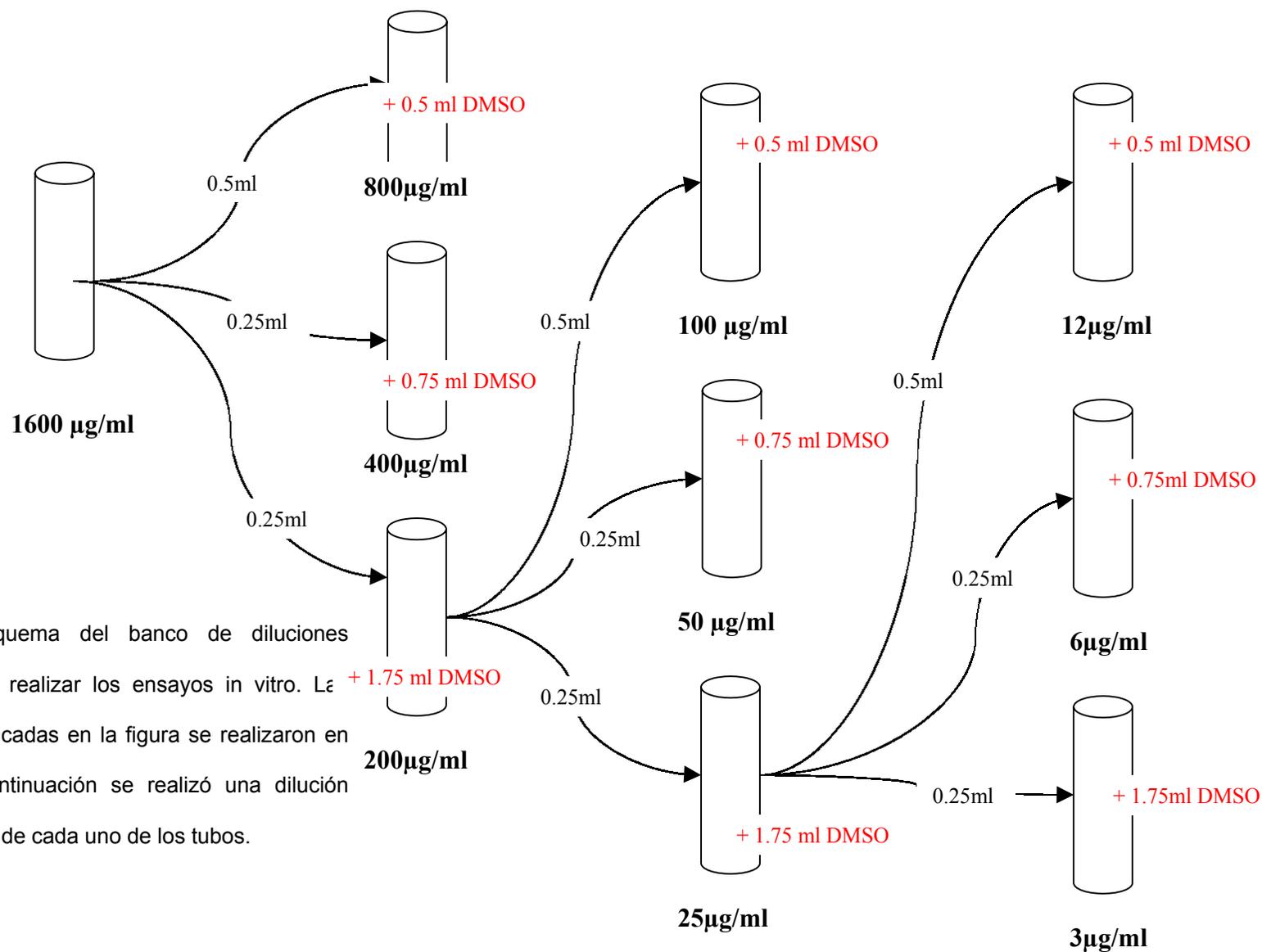


Fig. 14. Esquema del banco de diluciones utilizado para realizar los ensayos in vitro. Las diluciones indicadas en la figura se realizaron en DMSO. A continuación se realizó una dilución 1/50 en RPMI de cada uno de los tubos.



#### **3.1.4.2. Preparación de los inóculos**

Las cepas estudiadas fueron subcultivadas en placas de APD. Una vez observado un crecimiento de los cultivos considerado suficiente, las placas fueron cubiertas con 3 – 5 ml de solución fisiológica. La superficie de las colonias fue arrastrada suavemente con un asa de cultivo a fin de obtener una suspensión mezcla de conidios, fragmentos de hifas y restos de agar. Dicha suspensión fue filtrada a través de gasa estéril para obtener una suspensión exclusivamente constituida por conidios. Luego se ajustaron a la concentración de  $4 \times 10^5$  –  $5 \times 10^6$  conidios/ml mediante recuento en cámara de Neubauer, realizando a continuación diluciones 1/50 en RPMI.

#### **3.1.4.3. Dispensación en microplacas**

En la figura 15 se representa un esquema de la distribución de los antifúngicos en la microplaca. Las diluciones seriadas de antifúngico se dispensaron en cada uno de los pocillos de cada fila con la ayuda de una micropipeta multicanal, de este modo en cada fila se obtenía una serie decreciente de concentraciones de cada antifúngico. La primera columna (A) contenía la concentración más alta y la columna J la más baja. Las dos últimas columnas (K y L) se utilizaron como control del medio de cultivo (C-) y como control de crecimiento de las cepas (C+), respectivamente. Esta distribución del antifúngico en la microplaca permitía realizar las pruebas de sensibilidad-resistencia de 8 cepas (una

por cada fila). La última fila (9) se reservó para la cepa control *Paecilomyces variotii* ATCC 36257.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
2	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
3	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
4	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
5	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
6	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
7	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
8	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
9	16*	8*	4*	2*	1*	0.5*	0.25*	0.125*	0.06*	0.03*	C-*	C+*

Fig. 15. Esquema correspondiente a la distribución de las concentraciones de antifúngico en la microplaca. Las concentraciones están expresadas en  $\mu\text{l/ml}$ .

\*, Cepa control  
 C-, Control del medio de cultivo (ausencia de antifúngico e inóculo)  
 C+, Control de crecimiento de la cepa (ausencia de antifúngico)

Las placas se congelaron a  $-30^{\circ}\text{C}$  para su conservación por un tiempo máximo de 2 meses. En el momento de utilizarlas, se descongelaban a temperatura ambiente y se dispensan  $100\mu\text{l}$  de la

suspensión de esporas en cada pocillo, obteniéndose una concentración final de esporas en cada microplaca de  $4 \times 10^3 - 5 \times 10^4$  UFC/ml.

#### **3.1.4.4. Lectura e interpretación de los resultados.**

Una vez dispensado el inóculo en la microplaca, ésta se incubaba a la temperatura óptima dependiendo de las especies ensayadas. La lectura de la microplaca se realizaba una vez observado crecimiento en la columna correspondiente al control de crecimiento C+ (columna L). Para la lectura se utilizaba un espejo invertido y se evaluaba el crecimiento fúngico en cada uno de los pocillos con una escala de 0 a 4. Se asignaba un valor de 4 a aquellos pocillos cuyo crecimiento era igual al del pocillo control (C+), es decir, 0% de inhibición, 3 para 25% de inhibición, 2 para el 50%, 1 para escaso crecimiento y 0 en el caso de no observarse crecimiento del hongo. Se consideraba la CMI como la menor concentración de antifúngico capaz de inhibir un 50% del crecimiento en el caso de los azoles, y un 100% para la AMB.

### 3.2. ESTUDIOS *IN VIVO*

#### 3.2.1. Cepas

Las especies utilizadas para los estudios *in vivo* fueron *Scedosporium prolificans*, *S. apiospermum*, *Paecilomyces variotii*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Aspergillus fumigatus*.

#### 3.2.2. Animales

Para el desarrollo de modelos animales de infección causada por hongos miceliares oportunistas y su posterior tratamiento, se utilizaron ratones, conejos y cobayos.

- Ratones machos “outbred” CD-1 y OF-1 (Charles River , Wilmington, E.E.U.U. y Barcelona, España)
- Ratones “inbred” BALB/c, C57BL/6, DBA/2 (Charles River, Wilmington, E.E.U.U.)
- Conejos machos New Zealand (San Bernardo, Navarra, España)
- Cobayas machos Hartley (Charles River, Barcelona, España)

#### 3.2.3. Inmunosupresión

Se utilizaron dos pautas diferentes de inmunosupresión:

- **Combinación de ciclofosfamida con 5-fluorouracilo.** La ciclofosfamida se administró en una dosis de 200 mg/Kg intraperitonealmente y el 5-fluorouracilo en dosis de 150 mg/Kg intravenosamente. Ambos fueron administrados el mismo día de la

infección (día 0). Esta pauta de inmunodepresión sólo se empleó en estudios realizados con ratones.

• **Ciclofosfamida.** También se utilizaron dosis repetidas de ciclofosfamida (200 mg/Kg i.p.) en algunos estudios realizados con ratones, comenzando tres días antes de la infección (día -3) y repitiendo la administración cada 5 días. En los estudios que realizamos con cobayas, la dosis de ciclofosfamida fue de 100 mg/kg, comenzando el día -3 y continuando la administración cada 2 días.

#### **3.2.4. Infección de los animales**

La metodología para producir la infección en los animales se estableció en función del modelo experimental empleado. Para ello utilizamos diferentes vías de inoculación. Para el establecimiento de la scedosporiosis y aspergilosis sistémicas en ratón, los inóculos se administraron intravenosamente a través de la vena lateral de la cola. En el caso de la scedosporiosis sistémica en conejos, empleamos la vena lateral de la oreja como vía de infección y la vena lateral del pene en las cobayas. Utilizamos una vía diferente de la intravenosa para establecer el modelo de aspergilosis cerebral. En este caso los animales, una vez anestesiados, se inocularon mediante punción intracraneal a través de la fontanela.

### 3.2.5. Antifúngicos

Se ha evaluado la eficacia de los siguientes agentes antifúngicos frente a infecciones inducidas en modelos animales:

- Albaconazol (ABC). Suministrado por Uriach, Barcelona, España
- Anfotericina B (AMB). Como Fungizona<sup>®</sup>, Obtenido de Squibb Industria Farmacéutica, Madrid, España y Pharma Tek, Inc., Huntington, NY, E.E.U.U.
- Anfotericina B liposómica (AMBL). Como AmBisome<sup>®</sup> Sumistrado por Gilead Sciences S. A., Madrid, España.
- Itraconazol (ICZ). Suministrado por Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica.
- Micafungina (MCF). Suministrado por Fujisawa GmbH, München, Alemania.
- Nikomicina Z (NKZ). Sumintrado por Shaman Pharmaceutical, South San Francisco, E.E.U.U.
- Ravuconazol (RCZ). Suministrado por Squibb Industria Farmacéutica, New Brunswick, N. J., E.E.U.U.
- Terbinafina (TBF). Suministrado por Novartis, Basel, Suiza.
- Voriconazol (VCZ). Suministrado por Pfizer, Madrid, España.

La administración de los compuestos antifúngicos y la duración de los tratamientos se realizaron teniendo en cuenta la solubilidad y farmacocinética de los mismos. Los antifúngicos fueron disueltos en

polietilenglicol 200 (PEG 200),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CDX), dimetilsulfóxido (DMSO) o carboximetil celulosa (CXC), según se detalla en la tabla 1.

Sustancia activa	Disolvente
Albaconazol	CXC+ DMSO
Anfotericina B desoxicolato	Agua destilada*
Anfotericina B liposomal	Agua destilada*
Itraconazol	$\beta$ -CDX
Micafungina	Solución salina
Nikomicina Z	10% DMSO + PEG 200 (v/v)
Ravuconazol	PEG 200
Terbinafina	PEG 200
Voriconazol	PEG 200

Tabla 1. Disolventes utilizados para la preparación de las soluciones stock de los antifúngicos suministrados a los animales.

\* La concentración final para la administración se realizó diluyendo en solución glucosada 5%.

### 3.2.6. Tratamientos

Los tratamientos se iniciaron 24 h. después de la infección (día 1) y se administraron diariamente durante 10 días. En la tabla 2 se muestran las vías de administración para cada uno de los antifúngicos utilizados en los diferentes tratamientos.

Sustancia activa	Animal	Vía de administración	Volumen administrado
Albaconazol	Conejo	Oral	5 ml
Anfotericina B desoxicolato	Ratón	Intravenosa	
		Intraperitoneal	0.2 ml
	Conejo	Intravenosa	0.2 ml
	Cobaya	Intraperitoneal	0.5 ml
Anfotericina B liposomal	Ratón	Intravenosa	0.2 ml
Itraconazol	Ratón	Oral	0.1 ml
Micafungina	Ratón	Oral	0.1 ml
Nikomicina Z	Ratón	Subcutánea	0.1 ml
Ravuconazol	Ratón	Oral	0.1 ml
Terbinafina	Ratón	Oral	0.1 ml
Voriconazol	Ratón	Oral	0.1 ml
	Cobaya	Oral	2.5 ml

Tabla 2. Relación de vías de administración de fármacos y volúmenes administrados según el modelo animal desarrollado.

### 3.2.7. Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado

Los animales que presentaban alteraciones importantes, tanto físicas como de comportamiento, o aquellos que sobrevivieron al tiempo de observación (14 días aproximadamente), fueron sacrificados según los protocolos aprobados por el Comité Ético de la Universitat Rovira i Virgili. El método de sacrificio utilizado, siempre fue el más adecuado al peso del animal y el menos traumático. En la tabla 3 se resumen los métodos utilizados para el sacrificio humanitario de los animales.

<b>Animal (peso)</b>	<b>Método de eutanasia</b>
Ratón (25-35 g)	Dislocación cervical Anoxia por inhalación de CO <sub>2</sub> Sobredosificación de halotano por inhalación
Conejo (2000-3000 g)	Sobredosificación de pentotal sódico i.v. (0.5g/animal)
Cobaya (400-600 g)	Sobredosificación de pentotal sódico i.p. (0.3g/animal)

Tabla 3. Métodos de eutanasia aplicados en función del modelo animal utilizado

Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los órganos diana utilizando material quirúrgico estéril de acuerdo con nuestra propia experiencia o en base a estudios previos realizados por otros autores. Principalmente se estudiaron riñón, bazo, hígado, pulmones, corazón y cerebro. Se pesaron los órganos o fracciones de éstos, y se introdujeron en tubos estériles de 10 ml con 1 – 2 ml de solución salina. Se homogenizaron con varillas de vidrio o mediante un homogenizador de tejidos (Tissumizer<sup>®</sup>, Tekmar, Cincinnati, E.E.U.U.). Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de los homogenizados y se sembraron en

placas de APD. Se incubaron a 30°C realizando el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 96 h de incubación. La carga fúngica en los órganos se expresaron en UFC/g según la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{UFC / ml} \times (\text{peso del órgano} + \text{ml utilizados para homogenizar})^*}{\text{Peso del órgano}}$$

(\*) Se considera que 1 g de tejido ocupa un volumen de 1 ml.

### 3.2.8. Análisis estadístico

Los análisis de supervivencia fueron evaluados mediante el test de Kaplan-Meyer utilizando el programa informático Graph Pad Prism. Versión 3.00 para Windows. La carga fúngica en los órganos fue analizada mediante el test U de Mann-Whitney.

### 3.2.9. Histopatología

Una porción de aproximadamente 1 – 2 g de los órganos extraídos fue fijada en formol 10% para su posterior estudio histopatológico, que incluyó una primera observación macroscópica de los especímenes y una posterior observación microscópica.

### **3.2.9.1. Observación macroscópica**

Se puso especial atención en el aspecto de los órganos (tamaño, color, textura) y en la presencia / ausencia de granulomas o abscesos.

### **3.2.9.2. Observación microscópica**

La observación microscópica de los tejidos permitía obtener información sobre la presencia y desarrollo fúngico en los tejidos. El procedimiento utilizado para la preparación y tinción de las muestras fue el siguiente:

#### **3.2.9.2.1. Deshidratación de las muestras**

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

#### **3.2.9.2.2. Parafinado**

Una vez eliminado el alcohol de los tejidos, se procedía a la inclusión de las muestras en una mezcla de parafina blanda y xilol (a partes iguales durante una hora), luego se introducían en xilol saturado de parafina. Para obtener un parafinado óptimo, las muestras se dejaban 8 horas en parafina blanda (a 50 – 55 °C). Luego se introducían las

piezas en parafina de punto de fusión de 56 – 58 °C durante 4 horas a 60°C hasta conseguir la total impregnación de los tejidos. El colado de los bloques de parafina se realizaba en cubetas de plástico.

#### **3.2.9.2.3. Realización de cortes histológicos**

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

#### **3.2.9.2.4. Desparafinado y rehidratación de las muestras**

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

#### **3.2.9.2.5. Tinción de las muestras**

Las técnicas de tinción fueron:

- Hematoxilina-eosina (H-E). En las muestras teñidas con dicha tinción, el citoplasma celular, las sustancias hialinas, amiloides y el colágeno presentaban color rosado. Las estructuras fúngicas, los núcleos celulares y sustancias mucoides se teñían de morado.

- Ácido periódico de Schiff (PAS). Los núcleos celulares se tiñen de color morado, mientras que los mucopolisacáridos y las estructuras fúngicas presentaban un color rojo.
- Nitrato de metenamina argéntica de Grocott (GMS). Los tejidos adoptan una coloración verde y las células fúngicas color negro.

## **RESULTADOS**

4.1. EVALUACIÓN DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE HONGOS DERMATOFITOS.

4.1.1. **Use of the Sensititre Colorimetric Microdilution Panel for Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes.**

I. Pujol, J. Capilla, B. Fernández-Torres, M. Ortoneda, J. Guarro  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, **40**:2618-2621

4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DEL ALBACONAZOL FRENTE A HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS.

4.2.1. **In vitro Antifungal Activities of the New Triazole UR-9825 Against Clinically Important Filamentous Fungi.**

J. Capilla, M. Ortoneda, F. J. Pastor, J. Guarro.  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, **45**:2635-2637

4.3. DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA *IN VIVO* DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS.

4.3.1. SCEDOSPORIOSIS

4.3.1.1. **Efficacy of Albaconazole (UR-9825) in the Treatment of Disseminated Infection by *Scedosporium prolificans*.**

J. Capilla, C. Yustes, E. Mayayo, B. Fernández, M. Ortoneda, F. J. Pastor, J. Guarro.  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, **47**:1948-1951

4.3.1.2. **Efficacy of Voriconazole in the Treatment of Systemic Scedosporiosis in Neutropenic Mice.**

J. Capilla, C. Serena, F. J. Pastor, M. Ortoneda, J. Guarro  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy (en prensa)

4.3.1.3. **Eficacia de Voriconazol en el Tratamiento de Scedosporiosis Sistémica en Cobayas. Correlación in vivo / in vitro**

J. Capilla, J. Guarro (en preparación)

4.3.1.4. **Fracaso Terapéutico de Anfotericina B desoxicolato, Anfotericina B Liposomal y Ravuconazol en un Modelo Animal de Scedosporiosis**

J. Capilla, J. Guarro (en preparación)

4.3.2. ASPERGILOSIS

4.3.2.1. **Development of a Murine Model of Cerebral Aspergillosis.**

T. M. Chiller, J. Capilla, R. A. Sobel, K. Farokhshad, K. V. Clemons, D. A. Stevens.

The Journal of Infectious Diseases, 2002, **186**:574-577

4.3.2.2. **Efficacy of Amphotericin B or Itraconazole in a Murine Model of Central Nervous System *Aspergillus* Infection.**

T. M. Chiller, R. A. Sobel, J. Capilla, K. V. Clemons, D. A. Stevens

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, **47**:813-815

4.3.2.3. **Efficacy of Micafungin Alone or in Combination Against Systemic Murine Aspergillosis.**

J. Capilla, K. V. Clemons, D. A. Stevens

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, **47**:1452-1455

4.3.3. PAECILOMICOSIS

4.3.3.1. **Infección experimental por *Paecilomyces lilacinus* en Ratones Inmunocomprometidos. Fracaso en la Monoterapia con Ravuconazol o Terbinafina y en la Combinación de ambos.**

J. Capilla, F. J. Pastor, C. Yustes, J. Guarro (en preparación)

4.3.4. FUSARIOSIS

4.3.4.1. **Desarrollo de Modelos de Infección Sistémica por *Fusarium* spp. en Cobayas.**

J. Capilla, C. Serena, J. Guarro (en preparación)

**Use of the Sensititre Colorimetric Microdilution Panel for Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes.**

I. Pujol, J. Capilla, B. Fernández-Torres, M. Ortoneda, J. Guarro  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, **40**:2618-2621

**In vitro Antifungal Activities of the New Triazole UR-9825 Against Clinically Important Filamentous Fungi.**

J. Capilla, M. Ortoneda, F. J. Pastor, J. Guarro.  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, **45**:2635-2637

**Efficacy of Albaconazole (UR-9825) in the Treatment of Disseminated Infection by *Scedosporium prolificans*.**

J. Capilla, C. Yustes, E. Mayayo, B. Fernández, M. Ortoneda, F. J. Pastor, J. Guarro.  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, **47**:1948-1951

## **Efficacy of Voriconazole in Treatment of Systemic Scedosporiosis in Neutropenic Mice**

---

J. Capilla, C. Serena, F. J. Pastor, M. Ortoneda, J. Guarro

---

### **ABSTRACT**

*Scedosporium apiospermum* is an opportunistic filamentous fungi which causes severe infections not only in immunodepressed but also in immunocompetent patients. Generally, patients are treated with amphotericin B (AMB) alone or in combination with other antifungal drugs but outcomes are often unsuccessful. We have evaluated the efficacy of voriconazole (VRC) in the prolongation of survival and the reduction of tissue burden in a murine model of systemic scedosporiosis. The survival of mice treated with VRC at 5, 20 or 40 mg/kg/day significantly increased in comparison with that of the control group ( $p < 0.043$ ) and the AMB-treated group ( $p < 0.05$ ). AMB was ineffective at reducing the fungal load in all the organs studied but VRC at 40 mg/kg/day significantly reduced tissue burden in the liver and brain ( $p < 0.001$  in both organs) in comparison with the control, and in the spleen ( $p = 0.04$ ) in comparison with the AMB-treated group.

## INTRODUCTION

*Scedosporium apiospermum* is an opportunistic filamentous fungus which causes severe infections not only in immunodepressed but also in immunocompetent patients. After *Aspergillus fumigatus*, it is one of the most common opportunistic pathogens filamentous fungi. Pathogenicity depends on the host's immune system status and the way of infection. Direct and traumatic inoculation is frequent and not only responsible for mycetomas but also for infections in many other body sites in immunocompetent patients (5, 14). Airways are probably the most frequent mode of penetration in immunosuppressed patients and can lead to invasive and usually fatal infections. The high tropism of *S. apiospermum* for the central nervous system (CNS) has been repeatedly documented by various authors (2, 16, 21). The treatment of severe scedosporiosis is far from being resolved. These infections are generally treated with amphotericin B (AMB) alone or in combination with other antifungal drugs such as itraconazole, flucytosine, fluconazole or miconazole, but outcomes are often unsuccessful. In vitro studies revealed that this fungus is resistant to the available antifungal drugs (4, 8, 19). Voriconazole (VRC) is one of the few drugs that have shown some in vitro activity against this fungus (8). Further studies in appropriate animal models are needed to confirm the activity of voriconazole. However, serum concentrations of VRC are very low, even undetectable, in mice due to the rapid clearance of the drug by the cytochrome P450

enzymatic complex (24). Some authors have demonstrated the inhibitory effect of grapefruit juice on the cytochrome P450 enzymes that are involved in the metabolism of VRC (9), which can be useful for increasing the murine serum concentrations of VRC (25). In the present study we have evaluated the efficacy of VRC in a systemic infection by *S. apiospermum* in immunodepressed mice drinking grapefruit juice instead of water.

### **Materials and Methods**

**Organism.** The clinical strain *S. apiospermum* FMR 6694, isolated from a human cerebral abscess was used in this study. The fungus was stored in slant cultures covered with sterile paraffin oil and subcultured on potato dextrose agar (PDA) plates at 35 °C for 7 days. In a previous in vitro study the MIC of VRC against this strain was 1 µg/ml (data not shown).

**Inoculum.** The inoculum was prepared by scraping the sporulated fungus from the agar plates with a loop and suspending them in sterile saline solution. The suspension was filtered through sterile gauze to remove the hyphae and the resultant conidia suspension was manually counted with a hemocytometer. The hemacytometer count was verified by enumerating the colony forming units (CFU) per milliliter of serial dilutions on PDA plates, which were incubated at 30° C for 96 h.

**Animals.** Male OF-1 mice weighting 30 g obtained from Charles River were used in the study. Groups of 10 animals were housed in standard conditions, with drink and feed *ad libitum*. Conditions were approved by the Animal Welfare Committee of the Rovira i Virgili University.

**Induction of neutropenia.** Animals were immunodepressed by a single dose of ciclophosphamide at 200 mg/kg administered intraperitoneally (i.p.) (Genoxal<sup>®</sup>, Laboratorios Funk, Barcelona, Spain) plus 5-fluorouracil intravenously (i.v.) at 150 mg/kg (Productos Roche, Madrid, Spain) one day prior to the infection.

**Drugs.** VRC was provided by Pfizer (Madrid, Spain). Stock solutions of this drug were prepared in polyethylene glycol 200 (PEG 200). AMB was purchased from Squibb Industria Farmacéutica (Spain) and reconstituted according the manufacturer's instructions.

**Survival study.** Six groups of 10 animals were infected with an inoculum of  $1 \times 10^4$  CFU i. v. via the lateral tail vein. Mice treated with VRC received 5, 20 or 40 mg/kg/day of the drug by gavage (p. o.). Amphotericin B deoxycolate (AMB) was administered at 0.8 mg/kg/day i. v. or 1 mg/kg/day i. p. of body weight. The control group received PEG 200 p. o. All treatments were begun one day after challenge and administered daily for 10 days. Three days prior to the infection the mice that received VRC

or PEG 200 were given grapefruit juice (Hero España, Murcia, Spain) to drink in lieu of water.

**Fungal burden study.** Three groups of 10 animals were infected with an inoculum of  $3.4 \times 10^3$  CFU i. v. The control group received PEG 200 and the two treatment groups received AMB i .v. at 0.8 mg/kg/day and VRC p. o. at 40 mg/kg/day, respectively. All treatments were administered daily for 10 days and approximately 24 h after the last dose, the surviving animals were sacrificed by inhalation of halotane. Brain, kidney, liver and spleen were removed aseptically, weighted and homogenized in 2 ml of saline 0.9%. Serial 10-fold dilutions of these homogenates were placed on PDA plates and incubated at 35°C. After 72 – 96 h, the number of CFU was determined.

**Statistical analysis.** Survival rates were evaluated with the Kaplan-Meyer test and organ burdens were compared with the Mann-Whitney U test using Graph Pad Prism software, version 3.00 for Windows.

## RESULTS

Figure 1 shows the survival curves for the different groups of mice included in the survival study. Untreated animals began to die on day 5 post infection and on day 8 no animals were alive. Mean survival time (MST) of the control group was 6.8 days. Similar mortality was found in

animals treated with AMB i. p. at 1 mg/kg (MST = 6.50 days) and with AMB i. v. at 0.8 mg/kg (MST = 6.40). The survival of animals treated with VRC increased significantly. They reached MSTs of 9.5, 8.2 and 11.5 days with doses of 5, 20 and 40 mg/kg/day, respectively (VRC at 5 mg/kg/day versus the control,  $P = 0.007$ ; VRC at 5 mg/kg/day versus both AMB treatments, no significant; VRC at 20 mg/kg/day versus the control and AMB treatments,  $P < 0.05$ ; VRC at 40 mg/kg/day compared to the control and to both AMB treatments,  $P \leq 0.0002$ ). VRC at 40 mg/kg was more effective at prolonging survival than VRC at 20 mg/kg ( $p = 0.006$ ) but was not significant in comparison to VRC at 5 mg/kg. No significant differences were found between the groups that received VRC 5 mg/kg and VRC 20 mg/kg ( $P = 0.28$ ).

Quantitative cultures showed that the fungus disseminated to the four organs tested (table 1). The most affected organs in untreated animals were the brain ( $5.58 \log_{10}$  CFU/g) and kidneys ( $4.58 \log_{10}$  CFU/g). In the spleen and liver, CFU counts were a bit lower ( $4.46 \log_{10}$  CFU/g and  $4.04 \log_{10}$  CFU/g, respectively). AMB did not reduce tissue burden in any of the studied organs. VRC significantly reduced tissue burden in the liver ( $2.92 \log_{10}$  CFU/g) and brain ( $4.25 \log_{10}$  CFU/g) in comparison to the control ( $p < 0.001$  in both organs) and to the AMB treated mice ( $p = 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively). Tissue burden in the spleen and kidney reduced somewhat in animals treated with VRC but the differences with the control group were not significant. In the spleen of

animals treated with VRC 40, CFU were significantly lower than in those treated with AMB (  $P = 0.04$ ).

## DISCUSSION

We have used a previously developed murine model of systemic *S. apiospermum* infection (3, 22) to test the efficacy of VRC. Recently a similar model has been described by González et al. (13) although they used a less virulent strain because, even though the inoculum was the same, only 25% of mice died after 25 days. The differences in mortality could be due to the different immunosuppression regimens used in both studies. We used cyclophosphamide plus 5-fluorouracil and González et al. (13) used cyclophosphamide alone. In previous studies, we demonstrated some variability in the virulence of different *S. apiospermum* strains (22), which could be another reason for the mentioned differences between the models. Mice are the most useful animal for testing antifungal compounds because they are easy to handle and there is a considerable amount of information available about their pathophysiology (1). However, as we mentioned above, they are not suitable for testing VRC efficacy because the drug is quickly metabolized by cytochrome P450 enzymes and serum concentrations are low or even undetectable. The ability of grapefruit juice, an inhibitor of cytochrome P450, to improve the pharmacological availability of different drugs in mice is extensively documented (9, 17, 24). Mice that drink grapefruit

juice ad libitum have high serum concentrations of VRC (24). This pharmacokinetic interaction proved to be useful in resolving experimental blastomycosis in mice (25). The present study was also positive in prolonging the survival of mice infected with *S. apiospermum* in comparison to those treated with AMB. In a previous study, we demonstrated that grapefruit juice did not exert any in vitro or in vivo inhibitory effect against this fungus (data not shown). The increase in survival was markedly evident in animals than received VRC at 40 mg/kg; half of them survived after 14 days. In humans *S. apiospermum* usually presents tropism for CNS causing primary brain abscesses in immunocompromised patients which are usually fatal (16, 21). In approximately half of the reported cases no site of *S. apiospermum* infection, other than the CNS was found (2). Although correlations between results obtained using animals models and the course of infections in humans are not always good, this study and others (3, 13, 22) confirm this CNS tropism. In the present model, only animals receiving VRC were able to reduce fungal load in the brain. Other animal studies showed that VRC was also effective at resolving CNS infections by *Aspergillus fumigatus*. and *Candida krusei* (6, 10, 11, 18). Although few data still exist, clinical results on the role of VRC in human scedosporiosis are very positive and seem to confirm the experimental studies. In recent years, five human cases of disseminated infection by

this fungus have been treated with VRC with very favorable outcomes (12, 20, 21, 27).

For a long time amphotericin B has been the standard treatment agent for invasive fungal diseases but its effectiveness is reduced by poor CNS penetration, fungal resistance and toxicity (7). Treatments with liposomal formulations of AMB did not show an adequate clinical response either (26). Other azole antifungal agents such as itraconazole, or ketoconazole, despite their greater penetration into brain tissues (7, 15), have demonstrated poor activity against *Scedosporium* spp. (8). VRC, on the other hand, is lipophilic and concentrations in CNS are therefore significant (23). On basis of our results and those obtained by other authors, VRC seems to be a therapeutical option for treating severe scedosporiosis. However, additional studies are needed if the potential of this drug in the treatment of this infection is to be determined .

## REFERENCES

1. **Andriole, V. T., P. Minitzer, D. George, D. Kordick, T. F. Patterson.** 1992. Animal models: Their usefulness for studies of fungal pathogenesis and drug efficacy in aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **14**:134-138
2. **Berenguer, J., J. Diaz-Mediavilla, D. Urra, P. Muñoz.** 1989. Central nervous system infection caused by *Pseudallescheria boydii*. *Rev. Infect. Dis.* **11**:890-896
3. **Cano, J., J. Guarro, E. Mayayo, J. Fernández-Ballart.** 1992. Experimental infection with *Scedosporium inflatum*. *J. Med.Vet. Mycol.* **30**:413-420
4. **Carrillo, A. J., Guarro, J.** 2001. In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2151-2153
5. **Cremer, G., P. Boiron.** 1996. Epidemiology and biology of *Scedosporium* species. *J. Mycol. Méd.* **6**:165-171
6. **Chandrasekar, P. H., J. Cutright, E. Manavathu.** 2000. Efficacy of voriconazole against invasive pulmonary aspergillosis in a guinea-pig model. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:673-676
7. **Drouhet, E., B. Dupon.** 1987. Evolution of antifungal agents: past, present and future. *Rev. Infect. Dis.* **9**:4-14
8. **Espinel-Ingroff, A., K. Boyle, D. J. Sheehan.** 2001. In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. *Mycopathologia* **150**:101-115

9. **Fuhr, U.** 1998. Drug interactions with grapefruit juice. extent, probable mechanism and clinical relevance. *Drug Safety*. **18**:251-272
10. **George, D., P. Minitier, V. T. Andriole.** 1996. Efficacy of UK-109496, a new azole antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:86-91
11. **Ghannoum M. A., I. Okogbule-Wonodi, N. Bhat, H. Sanati.** 1999. Antifungal activity of voriconazole (UK-109,496), fluconazole and amphotericin B against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic guinea pig model. *J. Chemother.* **11**:34-39
12. **Girmenia, C., G. Luzi, M. Monaco, P. Martino.** 1998. Use of voriconazole in treatment of *Scedosporium apiospermum* infection: case report. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1436-1438
13. **González, G. M., R. Tijerina, L. Najvar, M. Rinaldi, I. T. Yeh, J. R. Graybill.** 2002. Experimental murine model of disseminated *Pseudallescheria* infection. *Med. Mycol.* **40**:243-248
14. **Greig, J. R., M. A. Khan, N. S. Hopkinson, B. G. Marshall, P.O. Wilson, S. U. Arman.** 2001. Pulmonary infection with *Scedosporium prolificans* in an immunocompetent individual. *J. Infect.* **43**:15-17
15. **Haynes, R. R., P. A. Connolly, M. M. Durkin, A. M. LeMonte, M. L. Smedema, E. Brizendine, L. J. Wheat.** 2002. Antifungal therapy of central nervous system histoplasmosis, using a newly developed intracranial model of infection. *J. Infect. Dis.* **185**:1830-1832
16. **Horré, R., G. S. de Hoog.** 1998. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Studies in Mycologie* **43**:176-193

17. **Kane G. C., Lipsky, J. J.** 2000. Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clinic Proceedings*. **75**:933-942
18. **Kirkpatrick W. R., R. K. Mc Atee, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, T. F. Rinaldi.** 2000. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of disseminated invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2865-2868
19. **Meletiadis, J., J. F. Meis, J. W. Mouton, J. L. Rodríguez-Tudela, J. P. Donnelly, P.E. Verweij.** 2002. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:62-68
20. **Muñoz, P., M. Marín, P. Tornero, P. Martín Rabadán, M. Rodríguez-Creixéms, E. Bouza.** 2000. Successful outcome of *Scedosporium apiospermum* disseminated infection treated with voriconazole in a patient receiving corticosteroid therapy. *Clin. Infect. Dis.* **31**:1499-1501
21. **Nesky, M. A., E. C. Mc Dougal.** 2000. *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis. *Clin. Infect. Dis.* **31**:673-677
22. **Ortoneda, M., F. J. Pastor, E. Mayayo, J. Guarro.** 2002. Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model. *J. Med. Microbiol.* **51**:924-928
23. **Sheehan, D. J., C. A. Hitchcock, C. M. Sibley.** 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:40-79
24. **Sugar, A. M., Liu, X-P.** 2000. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med. Mycol.* **38**:209-212

25. **Sugar, A. M., Liu, X-P.** 2001. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:601-604
26. **Walsh, T. J., J. W. Hiemenz, N. L. Seibel, J. R. Perfect, G. Horwith, L. Lee, J. L. Silver, M. J. DiNubile, A. Reboli, E. Bow, J. Lister, E. J. Anaissie.** 1998. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin. Infect. Dis.* **28**:1383-1396
27. **Walsh, T. J., I. Lutsar, T. Driscoll, B. Dupont, M. Roden, P. Ghahramani, M. Hodges, A. H. Groll, J. R. Perfect.** 2002. Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr. Infect. Dis.* **21**:240-248

**Figure legends**

Figure 1. Survival curves of male immunosuppressed OF-1 mice infected intravenously with *S. apiospermum* and left untreated, given PEG 200, or treated with AMB at a dose of 0.8 mg/kg i. v. or 1.5 mg/kg i. p. and VRC at 5, 20 or 40 mg/kg p. o. Treatments were started on day 1 post infection and continued for 10 days.

Figure 1

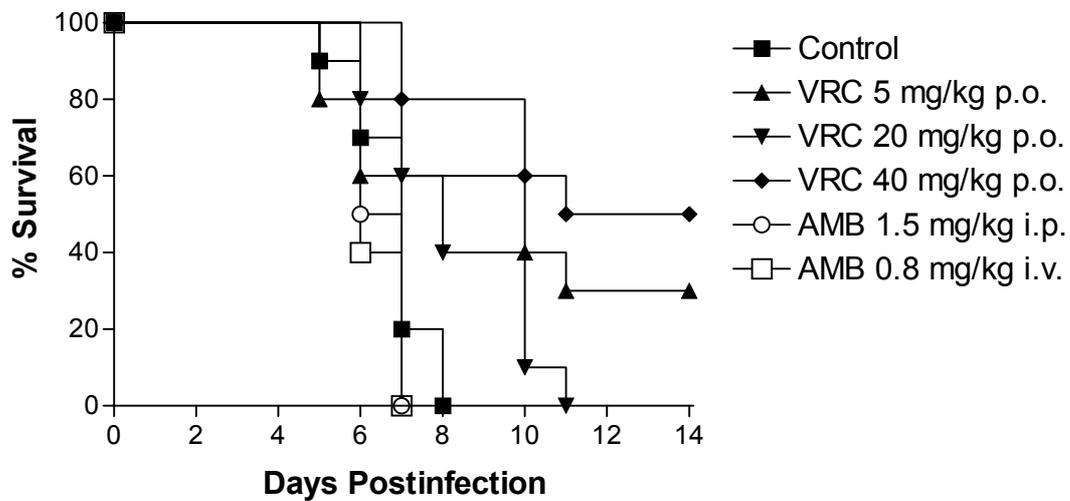


Table 1. Semiquantitative results of organ cultures of mice treated with antifungal therapy begun 24 h after challenge and sacrificed 24 h after completion of therapy

Treatment (no. of animals)	Mean log <sub>10</sub> CFU / g (C.I.) <sup>a</sup>			
	Kidneys	Spleen	Liver	Brain
Control (4)	4.58 (4.37-4.80)	4.46 (3.86-5.07)	4.04 (3.63-4.44)	5.58 (5.18-5.99)
AMB 0.8 mg/kg (5)	5.14 (4.53-5.73)	4.82 (4.49-5.13)	4.16 (3.84-4.48)	5.68 (5.40-5.97)
VRC 40 mg/kg (9)	3.39 (0.87-5.91)	3.83 <sup>b</sup> (3.12- 4.54)	2.92 <sup>c, d</sup> (2.49- 3.35)	4.25 <sup>c, d</sup> (3.77- 4.74)

<sup>a</sup> C.I., confidence interval

<sup>b</sup> P = 0.04 vs. AMB treated group

<sup>c</sup> P < 0.001 vs. control group.

<sup>d</sup> P ≤ 0.001 vs. AMB treated group

---

## Eficacia de Voriconazol en el Tratamiento de Scedosporiosis Sistémica en Cobayas.

### Correlación in vivo / in vitro

J. Capilla, J. Guarro

---

*Scedosporium apiospermum* es un hongo filamentoso oportunista que frecuentemente causa infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos. Uno de los principales problemas en el tratamiento de tales infecciones reside en la elevada resistencia que este hongo presenta a los antifúngicos convencionales, por lo que el éxito terapéutico es muy bajo. Voriconazol (VCZ) es uno de los pocos antifúngicos que ha demostrado cierta actividad frente a *S. apiospermum* en pacientes con scedosporiosis. Nosotros hemos desarrollado un modelo de infección sistémica por dicho hongo en cobayas para evaluar la eficacia del citado compuesto. Otro de los objetivos que perseguimos fue el de demostrar la posible correlación en la sensibilidad al VRC entre los estudios in vitro e in vivo. Para ello se seleccionaron dos cepas de *S. apiospermum*, una presumiblemente resistente al voriconazol y otra sensible. Los resultados demostraron que VCZ es un fármaco que posee una eficacia potencial para resolver la scedosporiosis sistémica cuando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa ensayada es de 0.5-1 µg/ml. Sin embargo, es inactiva en cepas para las cuales VCZ presenta CMI de cómo mínimo 8 µg/ml.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas.** Se utilizaron dos cepas de *Scedosporium apiospermum* de nuestra colección (FMR 6694 y FMR 6622). Ambas cepas se conservaron a -80°C en forma de suspensión de conidios en caldo de patata y dextrosa (CPD) en una solución de glicerol al 30%. La CMI de voriconazol fue de 0.5-1µg/ml para la cepa FMR 6694 y de 8 µg/ml para FMR 6622.

**Inóculos.** Las suspensiones de conidios se descongelaban a temperatura ambiente y se dispensaban a razón 100µl en 150 ml de CPD. El cultivo fue incubado a 32°C con agitación orbital (150 rpm) durante 5 días. La suspensión de conidios obtenida se filtraba a través de una gasa estéril y el filtrado se centrifugaba a 3000 rpm. durante 14 min. Una vez desechado el sobrenadante, se resuspendía el sedimento en 10 ml de solución salina estéril. La concentración final de conidios se ajustaba mediante una cámara de Neubauer.

**Animales.** Se utilizaban cobayas albinas Hartley de 450 g de peso (Charles River, Barcelona, España). Los animales se estabulaban en condiciones estándar con bebida y comida *ad libitum*.

**Inmunodepresión.** Los animales fueron inmunodeprimidos mediante dosis repetidas de ciclofosfamida i.p. a una concentración de 100mg/kg.

Las dosis se administraron los días uno y tres previos a la infección (-3 y -1) y los días uno y tres después de la infección (+1 y +3).

**Infección.** Los animales fueron infectados intravenosamente con una suspensión de conidios. Para la cepa FMR 6694 se utilizó un inóculo de  $7.5 \times 10^5$  UFC/animal y para la cepa FMR 6622,  $3 \times 10^5$  UFC/animal.

### RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la mortalidad de los animales infectados con la cepa de *S. apiospermum* FMR 6694 y FMR 6622 en el estudio preliminar de mortalidad. El tiempo medio de supervivencia (TMS) fue de 5.83 y 5.33 días respectivamente. Las figuras 2 y 3 presentan la supervivencia de los animales infectados con las cepas FMR 6694 y FMR 6622, tratados con VCZ, respectivamente. Los animales utilizados como control, recibieron únicamente PEG 200 y presentaron una mortalidad similar a la de los animales empleados en el estudio preliminar (TMS = 6.5 días en el caso de la infección con la cepa FMR 6694 y TMS = 4.5 días con la cepa FMR 6622). Los animales infectados con la cepa FMR 6694, y tratados con VCZ a 10 o 20 mg/kg/día, incrementaron significativamente la supervivencia ( $p = 0.0033$  y  $0.0015$  en comparación con el grupo control, respectivamente) llegando al 100% en aquellos que recibieron la dosis más alta de VCZ. Sin embargo aquellos animales infectados con la cepa FMR 6622 y que recibieron

VCZ a 10 o 20 mg/kg/día, no incrementaron el TMS y no se observaron cambios significativos en su supervivencia (  $p = 0.767$  y  $0.9778$  respecto a los animales del grupo control, respectivamente).

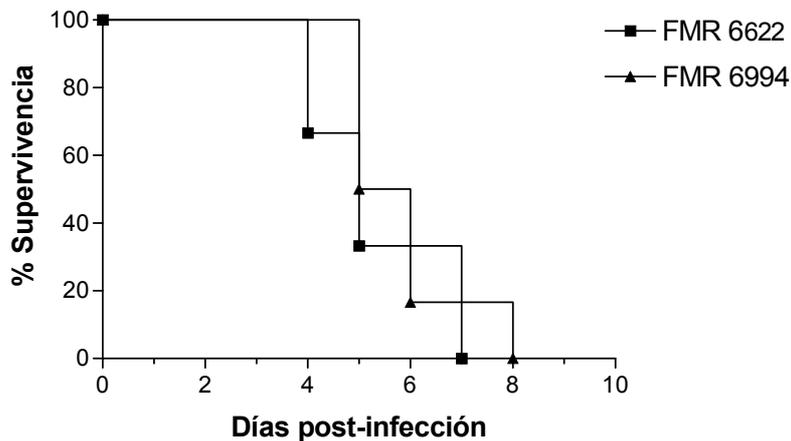


Figura 1. Curvas de supervivencia de los animales control. Se utilizó un inóculo de  $7.5 \times 10^5$  UFC/animal con la cepa FMR 6694 y de  $3 \times 10^5$  UFC/animal para la cepa FMR 6622.

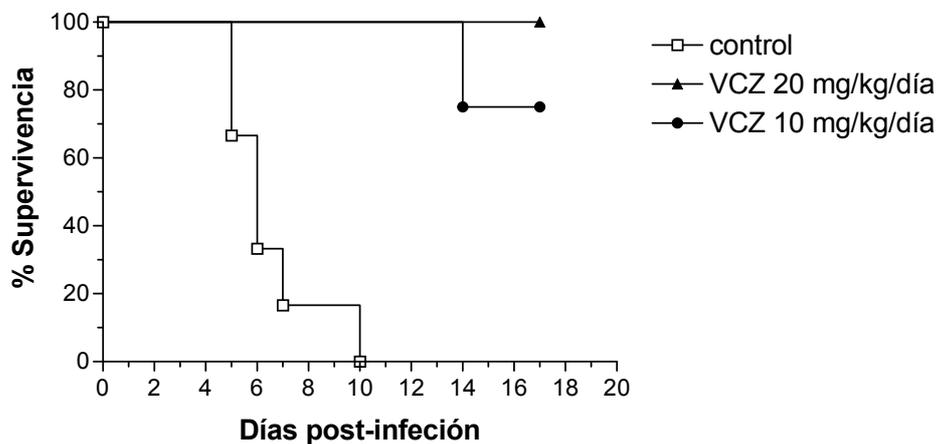


Figura 2. Curvas de supervivencia de los animales infectados con *S. apiospermum* (FMR 6694) a una concentración de  $3 \times 10^5$  UFC/animal. Los animales recibieron voriconazol (VCZ) p.o. a dosis de 10 o 20 mg/kg/día. El grupo control recibió PEG 200 como tratamiento placebo.

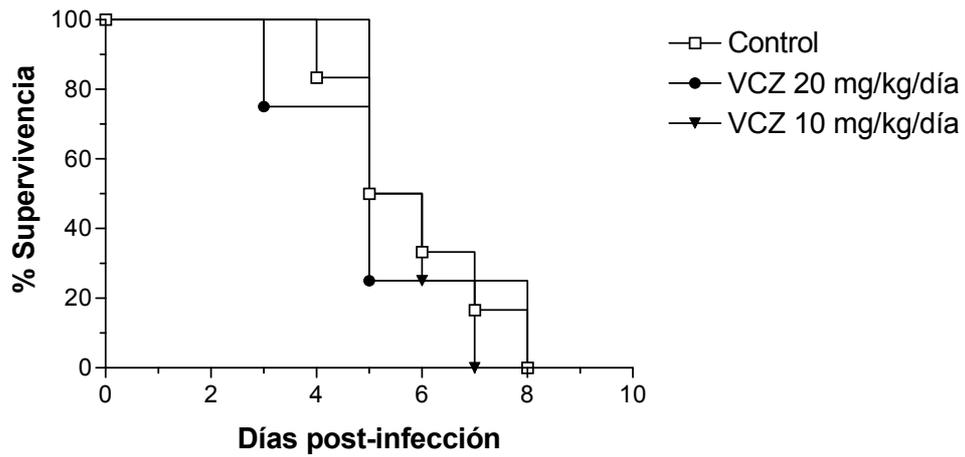


Figura 3. Curvas de supervivencia de los animales infectados con *S. apiospermum* (FMR 6622) a una concentración de  $7.5 \times 10^5$  UFC/animal. Los animales recibieron voriconazol (VCZ) p.o. a dosis de 10 o 20 mg/kg/día. El grupo control recibió PEG 200 como tratamiento placebo.

## **Fracaso Terapéutico de Anfotericina B desoxicolato, Anfotericina B liposomal y Ravuconazol en un Modelo Animal de Scedosporiosis**

J. Capilla, J. Guarro

---

*Scedosporium apiospermum* es un hongo causante de infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos y habitualmente resistente a los antifúngicos. Ravuconazol (RVC) ha demostrado, en estudios previos *in vitro*, actividad frente a este hongo filamentoso. Hemos desarrollado un modelo animal de scedosporiosis sistémica para comparar la eficacia de RVC con la de la anfotericina B convencional (AMB) y liposómica (AMBL). Ninguno de los tres compuestos ensayados ha mostrado eficacia en resolver la infección experimental en ratones.

### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

**Cepa.** Utilizamos una cepa de *S. apiospermum* de nuestra colección (FMR 6694) aislada de una infección sistémica fatal en un enfermo hematológico. La cepa se conservó a -80°C en forma de suspensión de conidios en caldo de patata y dextrosa (CPD) con un 30% de glicerol.

**Inóculo.** Tras descongelar a temperatura ambiente la suspensión de conidios, se dispensaron 100 µl de la misma en 150 ml de CPD. El cultivo

fue incubado a 32°C con agitación orbital (150 rpm.) durante 5 días. Luego se filtró la suspensión a través de una gasa estéril y el filtrado se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 14 min. Tras desechar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 10 ml de solución salina estéril. La concentración final de conidios se ajustó con una cámara de Neubauer.

**Animales.** Se utilizaron ratones OF-1 machos de 30 g de peso que fueron estabulados en condiciones estándar con acceso libre a la comida y la bebida.

**Immunosupresión.** Los animales fueron inmunodeprimidos con una dosis única de ciclofosfamida i.p (200 mg/kg) y 5-fluoruracilo i.v. (150 mg/kg) el día de la infección.

**Estudio de dosis letal.** Se establecieron 4 grupos de 10 animales. Cada grupo recibió el inóculo por vía iv. a través de la vena lateral de la cola. Los inóculos ensayados fueron de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  o  $1 \times 10^7$  UFC/animal.

**Antifúngicos.** AMB y RCZ fueron suministrados por Squibb Industria Farmacéutica, (Madrid, España), AMBL fue suministrado por Gilead Sciences S. A., Madrid, España.

**Estudio de tratamiento.** Se emplearon 9 grupos de 10 animales. Los animales fueron inoculados con  $5 \times 10^5$  UFC/animal. Los grupos de tratamiento recibieron AMB i.v. en dosis de 1 mg/kg/día o i.p. 1.5 mg/kg; AMBL fue administrada i.v. en dosis de 5 o 10 mg/kg/día y RCZ p.o. lo fue en dosis de 15 o 30 mg/kg/día. El grupo control recibió PEG 200 p.o. como tratamiento placebo. Todos los tratamientos se administraron 24 h después de la infección y durante 10 días.

## RESULTADOS

En la figura 1 se muestran las curvas de supervivencia obtenidas con los diferentes inóculos ensayados. *S. apiospermum* demostró una letalidad dosis-dependiente en ratones inmunodeprimidos. El inóculo de  $10^5$  CFU/animal no provocó la muerte de ninguno de los animales, sin embargo aquellos que recibieron  $5 \times 10^5$  UFC/animal presentaron una mortalidad del 100% a los 8 días post-infección y un tiempo medio de supervivencia (TMS) de 6.2 días. Los inóculos de  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  UFC/animal causaron la muerte del 100% de los animales a los 4 y 5 días post-infección, respectivamente (TMS = 4.5 y 1.1 días, respectivamente).

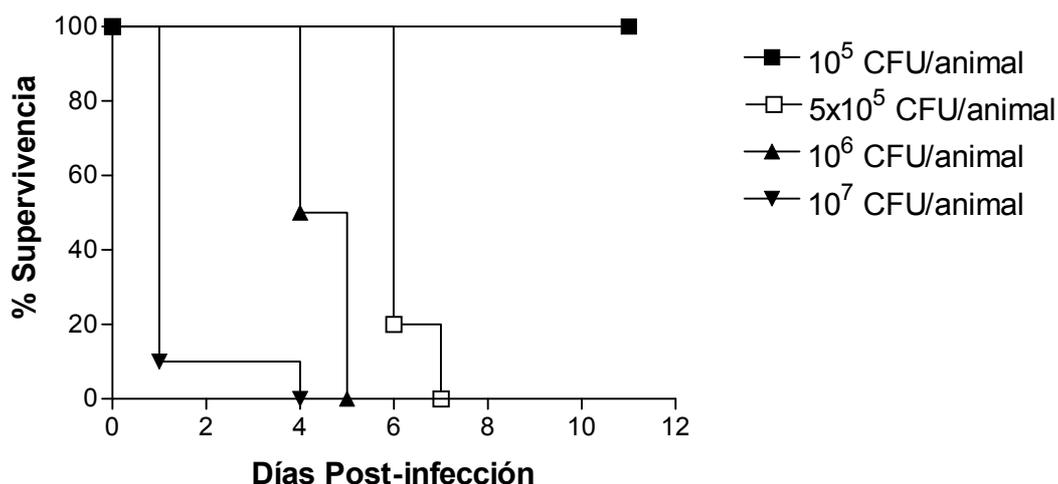


Figura 1. Curvas de mortalidad de ratones OF-1 inmunodeprimidos e infectados con *S. apiospermum* (FMR 6694). Estudio de dosis letal en grupos de 10 animales/grupo.

En la figura 2, se muestran las curvas de supervivencia de los animales tratados con AMB, AMBL o RCZ. No se detectó un aumento en la supervivencia de los animales tratados con AMB i.v. a dosis de 1 mg/kg/día, que presentaron un TMS de 6.5 días y aquellos tratados con AMB i.p a razón de 1.5 mg/kg/día mostraron un TMS de 6.2 días ( $p = 0.26$  y  $0.46$  en comparación al grupo control, respectivamente). Tampoco en aquellos tratados con AMBL a dosis de 5 o 10 mg/kg/día ( $p = 0.468$ ,  $0.23$ ,  $0.168$  en comparación con el grupo control, respectivamente). Finalmente, los tratamientos con 15 o 30 mg/kg/día de RCZ tampoco incrementaron la supervivencia de los ratones infectados ( $p > 0.35$  en ambos casos en comparación con el grupo control).

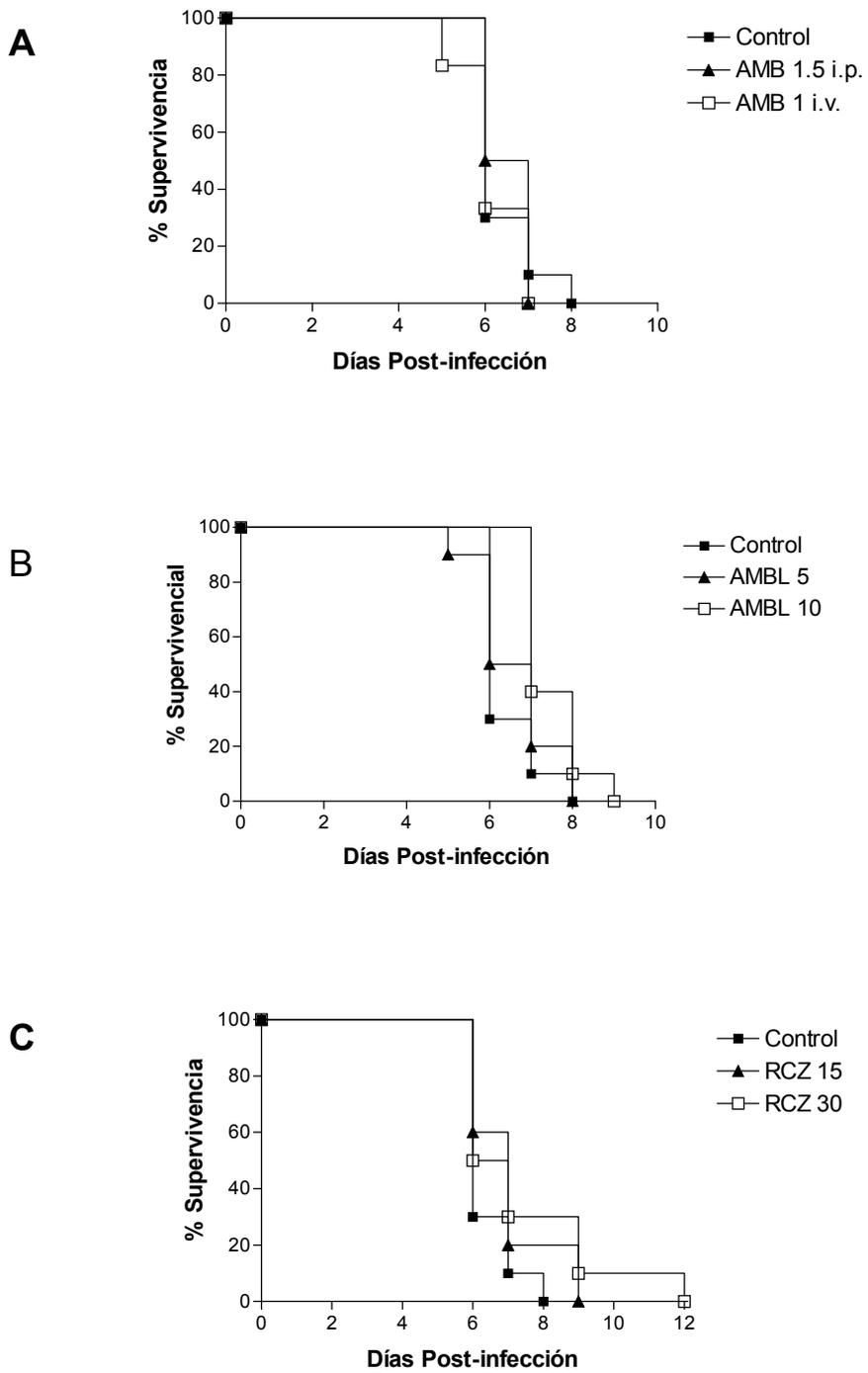


Figura 2. Curvas de supervivencia de ratones OF-1 inmunosuprimidos infectados con *S. apiospermum* ( $5 \times 10^5$  UFC/animal) y tratados con: **A)** anfotericina B, **B)** anfotericina liposómica o **C)** ravuconazol.

**Development of a Murine Model of Cerebral Aspergillosis.**

T. M. Chiller, J. Capilla, R. A. Sobel, K. Farokhshad, K. V. Clemons, D. A. Stevens.

The Journal of Infectious Diseases, 2002, **186**:574-577

**Efficacy of Amphotericin B or Itraconazole in a Murine Model of Central Nervous System *Aspergillus* Infection.**

T. M. Chiller, R. A. Sobel, J. Capilla, K. V. Clemons, D. A. Stevens

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, **47**:813-815

**Efficacy of Micafungin Alone or in Combination Against Systemic Murine Aspergillosis.**

J. Capilla, K. V. Clemons, D. A. Stevens

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, **47**:1452-1455

## **Infección Experimental por *Paecilomyces lilacinus* en Ratones Immunocomprometidos. Fracaso de la Monoterapia con Ravuconazol y Terbinafina y de la Combinación de ambos.**

J. Capilla, F. J. Pastor, C. Yustes, J. Guarro

---

*Paecilomyces lilacinus* es uno de los hongos oportunistas emergentes causantes de infecciones graves. Las infecciones producidas por dicho hongo suelen ser resistentes a los antifúngicos. Tradicionalmente *P. lilacinus* es causante de infecciones cutáneas pero en los últimos años se ha observado un incremento de las infecciones diseminadas en pacientes neutropénicos. Diversos trabajos *in vitro* han demostrado el efecto sinérgico entre la terbinafina y algunos azoles. Hemos evaluado la eficacia de la terbinafina y el ravuconazol, por separado y en combinación, frente a paecilomicosis sistémica en ratones. A pesar de los resultados *in vitro* obtenidos con ambos compuestos que parecían indicar posible actividad, no hemos observado eficacia en nuestro modelo animal.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Cepa.** Se seleccionó una cepa de origen clínico de *Paecilomyces lilacinus* de nuestra colección (FMR 5522). La cepa se conservaba a –

80°C en forma de suspensión de conidios en caldo de patata y dextrosa (CPD) con un 30% de glicerol.

**Inóculo.** Tras descongelar a temperatura ambiente la suspensión de conidios, se dispensaron 100 µl de la misma en 150 ml de CPD. El cultivo fue incubado a 32°C con agitación orbital (150 rpm) durante 5 días. Luego se filtró la suspensión a través de una gasa estéril y el filtrado se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 14 min. Tras desechar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 10 ml de solución salina estéril. La suspensión final de conidios se ajustó a la concentración deseada con una cámara de Neubauer.

**Animales.** Se utilizaron ratones OF-1 machos de 30 g de peso estabulados en jaulas estándar de 10 animales con comida y agua *ad libitum*.

**Inmunosupresión.** Los animales fueron inmunosuprimidos mediante una dosis única de 200 mg/kg de ciclofosfamida administrada i.p. y 150 mg/kg de 5-fluoruracilo i.v. Ambos fármacos se administraron el mismo día de la infección.

**Estudio de dosis letal.** Se establecieron 3 grupos de 10 animales/grupo a los que se inoculó intravenosamente, a través de la vena lateral de la

cola, una suspensión de conidios de  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  UFC/animal a cada grupo, respectivamente.

**Antifúngicos.** Se ensayó la eficacia *in vivo* de la anfotericina B (AMB), ravuconazol (RCZ) y terbinafina (TF). AMB (Squibb Industria Farmacéutica, Barcelona, España) se solubilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. RCZ (Squibb Industria Farmacéutica, Barcelona, España) y TF (Novartis, Barcelona, España) se disolvieron en PEG 200.

**Estudio de tratamiento.** Los animales incluidos en el estudio se inocularon i.v. con  $5 \times 10^6$  UFC/animal. Se establecieron 5 grupos de 10 animales. Dos de ellos fueron tratados con RCZ p.o. a dosis de 30 y 50 mg/kg/día, respectivamente. Un tercer grupo fue tratado con TF p.o. a dosis de 30 mg/kg/día. El cuarto grupo recibió 50 mg/kg/día de RCZ p.o. y 30 mg/kg de TF p.o. a cuatro veces al día. El grupo control recibió PEG 200 p.o. cuatro veces al día como tratamiento placebo. Todos los tratamientos se iniciaron 24 h post-infección y fueron administrados durante 5 días.

## RESULTADOS

En la figura 1, se representan las curvas de supervivencia obtenidas en el experimento. Los tres inóculos ensayados provocaron

una elevada mortalidad. El inóculo más concentrado causó la muerte al 100% de los animales a los 8 días post-infección (MST = 5.7 días). El inóculo de  $1 \times 10^7$  UFC/animal causó en 90% de mortalidad en los animales (MST = 6.4) y el de  $5 \times 10^6$  UFC/animal un 100% de mortalidad (MST = 9.3 días). Para evaluar la eficacia de la terapia experimental, se escogió el inóculo de  $5 \times 10^6$  UFC/animal ya que dicha concentración de conidios, provocó una alta mortalidad en los animales en un espacio de tiempo suficientemente dilatado como para permitir el tratamiento del 100% de los animales durante al menos 7 días.

En la figura 2, se muestran las curvas de supervivencia de los animales tratados. Ninguno de los tratamientos aplicados a los animales mostró una eficacia significativa en el incremento de la supervivencia respecto al grupo control ( $p \geq 0.09$  en todos los vs. el grupo control)

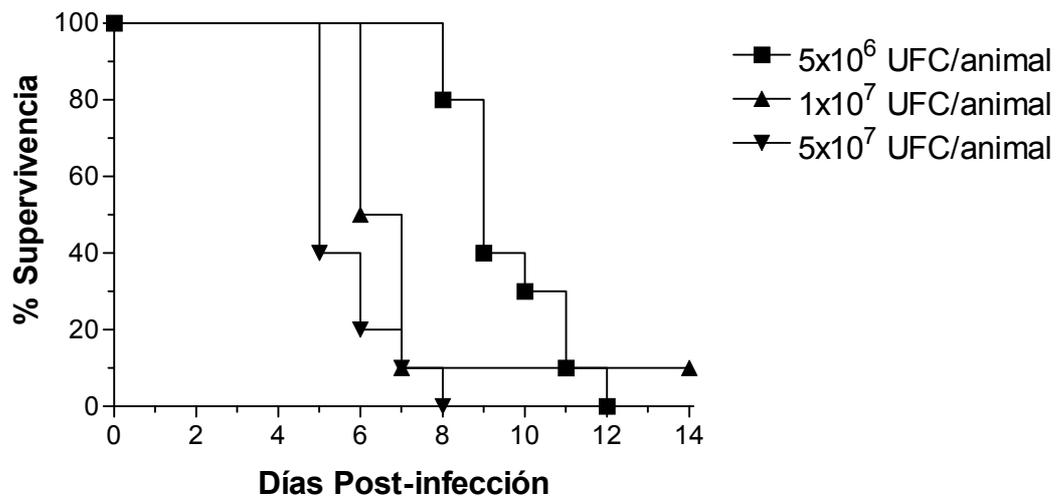


Figura 1. Curvas de supervivencia de los ratones OF-1 inmunodeprimidos e infectados i.v. con *P. lilacinus* (FMR 5522). Se ensayaron inóculos de  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  UFC/animal.

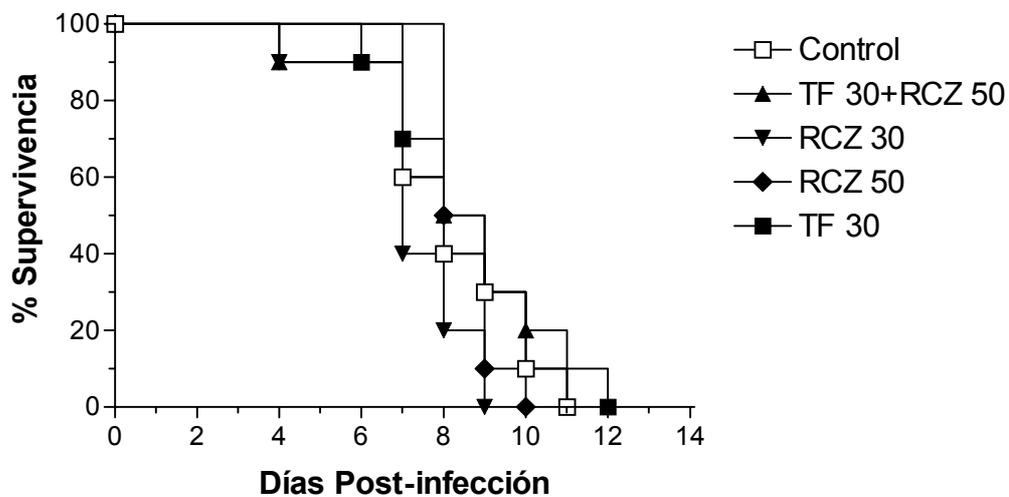


Figura 2. Curvas de supervivencia de los animales tratados con ravuconazol (RCZ) a 30 y 50 mg/kg/día y terbinafina (TF) 30 mg/kg/día. La terapia combinada TF + RCZ consistió en dosis de terbinafina a 30 mg/kg cuatro veces al día y ravuconazol a dosis de 50 mg/kg/día. Todos los tratamientos se administraron durante 5 días.

## Desarrollo de Modelos de Infección Sistémica por *Fusarium* spp. en Cobayas

J. Capilla, C. Serena, J. Guarro.

---

*Fusarium* es un hongo hialino oportunista que tradicionalmente había sido considerado como agente causante de infecciones cutáneas, onicomycosis y queratitis, principalmente. Sin embargo, a partir de la década de los 80 se han incrementado los casos de infecciones sistémicas. En la mayoría de los casos, las especies causantes han sido *F. solani*, *F. oxysporum* y en menor proporción *F. verticillioides*. Nosotros hemos intentado desarrollar un modelo de fusariosis con las dos primeras especies en cobayas. Sin embargo, como ya habían documentado previamente otros autores, no fue posible establecer la infección en dichos animales.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas.** Se utilizaron tres cepas de *Fusarium solani* (FMR 4391, FMR 6631 y FMR 6468) y una cepa de *Fusarium oxysporum* (FMR 4384). Las cepas se conservaron como una suspensión de conidios a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en caldo de patata y dextrosa (CPD) con un 30% de glicerol.

**Animales.** Se utilizaron cobayos Hartley albinos machos (Charles River, Barcelona, España) de 450 g de peso. Los animales se estabularon en jaulas con acceso libre a la comida y bebida. Se establecieron cuatro grupos de cuatro animales por.

**Preparación de los inóculos.** Los inóculos se prepararon descongelando a temperatura ambiente la suspensión de esporas y sembrando un volumen de 100  $\mu$ l de las mismas en 200 ml de CPD. El caldo de cultivo se mantuvo en agitación a 150 rpm a 30 °C durante 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se filtró el caldo a través de una gasa estéril y el filtrado se centrifugó a 3000 rpm durante 14 min. Tras desprejar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento con 10 ml de solución salina estéril. Los inóculos se ajustaron a la concentración requerida mediante el recuento de conidios en cámara de Neubauer.

**Inmunodepresión.** Los animales se inmunodeprimieron por administración i.p. de 100mg/kg de ciclofosfamida (Genoxal, Barcelona, España) los días -3, -1, +1 y +3, siendo el día 0 el día de la infección.

**Inoculación.** Se ensayaron dos inóculos,  $1.5 \times 10^8$  a  $2.1 \times 10^8$  UFC/animal. Los animales fueron infectados i.v. a través de la vena lateral del pene, previa anestesia. Como anestésicos se administraron intraperitonealmente (i.p.) 5 mg/kg de xilacina (Xilagesic 2%, Laboratorios

Calier, Barcelona, España) y 40 mg/kg de ketamina (Ketolar 50, Parke-Davis, Madrid, España). Tras la inoculación los animales se mantuvieron en observación hasta la recuperación completa de la anestesia.

### RESULTADOS

Los animales se recuperaron del efecto de la anestesia aproximadamente 45 min. después de su administración. A los tres días post-infección, observamos letargo y disminución del apetito en uno de los animales infectados con *F. solani*, sin embargo dos días después los síntomas remitieron y el animal recuperó su actividad normal. En contraste, los animales infectados con *F. oxysporum* no mostraron ningún cambios perceptible durante el tiempo que duró el experimento. Todos los animales se mantuvieron 21 días en observación sin que se percibieran cambios en su aspecto físico, fisiológico o de conducta. Transcurridos 21 días, ninguno de los animales infectados con las dos especies de *Fusarium* spp. murió.

## **DISCUSIÓN**

## **5.1. Evaluación de un método colorimétrico para determinar la susceptibilidad *in vitro* de hongos dermatofitos.**

El objetivo último de los ensayos de sensibilidad *in vitro* de los hongos filamentosos a los antifúngicos es el de poder predecir el éxito o el fracaso terapéutico del tratamiento en pacientes con infecciones fúngicas. La metodología estandarizada por el NCCLS, para la realización de este tipo de ensayos, es un procedimiento laborioso que presenta dificultades para su uso en el laboratorio clínico. Ante esta limitación práctica, se han comercializado diferentes sistemas de fácil elaboración e interpretación con la finalidad de agilizar la determinación de CMI en los centros asistenciales. Uno de los más extendidos es el método colorimétrico Sensititre Yeast One<sup>®</sup>, el cual hemos evaluado en nuestro laboratorio. El método se basa en la utilización de un indicador (Alamar Blue<sup>®</sup>) de la actividad oxidasa de los microorganismos, que va asociada al crecimiento de los mismos. Dicho indicador había sido ensayado experimentalmente para determinar las CMI de diferentes antimicrobianos frente a micobacterias (Sungkanuparph *et al.*, 2002; Luna-Herrera *et al.*, 2003), parásitos (Rätz *et al.*, 1997), hongos filamentosos (Meletiadis *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2002,) y levaduras (To *et al.*, 1995). En los ensayos realizados con hongos filamentosos, los resultados obtenidos no han demostrado en todos los

casos tener una buena correlación con la metodología estandarizada por el NCCLS (Tiballi *et al.*, 1995; Ramani y Chatuverdi, 2003). Jahn *et al.* atribuyen la variabilidad de los resultados a la baja actividad oxidativa de algunos hongos filamentosos, concretamente de *A. fumigatus* (Jahn *et al.*, 1996), que daría lugar a valoraciones erróneas. Nosotros hemos realizado por primera vez un estudio comparativo entre Sensititre Yeast One<sup>®</sup> y el NCCLS con dermatofitos (Resultados 4.1.1.) y con la intención de poder aplicar dicha técnica a otros hongos filamentosos. En nuestro caso, la correlación global entre ambos métodos fue del 81% para la anfotericina B y el itraconazol e inferior al 70% en el caso de fluconazol y ketoconazol. Los resultados no fueron dependientes únicamente del antifúngico empleado, ya que también hallamos importantes diferencias en función de la especie utilizada. El sistema colorimétrico demostró una excelente concordancia con el NCCLS en el caso de *Microsporum* spp. e itraconazol y *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* y anfotericina B, con un 100% de correlación en todos los casos. Esta variabilidad dependiente de las especies y antifúngicos implicados es una constante en los ensayos con hongos (Ramani y Chatuverdi, 2003) por lo que son necesarios nuevos estudios para establecer la fiabilidad del método pensando en su posible utilización en los laboratorios asistenciales.

## **5.2. Determinación de la actividad *in vitro* del albaconazol frente a hongos filamentosos oportunistas.**

El incesante incremento de las infecciones oportunistas por hongos filamentosos, la diversidad de los agentes causales, la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas y la frecuente resistencia al escaso abanico de antifúngicos disponibles, plantean graves dificultades para hallar una terapéutica exitosa. Dentro de la problemática actual, el desarrollo de nuevos fármacos juega un papel decisivo en la lucha contra las enfermedades producidas por hongos oportunistas.

Hemos evaluado la actividad *in vitro* de albaconazol frente a hongos filamentosos de importancia clínica (Resultados 4.2.1). Los resultados mostraron una actividad superior a la de la anfotericina B, frente a *Chaetomium globosum*, *Aspergillus* spp. y *Paecilomyces lilacinus*. Nuestros resultados se suman a los obtenidos por otros grupos de investigadores que previamente demostraron la eficacia *in vitro* de este triazol frente a hongos tales como *Aspergillus ustus* (Gené *et al.*, 2001) *Scedosporium* spp. (Carrillo-Muñoz y Guarro, 2001), *Exophiala* spp. (Meletiadis *et al.* 2000a) *Candida* spp. (Ramos *et al.* 1999) y dermatofitos (Fernández-Torres *et al.*, 2001). Por otra parte hemos documentado la ineficacia *in vitro* del albaconazol frente a aislados de *Fusarium solani* y

*Scytalidium* spp tal como ocurre con otros azoles ensayados frente a dichos géneros (Pujol *et al.*, 1997; Guarro *et al.*, 1999; 2000).

### **5.3. Determinación de la eficacia *in vivo* de nuevos antifúngicos frente a hongos filamentosos oportunistas**

#### **5.3.1. Scedosporiosis**

Albaconazol es prácticamente el único antifúngico que ha demostrado actividad *in vitro* frente a *Scedosporium* spp (Carrillo-Muñoz y Guarro, 2001), por lo que nos propusimos ensayar esta actividad en un modelo animal. Los modelos de scedosporiosis en ratón establecidos anteriormente (Cano *et al.* 1992; Ortoneda *et al.*, 2002) no son aptos para el uso experimental del albaconazol debido a la farmacocinética de este antifúngico (Bartolí *et al.*, 1998). Sin embargo los ensayos realizados en conejo, han demostrado que este animal podía ser útil para los estudios *in vivo* con albaconazol debido a su buena biodisponibilidad, niveles séricos y vida media (Bartolí *et al.*, 1998). Hemos desarrollado el primer modelo de scedosporiosis sistémica por *S. prolificans* en conejos. En este modelo establecimos una infección letal altamente reproducible. Demostramos la diseminación de la infección mediante recuperación de UFC del hongo a partir de cultivos de riñón, cerebro, bazo, pulmón e hígado, y las lesiones tisulares observadas en el examen histopatológico evidenciaron el desarrollo del microorganismo en los tejidos del huésped. Riñón, pulmón y cerebro fueron los órganos más afectados ( $> \log_{10} 2.4$

UFC/g). Las lesiones histológicas más importantes se localizaron en riñón y cerebro. La mayoría eran abscesos con abundante componente inflamatorio y áreas necróticas. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios llevados a cabo con ratones por otros autores (Cano *et al.*, 1992; Ortoneda *et al.*, 2002). Cabe destacar el marcado tropismo de este hongo por el SNC, demostrado tanto por la severidad de las lesiones tisulares detectadas, como por la elevada carga fúngica hallada en este tejido. Dicho tropismo había sido ya previamente demostrado en otros modelos animales de scedosporiosis (Cano *et al.*, 1992; González *et al.*, 2002) y refleja el curso de la infección en clínica humana especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Nesky *et al.*, 2000; Castiglioni *et al.*, 2002).

Este modelo fue empleado para evaluar la eficacia del albaconazol en el tratamiento de la scedosporiosis diseminada. Dicho triazol demostró una excelente eficacia en el tratamiento de la scedosporiosis en conejos, incrementando no solamente el tiempo de supervivencia de los mismos, sino también reduciendo el número de UFC/g y la severidad de las lesiones en los diferentes órganos. Esta eficacia se reflejó en la ausencia de UFC detectables en bazo, hígado y pulmón en todos los animales estudiados independientemente de la dosis administrada. En cerebro y riñón, la disminución de la carga fúngica y de las lesiones tisulares siguieron una respuesta dosis dependiente y sólo en aquellos animales que recibieron dosis de 50 mg/kg/día se observó una reducción

significativa. Los resultados obtenidos *in vitro* convierten al albaconazol en un candidato merecedor de ser utilizado en el tratamiento de las infecciones causadas por *S. prolificans* en humanos. Hasta la fecha es el uno de los pocos antifúngicos tal como hemos indicado, por no decir el único, que ha demostrado tener actividad frente a dicho hongo.

Al igual que albaconazol, voriconazol ha demostrado también actividad *in vitro* frente a una gran variedad de hongos filamentosos tales como *Aspergillus* spp., *Paecilomyces lilacinus* y *Alternaria* spp. (Espinel-Ingroff et al., 2001), hongos dimórficos y levaduras (Ghannoum et al. 2002; Carmen Serrano et al. 2003). Sin embargo ha mostrado una actividad moderada frente a *Scedosporium* spp. (Carrillo 2001; Espinel-Ingroff et al., 2001) a pesar de ello, la experiencia clínica con dicho compuesto parece indicar que podría ser el antifúngico de elección para el tratamiento de la scedosporiosis (Corrado et al., 1998; Nesky et al., 2000; Walsh et al., 2002; Perfect et al., 2003). En la presente tesis ensayamos la eficacia *in vivo* de voriconazol en un modelo de infección sistémica por *S. apiospermum* en ratones (Resultados 4.3.1.2.), basándonos en modelos animales previamente descritos por otros autores (Cano et al., 1992; González et al., 2002). Si bien los estudios farmacocinéticos realizados con voriconazol en ratones han demostrado que en este animal los niveles séricos son prácticamente indetectables (Andriole et al., 1992; Stevens, 1996a), los trabajos de Sugar y colaboradores (Sugar et al., 2000) demostraron que la administración de

zumo de pomelo *ad libitum* en ratones tratados con voriconazol, incrementaba la concentración sérica de dicho antifúngico a niveles presumiblemente terapéuticos. Se ha demostrado que el zumo de pomelo es un inhibidor de la actividad enzimática del citocromo P450, un sistema multienzimático implicado en la metabolización del voriconazol (Sugar *et al.*, 2000). El efecto del zumo de pomelo en la farmacocinética del voriconazol había ya demostrado cierta eficacia en el tratamiento de la blastomycosis (Sugar *et al.*, 2001) y fusariosis (Graybill *et al.*, 2003) en ratones. Más recientemente se ha atribuido el incremento de los niveles séricos de itraconazol en animales a los que se les suministró zumo de pomelo, a un aumento en la absorción intestinal de dicho antifúngico (Mc Callum *et al.*, 2002). Decidimos ensayar la eficacia de dicho antifúngico en ratones que recibían zumo de pomelo. La eficacia del voriconazol fue dosis-dependiente, obteniéndose los mejores resultados con la dosis más elevada del fármaco, (40 mg/kg/día). La recuperación del hongo a partir de los homogenizados de los diferentes órganos (riñón, bazo, hígado, pulmón y cerebro) confirmó el ya indicado tropismo de *S. apiospermum* por el SNC (Cano *et al.*, 1992; González *et al.*, 2002).

Partiendo de los esperanzadores resultados que obtuvimos con la utilización del voriconazol en el tratamiento de scedosporiosis en ratón y considerando como punto crítico el hecho de que la administración de zumo de pomelo creaba unas condiciones diferentes a las que se podrían presentar en las infecciones humanas, estudiamos su eficacia en

cobayas sin utilizar el zumo de pomelo. Algunos autores han indicado que la farmacocinética de este antifúngico en cobayas convierte a estos animales en los más adecuados para la realización de los ensayos *in vivo* con este compuesto (Graybill, 2000; Sugar *et al.*, 2000). La utilidad de las cobayas para el ensayo de voriconazol había sido demostrada previamente en diversos trabajos (Ghannoum *et al.*, 1999; Chandrasekar *et al.*, 2000; Kirkpatrick *et al.*, 2000; 2002) aunque utilizando otros hongos. Nosotros desarrollamos un modelo de scedosporiosis en cobayas utilizando dos cepas de *S. apiospermum*. Uno de los objetivos del estudio consistía también en intentar averiguar los posibles valores predictivos de las CMI del voriconazol obtenidas *in vitro*. Es decir, no sólo si voriconazol podía ser útil en la scedosporiosis en cobayas sino también si existía una correlación entre los resultados *in vitro* y la respuesta *in vivo*. Para ello la selección de las cepas se basó en los resultados de sensibilidad *in vitro* obtenidos previamente (datos no presentados). Una de las cepas escogidas (FMR 6694), la misma que se utilizó en el modelo con ratones, mostró una CMI relativamente baja (0.5-1 µg/ml), mientras que la segunda (FMR 6622) presentaba un valor mucho más elevado (8 µg/ml). Para obtener una mortalidad en los animales similar con ambas cepas, tuvimos que utilizar inóculos 2.5 veces más concentrados de la cepa FMR 6622 que de la FMR 6694. El tratamiento con 20 mg/kg/día de voriconazol incrementó la supervivencia de las cobayas infectadas con la cepa FMR 6694 hasta un 100%. Sin

embargo, no se observaron cambios significativos en la mortalidad de los animales que fueron infectados con la cepa presumiblemente resistente (FMR 6622). Existen hasta el momento pocos trabajos en los que se correlacionen las CMI obtenidas *in vitro* con la actividad *in vivo* (Espinell-Ingroff *et al.*, 2001). Éste es un aspecto fundamental para establecer puntos de corte que permitan discernir entre sensibilidad y resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Aunque los resultados que aquí se presentan son preliminares, éstos apuntan a que puede existir una correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* con voriconazol frente a *S. apiospermum* y por ello sería interesante ensayar más cepas con CMI intermedias entre los valores indicados.

Ravuconazol es un antifúngico triazólico en fase de desarrollo, que ha demostrado actividad *in vitro* frente a *Candida* spp. (Pfaller *et al.*, 2002), *Cryptococcus neoformans* (Yamazumi *et al.* 2000), *Trichosporon* spp. (Paphitou *et al.*, 2002) sp. y *Aspergillus fumigatus* (Fung-Tomc *et al.*, 1998) e *in vivo* frente a *Candida albicans* (Clemons *et al.*, 2001) *Aspergillus fumigatus* (Roberts *et al.* 2000) e *Histoplasma capsulatum* (Clemons *et al.*, 2002; Kirkpatrick *et al.*, 2002). En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, ravuconazol había mostrado una CMI de 0.5 µg/ml frente a una cepa de *S. apiospermum*. A partir de estos resultados decidimos ensayar la eficacia *in vivo* del ravuconazol frente a *S. apiospermum*. Para ello desarrollamos un modelo de scedosporiosis sistémica en ratones para ensayar la eficacia de ravuconazol en

comparación con anfotericina B desoxicolato y anfotericina B liposomal (AmBisome). Ravuconazol a dosis de 15, 30 y 50 mg/kg/día no mostró eficacia en incrementar la supervivencia de los animales y la mortalidad de éstos resultó similar a la observada en los animales control. Tampoco la administración de anfotericina B desoxicolato o anfotericina B liposomal (AmBisome®) incrementó significativamente la supervivencia de los animales infectados.

### 5.3.2. Aspergilosis

*Aspergillus fumigatus* es uno de los hongos filamentosos oportunistas más frecuentes y las infecciones que causa presentan una elevada mortalidad (Denning., 1998; Latgé., 1999; Patterson *et al.*, 2000). La anfotericina B y el itraconazol son los antifúngicos de elección para el tratamiento de la aspergilosis, sin embargo el fracaso terapéutico es muy elevado (Denning. 1998). Con las formulaciones lipídicas de la anfotericina B, se ha conseguido incrementar la dosis administrada minimizando los efectos tóxicos de la formulación tradicional aunque tan sólo un porcentaje bajo de pacientes han respondido al tratamiento (menos del 40%) y prácticamente ninguno cuando la infección se había extendido al SNC (Denning, 1996). Las cepas de *A. fumigatus* no presentan una respuesta uniforme a la anfotericina B, siendo en muchos casos resistentes a este polieno (Pfaller *et al.*, 2002a). Se ha sugerido que uno de los mecanismos de resistencia a la anfotericina B consiste en

la modificación cuantitativa y/o cualitativa de los esteroides que componen la membrana fúngica de los hongos (Hamilton-Miller, 1972). Otros autores han indicado que la resistencia a la anfotericina B en *Candida* spp. se produce por disminución en el contenido de ergosterol, reorientación o enmascaramiento del mismo o por sustitución del ergosterol por otros esteroides tales como el 3-hidroxiesteroide o el 3-oxoesteroide (Ghannoum *et al.* 1999). El itraconazol es también ampliamente utilizado como tratamiento de la aspergilosis sistémica. Aunque tradicionalmente se ha administrado oralmente, recientemente se ha desarrollado una nueva formulación para su administración parenteral que permite una mejor distribución tisular del compuesto en los tejidos del huésped. Sin embargo, algunas cepas de *A. fumigatus* han mostrado también resistencia al itraconazol así como a otros azoles (Pfaller *et al.*, 2002a). La nikomicina Z es un antifúngico peptídico que actúa inhibiendo la síntesis de quitina. Este antifúngico es activo *in vitro* frente a gran número de hongos dimórficos, filamentosos y levaduras (Li *et al.*, 2000) e *in vivo* ha demostrado actividad frente a *Candida albicans* (Kim *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Gaughra *et al.*, 1994) *Histoplasma capsulatum* *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis* (Hector *et al.*, 1990; Clemons *et al.*, 1997; Graybill *et al.* 1998; Goldberg *et al.*, 2000). Otro antifúngico de reciente síntesis es la micafungina. Este compuesto actúa inhibiendo la síntesis de glucano, un glúcido fundamental para la integridad de la pared celular de

los hongos. La micafungina ha demostrado actividad *in vitro* frente a un gran número de hongos dematiáceos (Nakai *et al.*, 2002) así como frente a *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. en modelos animales (Petraitis *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2000). Se han obtenido excelentes resultados con micafungina administrada a dosis de 0.25 mg/kg/día en el tratamiento de aspergilosis pulmonar en ratón (Matsumoto *et al.* 2000) así como en el caso de la infección sistémica a dosis de 0.5 mg/kg/día (Ikeda *et al.*, 2000). En la presente tesis, ensayamos la eficacia de anfotericina B, itraconazol y nikomicina Z utilizados separadamente y en combinación con micafungina en un modelo de aspergilosis sistémica en ratones. Los tratamientos con anfotericina B e itraconazol aumentaron de forma significativa la supervivencia de los animales. La micafungina, en cambio, sólo fue efectiva cuando fue administrada a dosis de 10 mg/kg/día sin haberse hallado variaciones significativas en la supervivencia de los ratones tratados con dosis menores. La nikomicina Z, no mostró actividad frente a la aspergilosis. Sin embargo, con la administración conjunta de nikomicina Z y micafungina a dosis sub-óptimas, se consiguió aumentar en un 100% la supervivencia de los animales. La combinación micafungina-nikomicina fue también efectiva en la reducción de UFC en cerebro y riñón. Esta efectividad fue superior a la observada en la monoterapia con anfotericina B, micafungina, nikomicina o itraconazol y que los tratamientos combinados micafungina-anfotericina o micafungina-itraconazol. El efecto sinérgico entre la nikomicina Z y la micafungina u

otros inhibidores del  $\beta$ -glucano frente *A. fumigatus* ya había sido observado con anterioridad en trabajos realizados *in vitro* (Chiou *et al.*, 2001; Stevens, 2000). También se ha demostrado un efecto sinérgico *in vitro* entre anfotericina B y caspofungina, un inhibidor del  $\beta$ -glucano de la misma familia y con la misma diana de acción que la micafungina, frente a *Aspergillus* spp. (Arikan *et al.*, 2002). La elevada eficacia de anfotericina B e itraconazol en nuestro modelo no nos ha permitido valorar los efectos de los mismos en combinación con micafungina. Según nuestra experiencia la micafungina puede ser una opción terapéutica de interés para el tratamiento de la aspergilosis sistémica. Aunque en nuestro caso para obtener los resultados más favorables ha sido necesario utilizar dosis elevadas de micafungina, la opción de utilizar este antifúngico sólo o en combinación debería ser investigada en estudios complementarios.

Tradicionalmente los estudios realizados en modelos animales sobre aspergilosis se han centrado en el tratamiento experimental de la infección en ratón, conejo y cobaya. Para simular las diferentes manifestaciones de la enfermedad los animales se han infectado a través de diferentes vías, siendo las más habituales la intravenosa y la intranasal (Graybill, 2000). Sin embargo, una de las infecciones secundarias más frecuentes en pacientes inmunosuprimidos con aspergilosis invasiva, es la afectación del SNC (Latgé, 1999; Kleinschmidj-DeMasters, 2002). Las infecciones localizadas en el SNC por *A. fumigatus* son de pronóstico muy grave, presentando una

mortalidad próxima al 95% (Denning *et al.*, 1990). La baja biodisponibilidad y limitada distribución en el SNC de los antifúngicos convencionales dificulta la resolución de este tipo de infecciones, aunque en algunos casos la administración de itraconazol o anfotericina B sola o combinada con 5-FU ha mostrado resultados satisfactorios (Kerkmann, 1994; Verweij *et al.*, 1996; Moling *et al.*, 2002). Para poder evaluar las posibilidades terapéuticas que ofrecen los nuevos antifúngicos, era necesario establecer un modelo de aspergilosis cerebral en animales de experimentación. Con este objetivo, desarrollamos dicho modelo, basándonos otros similares de criptococosis y coccidioidomicosis desarrollados con anterioridad (Graybill *et al.*, 1986; Blasi *et al.*, 1992). El modelo cerebral desarrollado es reproducible y nos ha permitido establecer una aspergilosis aguda en ratones. A pesar de que se produjo una diseminación del hongo a otros tejidos, los recuentos de UFC se mantuvieron siempre elevados en cerebro, mientras que en riñón y bazo la carga fúngica disminuyó en días posteriores a la infección. El examen histopatológico reveló la presencia de micro y macro abscesos con focos necróticos y elementos fúngicos en cerebro tal y como se observa en pacientes afectados de aspergilosis cerebral (Medeiros *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2000; Cunha, 2001; Baddley *et al.*, 2002). Nuestro modelo animal puede ser de utilidad para el desarrollo de posteriores estudios para un mejor conocimiento de la aspergilosis cerebral, así como para su tratamiento.

En los pocos casos clínicos documentados en los que se ha resuelto la infección cerebral por *A. fumigatus*, el tratamiento aplicado fue itraconazol o anfotericina B (desoxicolato o liposomal) sola o en combinación con 5-FU. Intentando emular esta situación, utilizamos el modelo de aspergilosis cerebral descrito anteriormente para ensayar la respuesta ante un tratamiento con itraconazol y anfotericina B. Ambos tratamientos resultaron de escasa actividad.

### 5.3.3. Paecilomicosis

Una de las combinaciones de antifúngicos que han demostrado efectos sinérgicos *in vitro* es la de terbinafina con diferentes compuestos azólicos (Meletiadis *et al.*, 2000). La terbinafina es una alilamina ampliamente utilizada de forma tópica para el tratamiento de las dermatomicosis. La administración oral de dicho fármaco también ha sido ensayado en modelos animales de coccidioomicosis con un éxito parcial (Sorensen *et al.*, 2000). Nosotros, en ensayos realizados *in vitro* (resultados no presentados), observamos un potente efecto sinérgico entre la terbinafina y el ravuconazol frente a *Paecilomyces lilacinus*. Posteriormente decidimos ensayar si este efecto podría ser trasladado a un modelo animal. Desarrollamos para ello un modelo letal de infección sistémica por *P. lilacinus* en ratón. Los estudios realizados por otros autores con animales de experimentación han demostrado que ravuconazol alcanza unos niveles séricos y posee un tiempo de vida

medio en suero presumiblemente terapéuticos (Andes *et al.*, 2003) así como una elevada biodisponibilidad (Mikamo, *et al.*, 2002). Este triazol ha sido efectivo en el tratamiento de aspergilosis (Roberts *et al.*, 2000; Kirkpatrick *et al.*, 2002) e histoplasmosis (Clemons *et al.*, 2002) en diferentes modelos animales, sin embargo en el modelo que establecimos no se observaron cambios significativos en el TMS (Resultados 4.3.1.4.). Tampoco se observó un incremento en el TMS de aquellos animales tratados con terbinafina ni en aquellos que recibieron la terapia combinada. Ello puede ser debido al carácter lipofílico de la terbinafina con lo que su biodisponibilidad se reduce a tejido dérmico y anejos (Wilmer y Wollina, 1998).

#### **5.3.4. Fusariosis**

Otro de los hongos filamentosos oportunistas de importancia clínica por su incidencia y dificultad en el tratamiento es *Fusarium*. Aunque se hayan descrito infecciones sistémicas por *F. dimerum*, *F. sacchari* y *F. proliferatum*, entre alguna otra especie, las que más frecuentemente causan infecciones invasoras en humanos son *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* (de Hoog *et al.*, 2000). Aproximadamente la mitad de los casos de fusariosis se deben a *F. solani* y una cuarta parte a cada una de las otras dos especies. *Fusarium* spp. son hongos hialinos usualmente refractarios a los tratamientos antifúngicos. Los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, demostraron que

voriconazol presentaba unas CMI menores que otros azoles frente a algunos aislados de *Fusarium solani* y *Fusarium verticillioides*. Con anterioridad ya se ha expuesto la problemática inherente a la administración de voriconazol a ratones debido a la rápida metabolización de dicho triazol. A partir de éstos datos, decidimos desarrollar un modelo de fusariosis sistémica en cobayas con el fin de observar si la presumible sensibilidad de *Fusarium* spp., observada en los ensayos *in vitro*, podría ser trasladada a un modelo animal. Para ello intentamos desarrollar un modelo animal con varias cepas de *F. solani* y *F. verticillioides* en cobayas inmunosuprimidas. A pesar del elevado inóculo con el que fueron infectados los animales, ninguno de éstos murió en el transcurso del experimento. Tan sólo observamos síntomas de enfermedad entre los días 3 y 7 post-infección en los animales infectados con *F. solani*. A partir del séptimo día, recobraron su aspecto y actividad normales. En aquellos infectados con *F. verticillioides*, no se apreció ningún tipo de afectación. Graybill (Graybill, 2000), en una excelente revisión sobre modelos animales, ya remarcó la imposibilidad de establecer una fusariosis experimental en cobayas. Nuestra experiencia ha servido para confirmar estos resultados.

## **CONCLUSIONES**

1. Sensititre Yeast One<sup>®</sup> ha demostrado ser una técnica rápida y de fácil realización en los ensayos *in vitro* para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos de los dermatofitos. No obstante hemos observado importantes variaciones en los resultados obtenidos que dependían de la especie y del antifúngico ensayado.
2. Albaconazol ha sido uno de los pocos antifúngicos que ha demostrado poseer actividad *in vitro* frente a *Scedosporium prolificans*. Hemos desarrollado un modelo experimental de scedosporiosis sistémica en conejos y hemos demostrado que albaconazol también es eficaz *in vivo* ya que el tratamiento con dicho compuesto resolvió la infección.
3. A pesar de que voriconazol no presenta una buena biodisponibilidad en ratones, hemos demostrado que dicho antifúngico mejoraba significativamente la infección sistémica por *S. apiospermum* en ratones a los que se les suministró zumo de pomelo como bebida única. No se observó, en cambio, eficacia en los tratamientos con ravuconazol, terbinafina, anfotericina B desoxicolato y anfotericina B liposómica.

4. Utilizando un modelo de infección sistémica por *S. apiospermum* en cobayas, desarrollado por nosotros, obtuvimos un 100% de supervivencia al ser tratados con voriconazol, lo que mejoraba claramente los resultados obtenidos con el modelo murino. En estudios de correlación entre las CMI de voriconazol y su eficacia *in vivo*, utilizando el mismo modelo, comprobamos que CMI de 0.5-1  $\mu\text{g/ml}$  serían indicativas de sensibilidad al fármaco y valores de 8  $\mu\text{g/ml}$  de resistencia al mismo.
  
5. Hemos desarrollado un modelo reproducible de aspergilosis cerebral en ratones inmunodeprimidos que emula la infección cerebral por *Aspergillus fumigatus* en humanos.
  
6. Los dos antifúngicos de uso convencional para el tratamiento de la aspergilosis, itraconazol y anfotericina B, no han sido efectivos en la resolución de la aspergilosis cerebral en el modelo que hemos desarrollado.
  
7. A pesar de que los citados antifúngicos, itraconazol y anfotericina B, han demostrado tener actividad *in vivo* frente a la aspergilosis sistémica en ratones, la asociación entre micafungina y nikomicina Z posee un efecto terapéutico superior que los anteriores en la resolución de la infección.

8. Hemos desarrollado un modelo de infección sistémica por *Paecilomyces lilacinus* en ratones para evaluar la eficacia *in vivo* de la terbinafina y el ravuconazol. Dichos compuestos habían demostrado cierta actividad en los ensayos *in vitro*, sin embargo ninguno de ellos ni la combinación de ambos presentó eficacia frente a la infección.
9. No hemos conseguido desarrollar una fusariosis en cobayas a pesar de haber ensayado diferentes inóculos de diferentes especies de *Fusarium* en animales inmunocomprometidos. Ello confirma que las cobayas son resistentes a la infección por *F. solani* y *F. oxysporum* tal como ya habían indicado otros autores.
- 10.

## **REFERENCIAS**

**Aguilar, C., I. Pujol, J. Sala, J. Guarro.** 1998. Antifungal susceptibilities of *Paecilomyces* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1601-1604

**Andes, D., K. Marchillo, T. Stamstad, R. Conklin.** 2003. In vivo pharmacodynamics of a new triazole ravuconazole in a murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1193-1199

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

**Arathoon, E. G., E. Gotuzzo, L. M. Noriega, R. S. Berman, M. J. DiNubile, C. A. Sable.** 2002. Randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:451-457.

**Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, S. Nangia, J. H. Rex.** 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol.* **37**:3946-3951.

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

**Arikan, S., J. H. Rex.** 2001. Nystatin LF (Aronex/Abbott). *Curr. Opin. Investi. Drugs.* **2**:488-495

**Arnou, P. M., M. Sadigh, C. Costas, D. Weil, R. Chudy.** 1991. Endemic and epidemic aspergillosis associated with in hospital replication of *Aspergillus* organisms. *J. Infect. Dis.* **1**:998-1002

**Baddley, J. W., D. Salzman, P. G. Pappas.** 2002. Fungal brain abscess in transplant recipients: epidemiologic, microbiologic and clinical features. *Clin. Transplant.* **16**:419-424

**Bartolí, J., E. Turmo, M. Algueró, E. Boncompte, M. L. Vericat, L. Conte, J. Ramis, M. Merlos, J. García-Rafanell, J. Forn.** 1998. New azole antifungal. 3. Synthesis and antifungal activity of 3-substituted-4 (3H)-quinazolinones. *J. Med. Chem.* **41**:1864-1882

**Basica, J. F., T. S. Graves, M. N. Baz.** 1981. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in corticosteroid dependent asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* **68**:98-102

**Becker, W. K., W. G. Cioffi, A. T. McManus, S. H. Kim, W. F. McManus, A. D. Mason, B. A. Pruitt.** 1991. Fungal burn wound infection, a 10-year experience. *Arch. Surg.* **126**:44-48

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

**Bhat, R. V., P. H. Shetty, R. P. Amruth, R. V. Sudershan.** 1997. A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **35**:249-255

**Bhatia S., J. McCullough, E. H. Perry, M. Clay, N. K. Ramsay, J. P. Neglia.** 1994. Granulocyte transfusions: efficacy in treating fungal infections in neutropenic patients following bone marrow transplantation. *Transfusion*. **34**:226-232

**Bodey, G. P.** 1992. Azole antifungal agents. *Clin. Infect. Dis.* **14**:161-169.

**Bodey, G. P., M. Boktour, S. Mays, M. Duvic, D. Kontoyiannis, R. Hachem, I. Raad.** 2002. Skin lesions associated with *Fusarium* infection, *J. Am. Acad. Dermatol.* **47**:659:666

**Bodey, G. P., S. Vartivarian.** 1989. Aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**:413-437

**Cano, J., J. Guarro, E. Mayayo, J. Fernandez-Ballart.** 1992. Experimental infection with *Scedosporium inflatum* J. Med. Vet. Mycol. 30:413-420

**Carmen Serrano, M., A. Valverde-Conde, M. M. Chávez, S. Bernal, R. M.**

**Claro, J. Pemán, M. Ramírez, E. Martín-Mazuelos.** 2003. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, Ly303366) and amphotericin B against *Aspergillus* spp. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **45**:131-145

**Carrillo-Muñoz, A. J., L. Abarca, G. Quindós.** 2001. Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos. Rev. Iberoam. Micol. **18**:150-155

**Carrillo-Muñoz, A. J., J. Guarro.** 2001. In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:2151-2153

**Carrillo-Muñoz, A. J., J. Pemán, M. Gobernado.** 1999. Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. Rev. Esp. Quimioterap. **12**:181-204

**Carrillo-Muñoz, A. J., J. M. Torres-Rodríguez.** 1993. Influencia del tiempo de incubación en las concentraciones mínimas inhibitorias de cinco antifúngicos. Rev. Esp. Quimioterap. **6**:150-154

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

**Casadevall, A., L. Pirofski.** 2001b. Adjunctive immune therapy for fungal infections. *Vaccine*. **33**:1048-1056

**Castiglioni, B., D. A. Sutton, M. G. Rinaldi, J. Fung, S. Kusne.** 2002. *Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*) infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine*. **81**:333-348

**Castro, L. G., A. Salebian, M. N. Soto.** 1990. Hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant patient and a review of human *Paecilomyces* species infections. *J. Med. Vet. Mycol.* **28**:15-26

**Catalano, L., R. Fontana, N. Scarpato, M. Picardi, S. Rocco, B. Rotoli.** 1997. Combined treatment with amphotericin-B granulocyte transfusion from G-CSF stimulated donors in an aplasic patient with invasive aspergillosis undergoing bone marrow transplantation. *Haematologica*. **82**:71-72

**Chaffin, W. L.** 2002. Host recognition by human fungal pathogens en Fungal pathogenesis. Principles and clinical applications. Ed. Marcel Dekker.

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

**Chen, S. C., M. L. O'Donell, S. Gordon, G. L. Gilbert.** 1996. Antifungal susceptibility testing using the Etest: comparison with the broth macrodilution technique. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**:265-273

**Chiou, C. C., N. Mavrogiorgos, E. Tillem, R. Hector, T. J. Walsh.** 2001. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3310-3321

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

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

**Clemons, K. V., V. L. G. Calich, E. Burger, S. G. Filler, M. Graziutti, J. Murphy, E. Roilides, A. Campa, M. R. Dias, J. E. Edwards, Y. Fu, G. Fernandes-Bordignon, A. brahim, H. Katsifa, C. G. Lampaignere, L. H. Meloni-Bruner, J. Rex, C. Xidieh.** 2000. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med. Mycol.* **38**:99-111

**Clemons, K. V., M. Martinez, L. Calderon, D. A. Stevens.** 2002. Efficacy of ravuconazole in treatment of systemic murine histoplasmosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:922-924

**Clemons, K. V., D. A. Stevens.** 1997. Efficacy of nikkomycin Z against experimental pulmonary blastomycosis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**:2026-2028

**Clemons, K. V., D. A. Stevens.** 2001. Efficacy of ravuconazole in treatment of mucosal candidosis in SCID mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3433-3436

**Cocuroccia, B., J. Gaido, E. Gubinelli, G. Annessi, G. Girolomoni.** 2003. Localized cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Fusarium* species infection in a renal transplant patient. *J. Clin. Microbiol.* **41**:905-907

**Collin, B., C. J. Clancy, M. H. Nguyen.** 1999. Antifungal resistance in non-albicans *Candida* species. *Drug Resist. Update* **2**:9-14

**Colombo, A. L., F. Barchiesi, D. A. McGough, W. Fothergill, M. G. Rinaldi.** 1995a. Evaluation of the Etest system versus a microtitre broth method for antifungal susceptibility testing of yeast against fluconazole and itraconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:93-100

**Colombo, A. L., F. Barchiesi, D. A. McGough, M. G. Rinaldi.** 1995b. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:535-540

**Corrado G., G. Luzi, M. Monaco, P. Martino.** 1998. Use of voriconazole in treatment of *Scedosporium apiospermum* infection: Case report. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1436-1438

**Cremer, G., P. Boiron.** 1996. Epidemiology and biology of *Scedosporium* species. *J. Mycol. Méd.* **6**:165-171

**Cunha, B. A.** 2001. Central nervous system infections in the compromised host: a diagnostic approach. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **15**:567-590

**da Silva, C., E. Porto, J. E. Costa, E. M. Heins-Vaccari, N. Takahashi.** 2002. Tratado de micología médica Icaz. Ediciones Sarvier

**Davey, K. G., A. D. Holmes, E. M. Johnson, A. Szekely, D. W. Warnock.** 1998. Comparative evaluation of fungitest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **36**:926-930

**de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi. Ed. Centralbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili, 2<sup>nd</sup> edition.

**de Hoog, G. S., F. D. Marvin-Sikkema, G. A. Lahpoor, J. C. Gottschall, R. A. Prins, E. Guého.** 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses*. **37**:71-78

**de Hoog, G. S., F. Queiroz-Telles, G. Haase, G. Fernandez-Zeppenfeldt, D. Attili Angelis, A. H. Gerrits Van Den Ende, T. Matos, H. Peltroche-Llacsahuanga, A. A. Pizzirani-Kleiner, J. Rainer, N. Richard-Yegres, V. Vicente, F. Yegres.** 2000. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med. Mycol.* **38**:243-250

**Del Poeta, M., W. A. Schell, J. R. Perfect.** 1997. In vitro antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1835-1836.

**Denning, D. W.** 1996. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **23**:608-615

**Denning, D. W.** 1998. Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **26**:781-805

**Denning, D. W., L. H. Hanson, A. M. Perlman, D. A. Stevens.** 1992. In vitro susceptibility and synergy studies of *Aspergillus* species to conventional and new agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:21-34.

**Denning, D. W., D. A. Stevens.** 1990. Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2,121 published cases. *Rev. Infect. Dis.* **12**:1147-1201

**Denning, D. W., D. A. Stevens.** 1991. Efficacy of cilofungin alone and in combination with amphotericin B in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1329-1333

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

**di Mario, A., S. Sica, P. Salutari, E. Ortu La Barbera, R. Marra, G. Leone.** 1997. Granulocyte colony-stimulating factor-primed leukocyte transfusions in *Candida tropicalis* fungemia in neutropenic patients. *Haematologica.* **82**:362-363

**Dismukes, W. E., G. Cloud, H. A. Gallis, T. M. Kerkering, G. Medoff, P. C. Craven, L. G. Kaplowitz, J. F. Fisher, C. R. Gregg, C. A. Bowles, S. Shadomy, A. M. Stamm, R. B. Diasio, L. Kaufman, S. J. Soong, W. C. Blackwelder, and N. A. I. D. M. S. Group.** 1987. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N. Engl. J. Med.* **317**:334-341.

**Drouhet, E., B. Dupont, P. Ravisse.** 1991. Étude expérimentale d'une souche hautement virulente de *Scedosporium inflatum* isolé d'une arthrite du genou. *J. Mycol. Méd.* **118** :16-20

**Dworzack D. L., R. B. Clark, W. J. Borkowski, D. L. Smith, M. Dykstra, M. P. Pugsley.** 1989. *Pseudallescheria boydii* brain abscess: association with near-drowning and efficacy of high dose, prolonged miconazole therapy in patients with multiple abscesses. *Medicine.* **68**:218-224

**Echevarría, I., C. Barturen, M. J. Renedo, I. F. Trocóniz, M. C. Dios-Viéitez.** 2000. Comparative pharmacokinetics, tissue distributions, and effects on renal function of novel polymeric formulation of amphotericin B and amphotericin B-deoxycholate in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:898-904

**Elewski, B. E.** 1998. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:415-429.

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

**Espinel-Ingroff, A.** 1994. Etest for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **4**:217-220

**Espinel-Ingroff, A.** 2001. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1360-1367

**Espinel-Ingroff, A., M. Bartlett, R. Bowden, N. X. Chin, C. Cooper, A. Fothergill, M. R. McGinnis, P. Menezes, S. A. Meser, P. W. Nelson, F. C. Odds, L. Pasarell, J. Peter, M. A. Pfaller, J. H. Rex, M. G. Rinaldi, G. S. Shankland, T. J. Walsh, I. Weitzman.** 1997. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* **35**:139-143

**Espinel-Ingroff, A., K. Boyle, D. J. Sheehan.** 2001. In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. *Mycopathologia*. **150**:101-115

**Espinel-Ingroff, A., A. Rezusta.** 2002. E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with NCCLS broth microdilution method. *J. Clin. Microbiol.* **6**:2101-2107

**FDA approvals.** 2003. New antimicrobial agents approved by the U.S. food and drug administration in 2002 and new indications for previously approved agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2060-2061.

**Fernández-Torres, B., A. J. Carrillo, E. Martín, A. Del Palacio, M. K. Moore, A. Valverde, M. Serrano, J. Guarro.** 2001. In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2524-2528

**Fernández-Torres, B., A. Carrillo-Muñoz, M. Ortoneda, I. Pujol, F. J. Pastor, J. Guarro.** Interlaboratory evaluation of the Etest® for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Med. Mycol.* **41**:125-130

**Flynn, T. N., S. M. Kelsey, D. L. Hazel, J. F. Guest.** 1999. Cost effectiveness of amphotericin B plus G-CSF compared with amphotericin B monotherapy: treatment of presumed deep-seated fungal infection in neutropenic patients in UK. *Pharmacoeconomics* **16**:543-550

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

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

**Galgiani, J. N.** 1993. Coccidioidomycosis. *West. J. Med.* **159**:153-171.

**Gaughran, J. P., M. H. Lai, D. R. Kirsch, S. J. Silverman.** 1994. Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* **18**:5857-5860

**Gené, J., A. Azón-Masoliver, J. Guarro, G. De Febrer, A. Martínez, C. Grau, M. Ortoneda, F. Ballester.** 2001. Cutaneous infection caused by *Aspergillus ustus*, an emerging opportunistic fungus in immunosuppressed patients. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1134-1136

**Ghannoum, M. A., D. M. Kuhn.** 2002. Voriconazole: better chances for patients with invasive mycoses. *Eur. J. Med. Res.* **31**:242-256

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

**Ghannoum, M. A., L. B. Rice.** 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanism with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:501-517

**Giammanco, G. M., S. Pecorella, S. Distefano, V. Pecorano, M. E. Milici, G. Pizzo.** 2001. Fluconazole susceptibility of italian *Candida dubliniensis*, clinical isolates determined by reference and simplified tests. *New Microbiol.* **24**:397-404

**Girmenia, C., G. Cimino, A. Micozzi, G. Gentile, P. Martino.** 2002. Risk factors for nephrotoxicity associated with conventional amphotericin B therapy. *Am. J. Med.* **113**:351

**Goldberg J., P. Connolly, C. Schnizlein-Bick, M. Durkin, S. Kholer, M. Smedema, E. Brizendine, R. Hector, J. Wheat.** 2000. Comparison of nikkomycin Z with amphotericin B and Itraconazole for treatment of histoplasmosis in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1624-1629

**Gomez, F. J., R. Allendoerfer, G. S. Deepe.** 1995. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. *Infect. Immun.* **63**:2587-2595

**González, C. E., M. G. Rinaldi, A. M. Sugar.** 2002. Zygomycosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **16**:895-914

**González, G. M., R. Tijerina, L. Najvar, M. Rinaldi, I. T. Yeh, J. R. Graybill.** 2002. Experimental murine model of disseminated *Pseudallescheria* infection. *Med. Mycol.* **40**:243-248

**Graybill, J. R.** 2000. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resistance Updates* **3**:364-383

**Graybill, J. R., L. K. Najvar, R. Bocanegra, R. F. Hector, M. F. Luther.** 1998. Efficacy of nikkomycin Z in the treatment of murine histoplasmosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2371-2374

**Graybill, J. R., L. K. Najvar, G. M. Gonzalez, S. Hernandez, R. Bocanegra.** 2003. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **6**:1373-1376

**Graybill, J. R., S. H. Sun, J. Ahrens.** 1986. Treatment of murine coccidioidal meningitis with fluconazole (UK 49,858). *J. Med. Vet. Mycol.* **24**:113-119

**Greig, J. R., M. A. Khan, N. S. Hopkinson, B. G. Marshall, P. O. Wilson, S. U. Arman.** 2001. Pulmonary infection with *Scedosporium prolifican* in an immunocompetent individual. *J. Infect.* **43**:15-17

**Guarro, J., J. Gené.** 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:741-754

**Guarro, J., I. Pujol, C. Aguilar, M. Ortoneda.** 2000. In vitro antifungal susceptibility of nondermatophytic keratinophilic fungi, p. 142-146. In R. K. S. Kushwaha and J. Guarro (ed.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, Spain.

**Guarro, J., I. Pujol, E. Mayayo.** 1999. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1256-1257

**Guarro, J., L. Soler, M. G. Rinaldi.** 1995. Pathogenicity and antifungal susceptibility of *Chaetomium* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:613-618

**Gucalp, R., P. Carlisle, P. Gialanella, S. Mitsudo, J. McKittrick, J. Dutcher.** 1996. *Paecilomyces* sinusitis in an immunocompromised adult patient: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **23**:391-393

**Gumbart, C. H.** 1983. *Pseudallescheria boydii* infection after bone marrow transplantation. *Ann. Int. Med.* **99**:193-194

**Hamilton-Miller, J. M. T.** 1972. Physiological properties of mutagen induced variants of *Candida albicans* resistant to polyene antibiotics. *J. Med. Microbiol.* **5**:425-440

**Hector R. F., B. L. Zimmer, D. Pappagianis.** 1990. Evaluation of nikkomycins X and Z in murine models of coccidioidomycosis, histoplasmosis and blastomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:587-593

**Heim, R.** 1960. Champignons toxiques et hallucinogenes. Ed. N. Boubee & cie.

**Hospenthal, D. R., K. J. Kwon-Chung, J. E. Bennet.** 1998. Concentration of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis. **36**:165-168

**Horré, R., G. S. de Hoog.** 1999. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Studies in Mycology.* **43**:176-193

**Hsieh, S. M. C. C. Hung, M. Y. Chen, P. R. Hsueh, S. C. Chang.** 1998. Efficacy and adverse effects of higher dose amphotericin B monotherapy for cryptococcal meningitis in patients with advanced HIV infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **31**:23-239

**Hubel K., D. C. Dale, A. Engert, W. C. Liles.** 2001. Current status of granulocyte (neutrophil) transfusion therapy for infectious diseases. *J. Infect. Dis.* **183**:321-328

**Ikeda, F., Y. Wakai, S. Matsumoto, K. Maki, E. Watabe, S. Tawara, T. Goto, Y. Watanabe, F. Matsumoto, S. Kuwahara.** 2000. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse model of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:614-618

**Jabado N., J. L. Casanova, E. Haddad, F. Dulieu, J. C. Fournet, B. Dupont, A. Fischer, C. Hennequin, S. Blanche.** 1998. Invasive pulmonary infection due to *Scedosporium apiospermum* in two children with chronic granulomatous disease. *Clin. Infect. Dis.* **27**:1437-1441

**Jahn, B., A. Stüben, S. Bhakdi.** 1996. Colorimetric susceptibility testing for *Aspergillus fumigatus*: comparison of menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide and alamar blue tests. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2039-2041

**Juliano, R., C. W. Grant, K. R. Barber, M. A. Kalp.** 1987. Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes. *Mol. Pharmacol.* **31**:1-11

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

**Kerkmann, M. L., R. Blaschke-Hellmessen, H. D. Mikulin.** 1994. Successful treatment of cerebral aspergillosis by stereotactic operation and antifungal therapy. *Mycoses*. **37**:123-126

**Khoury H., N. J. Ball.** 2003. Disseminated fusariosis in a patient with acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* **120**:1

**Kim, M. K., H. S. Park, C. H. Kim, H. M. Park, W. Choi.** 2002. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast*. **15**:341-349

**Kirkpatrick, W. R., R. K. McAtee, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, T. F. Patterson.** 2000. Efficacy of voriconazole in guinea pig model of disseminated invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2865-2868

**Kirkpatrick, W. R., S. Perea, B. J. Coco, T.F. Patterson.** 2002. Efficacy of ravuconazole (BMS-20717) in a guinea pig model of disseminated aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:353-357

**Kirkpatrick, W. R., S. Perea, B. J. Coco, T.F. Patterson.** 2002. Efficacy of caspofungin alone and in combination with voriconazole in guinea pig model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2564-2568

**Kleinschmidj-DeMasters, B. K.** 2002. Central nervous system aspergillosis: a 20-year retrospective series. *Hum. Pathol.* **33**:116-124

**Kontoyiannis, D. P., R. E. Lewis, G. S. May, N. Osherov, M. G. Rinaldi.** 2002. *Aspergillus nidulans* is frequently resistant to amphotericin B. *Mycoses* **45**:406-407

**Krasinski, K., R. S. Holzman, B. Hanna, M. A. Greco, M. Graff, M. Bhogal.** 1985. Nosocomial fungal infection during hospital renovation. *Infect. Control.* **6**:278-282

**Landau, M., A. Srebrnik, R. Worf, E. Bashi, S. Brenner.** 1992. Systemic ketoconazole treatment for *Fusarium* leg ulcers. *Int. J. Dermatol.* **31**:511-512

**Larson, J. L., T. L. Wallace, R. W. Tyl, M. C. Marr, C. B. Myers, P. A. Cossam.** 2000. The reproductive and developmental toxicity of the antifungal drug Nyotran (liposomal nystatin) in rats and rabbits. *Toxicol. Sci.* **53**:421-429

**Latgé, J. P.** 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:310-350

**Laufer, P., J. N. Fink, W. T. Bruns, G. F. Unger, J. H. Kalbfleisch, P. A. Greenberger, R. Patterson.** 1984. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **73**:44-48

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

**Lentino, L. R., M. A. Rosenkranz, J. A. Michaels, V. P. Kurup, H. D. Rose, M. W. Rytel.** 1982. Nosocomial aspergillosis. A retrospective review of airborne disease secondary to road construction and contaminated air conditioners. *Am. J. Epidemiol.* **116**:430-437

**Li, R. K., M. G. Rinaldi.** 1999. In vitro antifungal activity of nikkomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1401-1405

**Llop, C., I. Pujol, C. Aguilar, J. Sala, D. Riba, J. Guarro.** 2000a. Comparison of three methods of determining MICs for filamentous fungi using different end point criteria and incubation periods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:239-242

**Llop, C., J. Sala, M. D. Sala, J. Guarro.** 2000b. Antimicrobial susceptibility testing of dematiaceous filamentous fungi: Effect of medium composition at different temperatures and times of reading. *Mycopathologia.* **148**:25-31

**Lucca, A. J., T. J. Walsh.** 1999. Antifungal peptides: novel therapeutics compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1-11

**Luna-Herrera, J., G. Martínez-Cabrera, R. Parra-Maldonado, J. A. enciso-Moreno, j. Torres-López, F. Quesada-Pascual, R. Delgadillo-Polanco, S. G. Franzblau.** 2003. Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **22**:21-27

**Lyon, G. M., S. Zurita, J. Casquero, W. Holgado, J. Guevara, M. E. Brandt, S. Douglas, K. Shutt, D. W. Warnock, R. A. Hajjeh.** 2003. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. Clin. Infect. Dis. **36**:34-39

**MacCallum, D. M., F. C. Odds.** 2002. Influence of grapefruit juice on itraconazole plasma levels in mice and guinea pigs. J. Antimicrob. Chemother. **50**:219-224

**Maertens, J., I. Raad, C. A. Sable, A. Ngai, R. Berman, T. F. Patterson, D. Denning, T. Walsh.** 2000. Multicenter, noncomparative study to evaluate safety and efficacy of caspofungin in adults with aspergillosis refractory or intolerant to amphotericin B, amphotericin B lipid formulations, or azoles. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract No. 1103.

**Masiá, M., F. Gutiérrez.** 2002. Antifungal drug resistance and polyenes. Lancet Infect. Dis. **2**:550-563

**Matsumoto, S., Y. Wakai, T. Nakai, K. Hatano, T. Ushitani, F. Ikeda, S. Tawara, T. Goto, F. Matsumoto, S. Kuwahara.** 2000. Efficacy of FK-463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:619-621

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

**Mauceri, A. A., S. I. Cullen, A. G. Vendevelde, J. E. Johnson.** 1974. Flucytosine. An effective oral treatment for chromomycosis. *Arch. Dermatol.* **109**:873-876.

**Mc. Ginnis, M. R.** 1996. Mycetoma. *Dermatol. Clin.* **14**:97-104

**McGinnis, M. R., L. Pasarell, D. A. Sutton, A. W. Fothergill, C. R. Cooper, M. G. Rinaldi.** 1998. In vitro activity of voriconazole against selected fungi. *Med Mycol.* **36**:239-242.

**Medeiros B. C., C. R. Medeiros, B. Werner, J. Z. Neto, G. Lodo, R. Pasquini, L. F. Bleggi-Torres.** 2000. Central nervous system infections following bone marrow transplantation: an autopsy report of 27 cases. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **9**:535-540

**Meletiadis, J., J. F. Meis, G. S. de Hoog, P. E. Verweij.** 2000. In vitro susceptibilities of 11 clinical isolates of *Exophiala* species to six antifungal drugs. *Mycoses*. **43**:309-312

**Meletiadis, J., J. F. Meis, J. W. Mouton, J. L. Rodríguez-Tudela, J. P. Donnelly, P. E. Verweij.** 2002a. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:62-68

**Meletiadis, J., J. W. Mouton, J. F. Meis, B. A. Bouman, P. E. Verweij.** 2002. Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed Standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2876-2885

**Meletiadis, J., J. W. Mouton, J. L. Rodríguez-Tudela, J. F. G. M. Meis, P. E. Verweij.** 2000b. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole against clinical isolates of *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:470-472

**Mikamo, H., X. H. Yin, Y. Hayasaki, Y. Shimamura, K. Uesugi, N. Fukayama, M. Satoh, T. Tamaya.** 2002. Penetration of ravuconazole, a new triazole antifungal, into rat tissues. *Chemotherapy.* **48**:7-9

**Moling, O., C. Lass-Floerl, P. E. Verweij, M. Porte, P. Boiron, M. Prugger, U. Gebert, R. Corradini, C. Vedovelli, G. Rimenti, P. Mian.** 2002. Case reports. Chronic and acute *Aspergillus* meningitis. *Mycoses*. **45**:504-511

**Mora-Duarte, J., R. Betts, R. Rotstein, A. Lopes-Colombo, L. Thompson-Moya, J. Smietana, R. Lupinacci, C. Sable, N. Kartsonis J. Perfect.** 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **347**:2020-9.

**Morace G., G. Amato, F. Bistoni, G. Fadda, P. Marone, M. T. Montagna, S. Oliveri, L. Polonelli, R. Rigoli, I. Mancuso, S. La Face, L. Masucci, L. Romano, C. Napoli, D. Tatò, M. G. Buscena, C. M. Belli, M. M. Piccirillo, S. Conti, S. Covan, F. Fanti, C. Cavanna, F. D'Alò, L. Pitzurra.** 2002. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the national committee for clinical laboratory standards m27-a broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2953-2958

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

**Mousa, H. A., S. M. Al-Bader, D. A. Hassan.** 1999. Correlation between fungi isolated from burn wounds and burn care units. *Burns* **25**:145-147

**Muñoz, P., M. Marín, P. Tornero, P. Martín, M. Rodríguez-Creixéms, E. Bouza.** 2000. Successful treatment of *Scedosporium apiospermum* disseminated infection treated with voriconazole in a patient receiving corticosteroid therapy. Clin. Infect. Dis. **31**:1499-1502

**Nakai, T., J. Uno, M. Miyaji.** 1999. In vitro activity of FK463, a novel antifungal lipopeptide, against clinically important, less common molds and dimorphic fungi. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract No. 1509

**Nakai, T., J. Uno, K. Otomo, F. Ikeda, S. Tawara, T. Goto, K. Nishimura, M. Miyaji.** 2002. In vitro activity of FK463, a novel lipopeptide antifungal agent, against a variety of clinically important molds. Chemotherapy **48**:78-81

**Nesky, M. A., McDougal E. C., Peacock J. E.** 2000. *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis. Clin. Infect. Dis. **31**:673-677

**Nucci, M., E. Anaissie.** 2002. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin. Infect. Dis. **35**:909-920

**Ortoneda M., F. J. Pastor, E. Mayayo, J. Guarro.** 2002. Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model. *J. Med. Microbiol.* **51**:924-928

**Padhye, A. A., W. Kaplan, M. A. Neuman, P. Case, G. N. Radcliffe.** 1984. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Sabouraudia.* **22**:493-500

**Pagano, L., P. Ricci, M. Montillo, A. Cenacchi, A. Nosari, A. Tonso, L. Cudillo, A. Chierchini, C. Savignano, M. Buelli, L. Melillo, E. O. La Barbera, S. Sica, S. Hohaus, A. Bonini, G. Bucaneve, A. del Favero.** 1996. Localitation of aspergillosis to the central nervous system among patients with acute leukemia: report of 14 cases. *Clin. Infect. Dis.* **23**:628-630

**Paphitou, N. I., L. Ostrosky-Zeichner, V. L. Paetznick, J. R. Rodríguez, E. Chen, J. H. Rex.** 2002. In vitro antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:1144-1146

**Pappas, P. G., R. W. Bradsher, C. A. Kauffman, G. A. Cloud, C. J. Thomas, G. D. Campbell, Jr., S. W. Chapman, C. Newman, W. E. Dismukes.** 1997. Treatment of blastomycosis with higher doses of fluconazole. *Clin. Infect. Dis.* **25**:200-205.

**Patterson, T. F., W. R. Kirkpatrick, M. White, J. W. Hiemenz, J. R. Wingard, B. Dupont, M. G. Rinaldi, D. A. Stevens, J. R. Graybill.** 2000. Invasive aspergillosis. *Medicine*. **79**:250-260

**Peintner, U., R. Pöder, T. Pümpel,** 1998. The iceman's fungi. *Mycol. Res.* **102**:1153-1162

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

**Peraica, M., B. Radić, A. Lucić, M. Palović.** 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.* **77**:759-766

**Perfect, J. R., A. Kieren, T. J. Walsh, R. N. Greenberg, B. DuPont, J. de la Torre-Cisneros, G. Just-Nübling, H. T. Schlamm, I. Lutsar, A. Espinel-Ingroff, E. Johnson.** 2003. Voriconazole treatment of less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1122:1131

**Peters C., M. Minkov, S. Matthes-Martin, U. Pötschger, V. Witt, G. Mann, P. Höcker, N. Worel, J. Stary, T. Klingebiel, H. Gardner.** 1999. Leucocyte transfusions from rhG-CSF or prednisolone stimulated donors for treatment of severe infections in immunocompromised neutropenic patients. *Br. J. Haematol.* **106**:689-696

**Petraitis, V., R. Petraitiene, A. H. Groll, K. Roussillon, M. Hemmings, C. A. Lyman, T. Sein, J. Bacher, I. Bekersky, T. J. Walsh.** 2002. Comparative antifungal activities and plasma pharmacokinetics of micafungin (FK463) against disseminated candidiasis and invasive pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1857-1869

**Pfaller, M. A., S. Arikan, M. Lozano-Chiu, Y. Chen, S. Coffman, S. A. Messer, R. Rennie, C. Sand, T. Heffner, J. H. Rex, J. Wang, N. Yamane.** 1998. Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2609-2612

**Pfaller, M. A., S. A Messer, R. J. Hollis, R. N. Jones.** 2002a. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1032-1037

**Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. N. Jones, D. J. Diekema.** 2002b. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrobial Agents Chemother.* **46**:1723-1727

**Pierard-Franchimont G., P. De Doncker, V. Van de Velde, P. Jacqmin, J. E. Arrese, G. E. Pierard.** 1995. Paradoxical response to itraconazole treatment with onychomycosis caused by *Microsporium gypseum*. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. **75**:211-217

**Pinto, A. R., R. Puccia, S. N. Diniz, M. F. Franco, L. R. Travassos.** 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using gp-43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. Vaccine. **18**:3050-3058

**Poza, G., J. Montoya, C. Redondo, J. Ruiz, N. Vila, L. Rodríguez-Tudela, A. Ceron, E. Simarro.** 2000. Meningitis caused by *Pseudallescheria boydii* treated with voriconazole. Clin. Infect. Dis. **30**:981-982

**Proctor A. G., D. W. McKenzie.** 1980. Laboratory control. En: Speller DCE (ed.) Antifungal Quimiotherapy. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, England. 407-436.

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

**Ramani, R., V. Chaturvedi.** 2003. Proficiency testing program for clinical laboratories performing antifungal susceptibility testing of pathogenic yeast species. J. Clin. Microbiol. **41**:1143-1146

**Ramaswamy, M., T. L. Wallace, P. A. Cossum, K. M. Wasan.** 1999. Species differences in the proportion of plasma lipoprotein lipid carried by high-density lipoproteins influence the distribution of free and liposomal nystatin in human, dog, and rat plasma. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1424-1428

**Ramos, G., M. Cuenca-Estrella, A. Monzón, J. L. Rodríguez-Tudela.** 1999. In-vitro comparative activity of UR-9825, itraconazole and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:283-286

**Räz, B., M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, R. Brun.** 1997. The alamar blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*) in vitro. *Acta Trop.* **68**:139-147

**Rex, J. H., M. A. Pfaller, G. M. Rinaldi, A. Polak, N. Galgiani.** 1993. Antifungal susceptibility testing. *Microbiol. Rev.* **6**:367-381

**Rex, J. H., M. A. Pfaller, T. J. Walsh, V. Chaturvedi, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, L. L. Gosey, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, D. J. Sheehan, D. W. Warnock.** 2001. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin. Microb. rev.* **14**:643-658

**Roberts, J., K. Schock, S. Marino, V. T. Andriole.** 2000. Efficacies of two new antifungal agents, the triazole ravuconazole and the echinocandin LY-30336, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3381-3388

**Rodríguez-Adrian, L. J., M. L. Graziutti, J. H. Rex., E. J. Anaisse.** 1998. The potential role of cytokine therapy for fungal infections in patients with cancer: is recovery from neutropenia all that is needed? *Clin. Infect. Dis.* **26**:1270-1278

**Rubin, M. A., K. C. Carroll, B. C. Cahill.** 2002. Caspofungin in combination with itraconazole for the treatment of invasive aspergillosis in humans. *Clin. Infect. Dis.* **34**:1160-1161

**Saag, M. S., W. E. Dismukes.** 1988. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1-8

**Sarubbi, F. A., H. B. Kopf, M. B. Wilson, M. R. McGinnis, W. A. Rutala.** 1982. Increased recovery of *Aspergillus flavus* from respiratory specimens during hospital construction. *Am. Rev. Respir. Dis.* **125**:33-38

**Serrano, M. C., A. Valverde-Conde, M. M. Chávez, S. Bernal, R. M. Claro, J. Pemán, M. Ramírez, E. Martín-Mazuelos.** 2003. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Diagn Microbiol. Infect. Dis.* **45**:131-135

**Sharma N. L., V. Mahajan, R. C. Sharma, A. Sharma.** 2002. Subcutaneous pheohyphomycosis in india- a case report and review. *Int. J. Dermatol.* **41**:16-20

**Sheehan, D. J., C. A. Hitchcock, and C. M. Sibley.** 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:40-79.

**Singh, N., S. Husain.** 2000. Infections of the central nervous system in transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* **2**:101-111

**Smith, K. J., R. C. Neafie, H. G. Skelton, T. L. Barrett, J. H. Graham, G. P. Lupton.** 1991. Majocchi's granuloma. *J. Cutan. Pathol.* **18**:28-35

**Sorensen, K. N., R. A. Sobel, K. V. Clemons, L. Calderon, K. J. Plomarz, R. Irani, D. Pappagianis, P. L. Willians, D. A. Stevens.** 2000. Comparative efficacies of terbinafine and fluconazole in treatment of experimental coccidioidal meningitis in a rabbit model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3087-3091

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

**Spilker, B. A.** 2000. The drug development and approval process. PhRMA Industry Profile.

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

**Stevens, D. A.** 2000. Drug interaction studies of a glucan synthase inhibitor (LY 303366) and a chitin synthase inhibitor (nikkomycin Z) for inhibition and killing of fungal pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2547-2548

**Stevens, D. A., L. Calderon, M. Martínez, K. V. Clemons, S. J. Wilson, C. P. Selitrennikoff.** 2002. Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida* vaginitis model. *J. Animicrob. Chemother.* **50**:361-364

**Stevens, D. A., V. L. Kan, M. A. Judson, V. A. Morrison, S. Dummer, D. W. Denning, J. E. Bennett, T. J. Walsh, T. F. Patterson, G. A. Pankey.** 2000. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin. Infect. Dis.* **30**:696-709

**Subramanyam, V. R., C. C. Rath, M. Mishra, G. P. Chhotrai.** 1993. Subcutaneous infection due to *Curvularia* species. *Mycoses.* **36**:449-450

**Sugar A. M., X. P. Liu.** 2000. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Medical mycology* **38**:209-212

**Sugar A. M., X. P. Liu.** 2001. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:601-604

**Sungkanuparph, S., R. Prachartam, A. Thakkinstian, B. Buabut, W. Kiatatchasai.** 2002. Correlation between susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by microtiter plate alamar blue assay and clinical outcomes. *J. Med. Assoc. Thai.* **85**:820-824

**Sutton, D. A., S. E. Sanche, S. G. Revankar, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi.** 1999. In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J Clin Microbiol.* **37**:2343-2345.

**Szekely, A., E. M. Johnson, D. W. Warnock.** 1999. Comparison of E-Test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1480-1483

**Talbot, G. H., A. Huang, M. Provencher.** 1991. Invasive *Aspergillus* rhinosinusitis in patients with acute leukemia. *Rev. Infect. Dis.* **13**:219-232

**Thitithanyanont, A., L. Mendoza, A. Chuansumrit, R. Prachartam, J. Laothamatas, B. Sathapatayayongs, S. Lolekha, L. Ajello.** 1998. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. Clin. Infect. Dis. **27**:1394-1400

**Thomas, P. A.** 1994. Mycotic keratitis – an underestimated mycosis. J. Med. Vet. Mycol. **32**:235-236

**Tiballi, R. N., X. He, L. T. Zarins, S. G. Revankar, C. A. Kauffman.** 1995. Use of a colorimetric system for yeast susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. **33**:915-917

**To, W. K., A. W. Forthergill, M. G. Rinaldi.** 1995. Comparative evaluation of macrodilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. J. Clin. Microbiol. **33**:2660-2664

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

**VandenBergh, M. F. Q., P. E. Verweij, A. Voss.** 1999. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **34**:221-227

**Van Der Coer, J. M., H. A. Marres, E. W. Wielinga, L. S. Wong-Alcalá.** Rhinosporidiosis in Europe. 1992. J. Laryngol. Otol. **106**:440-443

**Verweij, P. E., J. P. Donnelly, J. F. Meis.** 1996. High-dose itraconazole for the treatment of cerebral aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **23**:1196-1197

**Villanueva, A., E. G. Arathoon, E. Gotuzzo, R. S. Berman, M. J. DiNubile, C. A. Sable.** 2001. A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis. *Clin Infect Dis.* **33**:1529-1535.

**Vismer, H. F., W. F. Marasas, J. P. Rheeder, J. J. Loubert.** 2002. *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infection. *Med. Mycol.* **40**:399-406

**Walsh, T. J., J. L. Goodman, P. Pappas, I. Bekersky, D. N. Buell, M. Roden, J. Barrett, E. J. Anaissie.** 2001. Safety, Tolerance, and Pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3487-3496

**Walsh, T. J., I. Lutsar, T. Driscoll, B. Dupont, M. Roden, P. Ghahramani, M. Hodges, A. H. Groll, J. R. Perfect.** 2002. Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**:240-248

**Walsh, T. J., J. Peter, D. A. McGough, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, P. A. Pizzo.** 1995. Activities of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudallescheria boydii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1361-1364

**Walsh, M., L. White, K. Atkinson, A. Enno.** 1992. Fungal *Pseudallescheria boydii* lung infiltrates unresponsive to amphotericin B in leukaemic patients. *Aust. N. Z. J. Med.* **22**:265-8.

**Whesler, M. S., M. R. McGinnis, W. A. Schell, O. H. Walker.** 1982. *Fusarium* infections in burned patients. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**:177-186

**Wheat, J., S. MaWhinney, R. Hafner, D. McKinsey, D. Chen, A. Korzun, K. J. Shakan, P. Johnson, R. Hamill, D. Bamberger, P. Pappas, J. Stansell, S. Koletar, K. Squires, R. A. Larsen, T. Cheung, N. Hyslop, K. K. Lai, D. Schneider, C. Kauffman, M. Saag, W. Dismukes, W. Powderly.** 1997. Treatment of histoplasmosis with fluconazole in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* **103**:223-232.

**Willinger B., E. Engelmann, H. Hofmann, S. Metzger, P. Apfalter, A. M. Hirschl, A. M. Makristathis, M. Rotter, B. Raddaz, M. Seibold.** 2002. Multicenter comparison of Fungitest for susceptibility testing of *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**:253-257

**Wilmer, A., U. Wollina.** 1998. Systemische terbinafin-therapie von dermatophyosen im kindesalter. *Mycoses.* **41**:54-57

**Witthuhn F., D. Toubas, I. Béguinot, D. Aubert, C. Rouger, G. Remy, J. M. Pinon.** 1999. Evaluation of the fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infected patients: study of azole drug susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* **37**:864-866

**Wong, L. P., P. C. Woo, A. Y. Wu, K. Y. Yuen.** 2002. DNA immunization using a secreted cell wall antigen Mp1p is protective against *Penicillium marneffe* infection. *Vaccine.* **20**:2878-2886

**Wüthrich, M., H. I. Filutowicz, B. S. Klein.** 2000. Mutation of the WI-1 gene yields an attenuated *Blastomyces dermatitidis* strain that induces host resistance. *J. Clin. Invest.* **106**:1381-1389

**Yamaguchi, H., K. Uchida, K. Nagino, T. Matsunaga.** 2002. Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole. *J. Infect. Chemother.* **8**:374-377

**Yamazumi, T., M. A. Pfaller, S. A. Messer, A. Houston, R. J. Hollis, R. N. Jones.** 2000. In vitro activities of ravuconazole (BMS-207147) against 541 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2883-2886