

Efficacy of Liposomal Amphotericin B in Treatment of Systemic Murine Fusariosis

Montserrat Ortoneda,¹ Javier Capilla,¹ Francisco J. Pastor,¹ Isabel Pujol,² and Josep Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut and Institut d'Estudis Avançats,¹ and Laboratori de Microbiologia, Hospital Universitari de Sant Joan de Reus,² Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Spain

Received 28 January 2002/Returned for modification 6 March 2002/Accepted 12 April 2002

We have compared the activities of liposomal amphotericin B (LAMB) at 3, 5, 10, and 20 mg/kg/day and amphotericin B deoxycholate (AMB) at 1.5 and 2.5 mg/kg/day in a murine systemic infection by *Fusarium verticillioides*. Survival was improved by all treatments except AMB at 1.5 mg/kg/day. The tissue burden in liver was reduced by LAMB at all dosages and by AMB at 2.5 mg/kg/day. The two highest dosages of LAMB showed significant reductions in the spleen.

Fusarium species are common soil saprophytes and plant pathogens which have also frequently been reported as etiologic agents of opportunistic infections in humans (3, 9). The increasing number of severe cases reported and the resistance to available antifungal drugs explain the clinical interest in these fungi. *Fusarium verticillioides* is, after *Fusarium solani*, the most common species causing fusariosis, which involves multiple organs, such as the liver, lung, kidney, heart, spleen, and pancreas, with a high mortality rate (8, 9, 21, 22, 25, 27). To date, 15 cases of disseminated human infection by *F. verticillioides* have been reported, and more than 60% of them have shown a fatal outcome despite antifungal treatment (7, 9, 10, 17). However, it is possible that the real incidence of this species is underestimated because, unfortunately, in an important number of the published cases the etiological agent has not been identified to the species level. Amphotericin B (AMB), the standard antifungal therapy, is frequently ineffective and can cause important secondary effects. Other drugs, such as flucytosine, ketoconazole, and miconazole, have also been used, all of them showing a very low efficacy (22, 24). Combinations of AMB with flucytosine (5, 21), ketoconazole (19), and rifampin (8, 13) have also been used, again with poor results. Unfortunately, the novel antifungals such as posaconazole, LY303366, nikkomycin Z, FK-463, and caspofungin do not seem to offer better chances of success (2, 6, 14, 23). Interestingly, one case of disseminated infection by *F. verticillioides* in a patient with acute lymphoblastic leukemia was resolved by using liposomal amphotericin B (LAMB) at 3 mg/kg/day after the failure of AMB (4). LAMB has demonstrated efficacy against infections produced by filamentous fungi (12, 15, 16). Due to the poor activity of AMB in vitro (20) and in vivo against *F. verticillioides* and the scarce data on the clinical use of LAMB in fusariosis, we have evaluated the efficacy of this drug in a murine model of disseminated infection by such fungus.

We used the clinical isolate FMR 4382. The in vitro AMB MIC against this strain was 4 µg/ml. The inoculum was pre-

pared as described previously (18). AMB (Fungizona; Squibb Industria Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain) and LAMB (AmBisome; Gilead Sciences S.A., Madrid, Spain) were reconstituted with sterile distilled water and further diluted in 5% sterile dextrose solution to reach the desired concentrations. OF-1 male mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) weighing 30 g were used. Conditions were approved by the Animal Welfare Committee of the Faculty of Medicine of our university. Groups of 10 animals were infected by the intravenous (i.v.) inoculation of 0.2 ml of the conidial suspension via the lateral tail vein. In a preliminary study, five different inocula (2.5×10^6 , 2.5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , and 1×10^9 conidia/ml) were tested. Treatments started 24 h postchallenge and continued for 10 days. Seven groups were established. AMB at 1.5 and 2.5 mg/kg/day was administered intraperitoneally, because doses higher than 1 mg/kg/day have shown to be toxic when administered i.v. The control group received 0.2 ml of 5% dextrose solution i.v. Surviving mice were sacrificed by an overdose of halotane on day 11. Liver, spleen, and kidneys were aseptically removed and homogenized in 1 ml of sterile saline solution. Five 10-fold serial dilutions of this homogenate were made with sterile saline. Volumes of 0.1 and 0.5 ml of the homogenate and 0.1 ml of each dilution were inoculated onto potato dextrose agar plates and incubated at 30°C for 3 days. The mean survival time (MST) was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. *P* values were corrected for multiple comparisons. Colony counts were analyzed by analysis of variance. Statistical significance was declared when the *P* value was <0.05. Calculations were performed with SPSS for Windows version 10.0.

In the preliminary study, all of the mice infected with 2.5×10^6 , 2.5×10^7 , 1×10^8 , or 5×10^8 conidia/ml survived (data not shown). Mice in the groups inoculated with the three lowest inocula did not show the typical external signs associated with disseminated fusarial infections. Approximately 50% of the mice in the group infected with 5×10^8 conidia/ml showed these symptoms, and a high number of *F. verticillioides* CFU were recovered from their kidneys. However, this inoculum was not useful for evaluating the mortality rate of the animals. By contrast, approximately 50% of the mice died within a few minutes after challenge with the highest inoculum

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

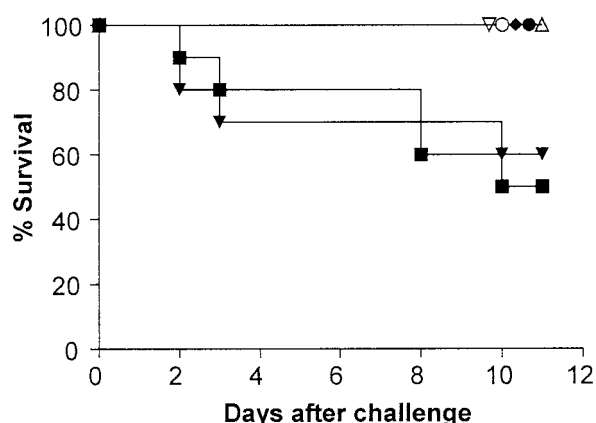


FIG. 1. Survival curve for groups of 10 mice infected with *F. verticillioides* and treated with AMB at 1.5 mg/kg/day (▼), AMB at 2.5 mg/kg/day (●), LAMB at 3 mg/kg/day (▽), LAMB at 5 mg/kg/day (◆), LAMB at 10 mg/kg/day (▲), or LAMB at 20 mg/kg/day (○) or untreated as a control (■).

(1×10^9 conidia/ml). This was probably due to embolisms caused by the high density of the conidial suspension. However, when this inoculum was halved and administered at an interval of 15 min, mortality was prevented in the first 24 h, and it was 50% after 11 days. All of the mice infected with 1×10^9 conidia/ml developed the typical external signs of the infection. A high number of fungal colonies were recovered from the dead animals. Similar results were obtained in repeated experiments (data not shown). *Fusarium* spp., like many other opportunistic fungi, have a weak virulence for immunocompetent animals, including human beings. In our study we have confirmed this by observing that inocula as high as 1×10^8 and 5×10^8 conidia/ml were unable to kill the animals tested. Only the suspension of 1×10^9 conidia/ml caused an infection with an important degree of mortality. Otherwise, clinical data show that once these fungi infect immunocompromised patients, their effects can be devastating (3, 9).

The results of the different treatments on the survival of mice infected with *F. verticillioides* are shown in Fig. 1. The results for treatment with AMB at 1.5 mg/kg/day (MST = 8.30 days, with 60% survival) were not statistically different from those for the control (MST = 8.60 days, with 50% survival), with deaths occurring from days 2 to 10 in both cases. All mice receiving LAMB at any dose or AMB at 2.5 mg/kg/day survived to the end of the experiment (day 11) and had a significantly higher MST ($P = 0.035$) than those in the control group.

Liver, spleen, and kidneys of mice from the control group sacrificed on day 11 showed high concentrations of CFU per gram (Table 1). None of the treatments was able to reduce colony counts in kidneys. AMB at 1.5 mg/kg/day was not able to reduce colony counts in any of the studied organs. In the liver, AMB at 2.5 mg/kg/day reduced the tissue burden significantly compared to the control ($P = 0.039$). Mice in groups treated with LAMB at 3, 5, 10, or 20 mg/kg/day all showed significantly lower counts than those treated with the control or AMB at either dosage ($P \leq 0.001$). In the spleen, only the highest dosages of LAMB (10 and 20 mg/kg/day) showed a significant reduction in colony counts ($P \leq 0.011$).

In our study, AMB at the usual dosage was clearly ineffec-

TABLE 1. Effects of treatment on colony counts of *F. verticillioides* in liver, spleen, and kidney

Treatment (concn [mg/kg])	Mean log ₁₀ CFU/g of tissue (95% CI ^a)		
	Liver	Spleen	Kidney
Control	4.8 (4.5–5.0)	5.7 (4.9–6.4)	3.5 (2.9–4.1)
AMB (1.5)	4.2 (3.7–4.7)	5.4 (5.1–5.7)	3.7 (3.4–4.0)
AMB (2.5)	3.9 (3.2–4.7) ^b	5.3 (4.6–6.0)	3.7 (3.5–4.0)
LAMB (3)	2.5 (1.9–3.2) ^c	4.5 (3.4–5.6)	4.0 (3.1–4.8)
LAMB (5)	2.7 (2.3–3.1) ^c	4.5 (3.5–5.4)	3.7 (3.3–4.0)
LAMB (10)	2.3 (1.4–3.1) ^c	3.2 (2.4–4.0) ^d	3.4 (2.9–4.0)
LAMB (20)	2.4 (1.9–2.8) ^c	3.3 (2.6–4.1) ^d	3.4 (3.1–3.6)

^a CI, confidence interval.

^b $P < 0.05$ versus control; $P < 0.001$ versus LAMB at 3, 5, 10, or 20 mg/kg.

^c $P < 0.001$ versus control or AMB at 1.5 or 2.5 mg/kg.

^d $P < 0.01$ versus control or AMB at 1.5 or 2.5 mg/kg.

tive, a finding which agrees with those of other animal studies performed previously (1, 11). Only at 2.5 mg/kg/day did it improve mouse survival and reduce colony counts in liver. However, this high dosage is not recommended in the clinical setting due to its remarkable nephrotoxicity. The high dosages of LAMB used in our study showed no apparent signs of toxicity for the animals. This agrees with the results of Walsh et al., who administered high doses of LAMB (7.5 to 15 mg/kg/day) to patients with proven or suspected fungal infection for a long period (up to 100 days) with no dosage-related increase in toxicity (26). These high dosages, even though they can increase the economic cost of the treatment, are an option worth considering because of their therapeutic effectiveness and the absence of adverse effects. Although more studies are needed to confirm these aspects and to recommend discontinuing the use of AMB at high dosages because of its toxicity, LAMB at high dosages might be a good option in the treatment of refractory fusariosis caused by this species.

This work was supported in part by a grant from Gilead Sciences, S.A., Madrid, Spain.

We thank A. Moreno and C. Sanmartí for their technical assistance.

REFERENCES

- Anaissie, E. J., R. Hachem, C. Legrand, P. Legenne, P. Nelson, and G. P. Bodey. 1992. Lack of activity of amphotericin B in systemic murine fusarial infection. *J. Infect. Dis.* **165**:1155–1157.
- Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, and J. H. Rex. 2001. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:327–330.
- Boutati, E. I., and E. J. Anaissie. 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* **90**:999–1008.
- Cofrancesco, E., C. Boschetti, M. A. Viviani, C. Bargiggia, A. M. Tortorano, M. Cortellaro, and C. Zanussi. 1992. Efficacy of liposomal amphotericin B (AmBisome) in the eradication of *Fusarium* infection in a leukaemic patient. *Haematologica* **77**:280–283.
- Datry, A., V. Leblond, C. Feger, J. Gabarre, E. Gueho, G. Lesco, M. Danis, J. L. Binet, and M. Gentilini. 1988. A propos de 3 cas de mycose a *Fusarium* sp. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.* **17**:137–142.
- Espinel-Ingroff, A. 1998. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2950–2956.
- Freidank, H. 1995. Hyalohyphomycoses due to *Fusarium* spp.—two case reports and review of the literature. *Mycoses* **38**:69–74.
- Gamis, A. S., T. Gudnason, G. S. Giebink, and N. K. C. Ramsay. 1991. Disseminated infection with *Fusarium* in recipients of bone marrow transplants. *Rev. Infect. Dis.* **13**:1077–1088.
- Guarro, J., and J. Gené. 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:741–754.
- Guarro, J., M. Nucci, T. Akiti, and J. Gene. 2000. Mixed infection caused by

- two species of *Fusarium* in a human immunodeficiency virus-positive patient. J. Clin. Microbiol. **38**:3460–3462.
11. **Guarro, J., I. Pujol, and E. Mayayo.** 1999. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:1256–1257.
 12. **Hay, R. J.** 1994. Liposomal amphotericin B, AmBisome. J. Infect. **28**(Suppl. 1):35–43.
 13. **June, C. H., P. G. Beatty, H. M. Shulman, and M. G. Rinaldi.** 1986. Disseminated *Fusarium moniliforme* infection after allogeneic marrow transplantation. South. Med. J. **79**:513–515.
 14. **Li, R. K., and M. G. Rinaldi.** 1999. In vitro antifungal activity of nikkomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:1401–1405.
 15. **Lopez-Berestein, G., G. P. Bodey, V. Fainstein, M. Keating, L. S. Frankel, B. Zeluff, L. Gentry, and K. Mehta.** 1989. Treatment of systemic fungal infections with liposomal amphotericin B. Arch. Intern. Med. **149**:2533–2536.
 16. **Mills, W., R. Chopra, D. C. Linch, and A. H. Goldstone.** 1994. Liposomal amphotericin B in the treatment of fungal infections in neutropenic patients: a single-centre experience of 133 episodes in 116 patients. Br. J. Haematol. **86**:754–760.
 17. **Okada, H., S. Hatmani, M. Kondo, T. Imai, S. Itoh, K. Isobe, and S. Onishi.** 2000. Successful treatment of disseminated *Fusarium* infection in an infant with leukemia. Int. J. Haematol. **72**:494–498.
 18. **Ortoneda, M., J. Capilla, I. Pujol, F. J. Pastor, E. Mayayo, J. Fernández-Ballart, and J. Guarro.** 2002. Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. J. Antimicrob. Chemother. **49**:525–529.
 19. **Poirot, J. L., J. P. Laporte, E. Guého, F. Tessier, A. Verny, M. Marteau, P. Roux, and G. Duhamel.** 1985. A propos d'un cas de mycose profonde à *Fusarium verticillioides*. Med. Maladies Infect. **10**:529–532.
 20. **Pujol, I., J. Guarro, J. Gene, and J. Sala.** 1997. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. J. Antimicrob. Chemother. **39**:163–167.
 21. **Rabodonirira, M., M. A. Piens, M. F. Monier, E. Guého, D. Fièvre, and M. Mojon.** 1994. *Fusarium* infections in immunocompromised patients: case reports and literature review. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **13**:152–161.
 22. **Richardson, S. E., R. M. Bannatyne, R. C. Summerbell, J. Milliken, R. Gold, and S. S. Weitzman.** 1998. Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host. Rev. Infect. Dis. **10**:1171–1181.
 23. **Tawara, S., F. Ikeda, K. Maki, Y. Morishita, K. Otomo, N. Teratani, T. Goto, M. Tomishima, H. Ohki, A. Yamada, K. Kawabata, H. Takasugi, K. Sakane, H. Tanaka, F. Matsumoto, and S. Kuwahara.** 2000. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:57–62.
 24. **Veglia, K. S., and V. J. Marks.** 1987. *Fusarium* as a pathogen. A case report of *Fusarium* sepsis and review of the literature. J. Am. Acad. Dermatol. **16**:260–263.
 25. **Viscoli, C., E. Castagnola, C. Moroni, A. Garaventa, G. Manno, and C. Savioli.** 1990. Infection with *Fusarium* species in two children with neuroblastoma. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **9**:773–776.
 26. **Walsh, T. J., J. L. Goodman, P. Pappas, I. Bekersky, D. N. Buell, M. Roden, J. Barrett, and E. J. Anaissie.** 2001. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:3487–3496.
 27. **Young, N. A., K. J. Kwon-Chung, T. T. Kubota, A. E. Jennings, and R. I. Fisher.** 1978. Disseminated infection by *Fusarium moniliforme* during treatment for malignant lymphoma. J. Clin. Microbiol. **7**:589–594.

In vitro interactions of licensed and novel antifungal drugs against *Fusarium* spp

Montserrat Ortoneda^a, Javier Capilla^a, F. Javier Pastor^a, Isabel Pujol^b, Josep Guarro^{a,*}

^aUnitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

^bLaboratori de Microbiologia, Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

Received 25 April 2003; received in revised form 27 August 2003

Abstract

We have studied the in vitro interactions of amphotericin B (AMB) with terbinafine (TBF), itraconazole, voriconazole (VCZ), albaconazole, and ravuconazole (RVZ), as well as TBF combined with the same azoles, against 11 isolates of *Fusarium* spp. using the fractional inhibitory concentration index. The highest percentage of synergistic interactions was observed for the combinations AMB-RVZ, TBF-VCZ, and TBF-RCZ. © 2003 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Fusarium spp. are opportunistic filamentous fungi that cause severe infections in humans, particularly in patients with hematologic malignancies or hematopoietic stem cell transplant recipients (Guarro and Gené, 1995; Boutati and Anaissie, 1997; Pontón et al., 2000). *F. solani*, *F. oxysporum*, and *F. verticillioides* are the species of this genus most frequently found in disseminated infections (Guarro and Gené, 1995). These fungi show in vitro and in vivo resistance to practically all the available antifungal drugs. Despite its nephrotoxicity and its low efficacy, amphotericin B (AMB) is still the drug of choice for the clinical treatment of fusariosis (Boutati and Anaissie, 1997). Unfortunately, the novel antifungal agents tested have not proved to be more active in vitro (Capilla et al., 2001; Espinel-Ingroff, 2001; Pfaller et al., 2002), and there is little clinical experience with them (Ernst, 2001). In the last 2 years, there has been an increasing tendency to determine the in vitro activity of combinations of drugs against opportunistic fungi (Ryder and Leitner, 2001; Sugar, 2001; Perea et al., 2002; Meletiadiis et al., 2003). Only the interactions AMB-caspofungin and nikkomycin-FK463 have been investigated against *Fusarium* spp. (Chiou et al., 2001; Arikan et al., 2002).

In this study, we evaluated the in vitro interaction of 6 antifungal drugs in pair combinations against 11 strains of *Fusarium* spp.

Eleven clinical isolates of *Fusarium* spp. (five isolates of *Fusarium solani*, three isolates of *F. verticillioides*, and three isolates of *F. oxysporum*) were tested. *Paecilomyces variotii* ATCC 36257 was included in each batch of tests as a reference strain to ensure quality control. The isolates were stored in potato dextrose agar (PDA) slants covered with paraffin oil, subcultured on PDA plates, and incubated at 30°C for 7 to 10 days.

Antifungal agents were obtained as pure powders. AMB (USP, Rockville, MD), itraconazole (ITZ) (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), voriconazole (VCZ) (Pfizer Inc., Madrid, Spain), albaconazole (ABZ) (J. Uriach & Cía., Barcelona, Spain), ravuconazole (RVZ) (Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, NJ), and terbinafine (TBF) (Novartis, Basel, Switzerland) were dissolved in DMSO and diluted in RPMI 1640 buffered with MOPS.

Inocula were prepared by scraping the surface of the fungal colonies from the agar plates with a loop and suspending them in sterile saline solution. The suspensions were then filtered through sterile gauze to remove hyphae. The filtrates were vortexed and adjusted with a spectrophotometer to 68–70% transmittance at 530 nm. The final inoculum sizes ranged from 0.4 to 3×10^4 conidia/ml verified by plating serial dilutions on PDA plates.

Drug interactions were assessed by a checkerboard design to provide a matrix of all possible dose combinations of the paired drugs within the required concentration range. Each microplate included single-drug minimum inhibitory concentration (MIC) determinations, performed using the

* Corresponding author. Tel.: +977-759359; fax: +977-759322.
E-mail address: umb@fmcs.urv.es (J. Guarro).

Table 1
Distribution of the FICI values for the three species of *Fusarium* tested

	<i>F. solani</i> (5 ^a)			<i>F. verticillioides</i> (3)			<i>F. oxysporum</i> (3)			All isolates (11)		
	S ^b	A	I	S	A	I	S	A	I	S	A	I
AMB/ITZ ^c	3	2	0	0	3	0	1	2	0	4	7	0
AMB/VCZ	0	4	1	1	2	0	2	1	0	3	7	1
AMB/ABZ	0	4	1	0	3	0	0	3	0	0	10	1
AMB/RVZ	2	3	0	3	0	0	1	2	0	6	5	0
AMB/TBF	1	3	1	0	3	0	2	1	0	3	7	1
TBF/ITZ	0	0	5	2	1	0	2	1	0	4	2	5
TBF/VCZ	2	2	1	3	0	0	3	0	0	8	2	1
TBF/ABZ	0	0	5	3	0	0	2	1	0	5	1	5
TBF/RVZ	3	2	0	3	0	0	3	0	0	9	2	0

^a number of strains tested.

^b S, synergistic; A, additive or subadditive; I, indifferent.

^c AMB, amphotericin B; ITZ, itraconazole; VCZ, voriconazole; ABZ, albaconazole; RVZ, ravuconazole and TBF, terbinafine.

parameters outlined in the NCCLS guidelines (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002), to minimize variations. AMB and TBF were placed in the rows of the trays with final concentrations that ranged from 0.125 to 8 and 0.5 to 32 mg/L, respectively. Azoles were placed in the columns of the trays with final concentrations that ranged from 0.03 to 16 mg/L. When AMB and TBF were tested in combination, TBF was placed in the columns with a final concentration that ranged from 0.06 to 32 mg/L. The MIC of all drugs was defined as the lowest drug concentration that produced 100% inhibition of visible fungal growth after 48 h of incubation at 35°C. No trailing endpoints were observed for any of the drugs. For purposes of calculation, off-scale MIC values were converted to the next higher dilution.

The nature of the interaction between two drugs was defined by means of the fractional inhibitory concentration index (FICI), which was calculated using the following formula: $FICI = MIC_A^{comb}/MIC_A^{alone} + MIC_B^{comb}/MIC_B^{alone}$, and rounded to the nearest 0.1 unit. We defined the interaction as synergistic if $FICI < 1$, additive if $FICI = 1$, subadditive if between 1 and 2, indifferent if $FICI = 2$, and antagonistic if $FICI > 2$ (Perea et al., 2002).

For all the species, AMB when tested alone showed a MIC₉₀ (MIC value at which 90% of the isolates of *Fusarium* spp. were inhibited) of 4 mg/L, and MIC values ranged from 0.5 to 4 mg/L. All the azoles showed a MIC₉₀ of 32 mg/L, and MIC values ranged from 16 to 32 for ITZ, VCZ and ABZ, and from 2 to 32 for RVZ. TBF showed a MIC₉₀ of 64 mg/L, and MIC values ranged from 8 to 64 mg/L. These values confirmed the generalized resistance of *Fusarium* spp. (Pujol et al., 1997; Pfaller et al., 2002). Only AMB and RVZ showed relatively low MICs against one strain of *F. solani* (MIC of 0.5–2 mg/L) and one of *F. verticillioides* (MIC of 2 mg/L), respectively.

The in vitro interactions of the 6 antifungal drugs tested in this study are shown in Table 1. Twenty-nine percent of the tests using AMB combined with the other drugs were synergistic, 65.5% were additive or subadditive, and 5.5%

indifferent. Synergy of AMB combined with RVZ was observed for 6 of the 11 strains tested. The most remarkable combinations were AMB-ITZ against *F. solani*, AMB-RVZ against *F. verticillioides*, and AMB-VCZ and AMB-TBF against *F. oxysporum*. In general, the MICs of these azoles in combination decreased dramatically (up to 10 2-fold dilutions, often from an off-scale endpoint), while AMB MICs decreased very slightly (one or two twofold dilutions) or remained the same.

AMB and azoles have traditionally shown an antagonistic mutual effect, especially when added simultaneously (Polak, 1999). Although no antagonistic effect was observed in our study most of the combinations with AMB were additive or subadditive, and the number of favorable interactions was low. Only the combination of AMB with RVZ rendered mainly synergistic interactions. There are no other studies in which the effect of AMB combined with RVZ was evaluated against *Fusarium* or any other filamentous fungi.

Fifty-nine percent of the tests using TBF combined with the azoles were synergistic, 16% additive, and 25% indifferent. TBF combined either with RVZ or VCZ produced more than 70% synergistic interactions against the 11 strains of *Fusarium* tested. By species, the most remarkable combinations were TBF-RVZ against *F. solani* and TBF with any of the azoles against *F. verticillioides* and *F. oxysporum*. In those cases, both TBF and azole MICs decreased to up to four 2-fold dilutions, often from off-scale values. Even though there has been no previous study on the combination of TBF and azoles against *Fusarium* spp., in vitro synergy between such drugs has been reported against other filamentous fungi, such as *Aspergillus* spp. (Ryder and Leitner, 2001) and *Scedosporium prolificans* (Meletiadiis et al., 2003). This positive interaction may be due to the combined effect of TBF and the azoles on different targets in the ergosterol biosynthesis pathway.

Several authors have indicated that the concentrations at which the drugs in combination exert their effect are at least as important as the presence of synergistic interactions,

because MICs of combined drugs below their respective achievable levels in serum could indicate a greater chance of success for in vivo studies (Meletiadiis et al., 2003; Ryder and Leitner, 2001). In our study, potentially achievable MIC values in serum were only observed for AMB-RVZ against two strains of *F. solani* and one strain of *F. verticillioides*, and for TBF-ABZ and TBF-RVZ against two strains of *F. verticillioides* (Ernst, 2001; Bekersky et al., 2002; Meletiadiis et al., 2003). However, the clinical relevance of these findings is unknown at present.

In summary, the combinations AMB-RVZ, TBF-VCZ, and TBF-RVZ displayed mainly synergistic interactions against *Fusarium* spp. Further studies both in vitro and in vivo are warranted to further elucidate the potential use of these combination therapies.

Acknowledgments

The authors thank A. Moreno for her technical assistance. This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 020114).

References

- Arikan, S., Lozano-Chiu, M., Paetznick, V., & Rex, J. H. (2002). In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 245–247.
- Bekersky, I., Fielding, R. M., Dressler, D. E., Lee, J. W., Buell, D. N., & Walsh, T. J. (2002). Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 828–833.
- Boutati, E. I., & Anaissie, E. J. (1997). *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 90, 999–1008.
- Capilla, J., Ortoneda, M., Pastor, F. J., & Guarro, J. (2001). In vitro antifungal activities of the new triazole UR-9825 against clinically important filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2635–2637.
- Chiou, C. C., Mavrogiorgos, N., Tillem, E., Hector, R., & Walsh, T. J. (2001). Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin K and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 3310–3321.
- Ernst, E. J. (2001). Investigational antifungal agents. *Pharmacotherapy* 21 (Pt 2), 165S–174S.
- Espinel-Ingroff, A. (2001). In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 954–958.
- Guarro, J., & Gené, J. (1995). Opportunistic fusarial infections in humans. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 14, 741–754.
- Meletiadiis, J., Mouton, J. W., Meis, J. F. G. M., & Verweij, P. E. (2003). In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 106–117.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard NCCLS document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Ortoneda, M., Capilla, J., Pastor, F. J., Pujol, I., & Guarro, J. (2002). Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 2273–2275.
- Perea, S., Gonzalez, G., Fothergill, A. W., Kirkpatrick, W. R., Rinaldi, M. G., & Patterson, T. F. (2002). In vitro interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3039–3041.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Hollis, R. J., Jones, R. N., & S.E.N.T.R.Y. Participants Group (2000). 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1032–1037.
- Polak, A. (1999). The past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycoses* 42, 355–370.
- Pontón, J., Rùchel, R., Clemons, K. V., Coleman, D. C., Grillot, R., Guarro, J., Aldebert, D., Ambroise-Thomas, P., Cano, J., Carrillo-Muñoz, A. J., Gené, J., Pinel, C., Stevens, D. A., & Sullivan, D. J. (2000). Emerging pathogens. *Medical Mycology* 38 (Suppl1), 225–236.
- Pujol, I., Guarro, J., Gené, J., & Sala, J. (1997). In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. Strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39, 163–167.
- Ryder, N. S., & Leitner, I. (2001). Synergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. *Medical Mycology* 39, 91–95.
- Sugar, A. M. (2001). Overview: antifungal combination therapy. *Current Opinion in Investigative Drugs* 2, 1364–1365.

Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*

Montserrat Ortoneda^a, Javier Capilla^a, Isabel Pujol^b, F. Javier Pastor^a, Emilio Mayayo^c,
Joan Fernández-Ballart^d and Josep Guarro^{a*}

^aUnitat de Microbiologia, Facultat de Medicina and Institut d'Estudis Avançats;

^bLaboratori de Microbiologia, Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, Reus; ^cServei de Patologia, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona; ^dUnitat de Medicina Preventiva, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

We established a reproducible lethal disseminated infection by the opportunistic fungus *Scedosporium prolificans* in an immunosuppressed murine model. We compared the effectiveness of the combined administration of liposomal amphotericin B (LAMB) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) with that of either agent alone and with that of amphotericin B deoxycholate (AMB). LAMB + G-CSF and LAMB treatments improved survival significantly with respect to the untreated control. The mean survival times of these three groups were 13.2, 9.1 and 7.9 days, respectively. Culture results in terms of colony counts for samples of deep organs were lower in mice treated with the combined therapy, although differences were not significant. Combined LAMB + G-CSF therapy could be a promising approach for the treatment of disseminated infections of *S. prolificans*, although further studies are required to determine the most appropriate doses.

Introduction

Invasive fungal infections are serious complications for immunocompromised patients, especially those suffering haematological malignancies. Numerous moulds are responsible for these opportunistic infections,¹ although *Scedosporium prolificans*² causes a lot of concern due to its high virulence and *in vitro* and clinical resistance to practically all available antifungal drugs. As antifungal therapies are not effective, recovery from neutropenia has been considered the most important prerequisite for resolving the infections caused by this fungus. Recent studies have demonstrated *in vitro* resistance of *S. prolificans* to amphotericin B,^{2–5} but this drug, alone or combined with other antifungal agents, is still the most frequently used.⁶ Liposomal amphotericin B (LAMB), alone or combined with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), has been tried in several cases with some success,^{4,5} although studies in animals have not been performed, and there is insuf-

ficient clinical published data to recommend this therapy. In this study we have investigated the activity of LAMB alone and combined with G-CSF in a murine model of disseminated infection by *S. prolificans* and the results have been compared with those obtained with amphotericin B deoxycholate (AMB) therapy.

Materials and methods

Strain

S. prolificans FMR 3569 isolated from a patient with disseminated infection in Spain, was cultured on potato dextrose agar (PDA) plates for 7–10 days at 30°C. The inocula were prepared by flooding the surface of the agar plate with saline solution, scraping the sporulating mycelium with a culture loop and drawing up the resultant suspension with a sterile Pasteur pipette. The suspensions were then filtered once through a sterile gauze to remove

*Correspondence address. Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Tel: +34-977-759359; Fax: +34-977-759322; E-mail: umb@fmcs.urv.es

hyphae. The numbers of conidia in the suspensions were counted with a haemocytometer and verified by plating dilutions of the suspensions on Sabouraud dextrose agar (SDA).

Animals

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

Drugs

AMB (purchased as Fungizone; Squibb Industria Farmacéutica, S.A., Barcelona, Spain), LAMB (provided as Ambisome by NeXstar Farmacéutica S.A., Madrid, Spain) and recombinant human G-CSF (purchased as Granulokine; Laboratorios Pensa, Barcelona, Spain) were used. The three compounds were diluted in 5% dextrose solution to reach the desired concentrations.

Immunosuppression

Mice were immunosuppressed with a single dose of cyclophosphamide 200 mg/kg ip (purchased as Genoxal; Laboratorios Funk S.A., Barcelona, Spain) and with 5-fluorouracil 150 mg/kg iv (purchased as Fluoro-uracil; Productos Roche S.A., Madrid, Spain) on the day of infection.

Infection

In a series of pilot experiments, 0.2 mL of four conidial suspensions (2.5×10^4 , 2.5×10^5 , 2.5×10^6 and 2.5×10^7 conidia/mL) were injected via a lateral tail vein of mice to determine (i) the inoculum that provoked a lethal infection that resulted in 100% mortality by days 10–12 for the survival study, and (ii) the inoculum that provoked a weaker infection, with a 50% survival by day 10, for the tissue burden studies.

Treatment

For the survival study 150 mice were infected with 0.2 mL of a suspension of *S. prolificans* 2.5×10^5 conidia/mL. The inoculated mice were randomly assigned to five treatment groups of 30 animals. Each group received a different treatment, i.e., AMB, LAMB, G-CSF and LAMB + G-CSF, the fifth being the untreated control group, which received 5% dextrose solution iv. Therapy with AMB (1.5 mg/kg/day, ip) and LAMB (10 mg/kg/day, iv) began 1 day after infection and lasted for 10 days. AMB and LAMB were administered by different routes because AMB is toxic for mice

when given iv at doses higher than 1 mg/kg/day.⁷ Therapy with G-CSF (300 µg/kg/day, ip) began 3 days before infection and lasted for 8 days (from day –3 to day +5). Mortality was recorded daily for 30 days.

For the tissue burden study three groups of 10 animals were infected with 0.2 mL of *S. prolificans* at 2.5×10^4 conidia/mL, which were treated with LAMB + G-CSF, AMB or 5% glucose, respectively. The treatment regimes were identical to those in the survival study. On day 11 after challenge the surviving mice (approximately four to six per group) were anaesthetized with halothane (Fluothane; Zeneca Farma, S.A., Pontevedra, Spain) and humanely killed by cervical dislocation. The brain, lungs and kidneys were aseptically removed, and half of each organ was weighed and homogenized in 1 mL of sterile saline solution. This produced a minimal threshold of c. 2–10 cfu/organ. Six 10-fold serial dilutions of this homogenate were made with sterile saline. Volumes of 0.1 and 0.5 mL of the homogenate and 0.1 mL of each dilution were inoculated on to plates of SDA and incubated at 30°C for 3 days. Colonies were counted and plates with <200 colonies were used. The other halves of the organs were fixed in 10% neutral buffered formaldehyde for 10 days, embedded in paraffin wax and automatically processed. Sections (3 µm in thickness) of the embedded tissues were stained with haematoxylin–eosin, periodic acid Schiff (PAS) and methenamine silver (Grocott) for light microscopy observations.

Statistics

Mean survival time (MST) was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups using the log-rank test. Colony counts in tissue burden studies were analysed by a parametric method that consisted of an analysis of variance. Calculations were performed using SPSS for Windows version 9.0.

Results

Immunosuppressed mice inoculated with *S. prolificans* developed systemic infection characterized by weight loss, lethargy, change in fur consistency and neurological abnormalities such as ataxia and stiff neck. Preliminary studies testing different infection doses of this fungus showed that survival correlated with inoculum size (Figure). All mice infected with 2.5×10^7 , 2.5×10^6 and 2.5×10^5 conidia/mL had died within 8, 8 and 11 days, respectively. There was a 20% survival in the group infected with an inoculum of 2.5×10^4 conidia/mL after 30 days. Therefore we chose inocula of 2.5×10^5 and 2.5×10^4 conidia/mL for survival and tissue burden studies, respectively.

The efficacy of the different treatments is shown in Table 1. LAMB and LAMB + G-CSF treatments improved survival significantly with respect to the control (MST =

LAMB and G-CSF therapy for *S. proliferans* infection

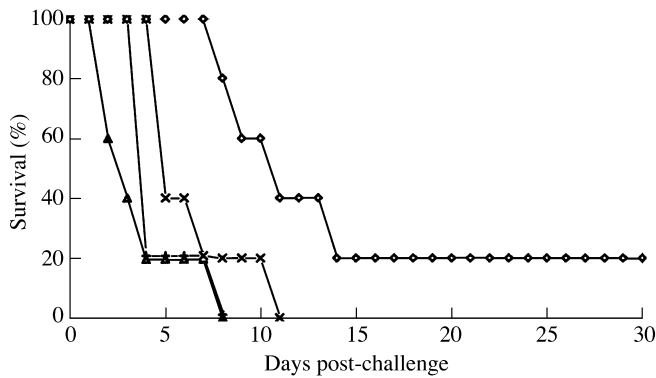


Figure. Survival after intravenous infection of groups of five mice with conidia of *S. proliferans*. Single doses of cyclophosphamide and 5-fluorouracil were administered on the day of infection. Mice were infected with 0.2 mL of four different inocula: ◇, 2.5×10^4 conidia/mL; ×, 2.5×10^5 conidia/mL; +, 2.5×10^6 conidia/mL; ▲, 2.5×10^7 conidia/mL.

7.93 days), showing a MST of 9.07 and 13.20 days, respectively. There was 20% survival (six mice of 30) in the combined therapy group and the MST of this group was significantly longer than that of the AMB group ($P = 0.0377$) and the G-CSF group ($P = 0.0004$), although it was not significantly different from that of the LAMB group ($P = 0.2995$). The MST of the G-CSF treatment group (7.47 days) was significantly shorter ($P = 0.0211$) than that of the control group.

The results of the tissue burden studies are shown in Table 2. The combined therapy reduced tissue counts, although not significantly with respect to untreated controls. Histological examination showed that the kidney was the organ most affected in all the groups. All autopsied mice had abscesses, with variable amounts of fungal elements (hyphae with or without conidia) and inflammatory response by polymorphonuclear leucocytes (PMNs). In general animals from both the control group and from the AMB group showed more diffuse abscesses with large

amounts of fungal elements and a very low inflammatory response, as their immunosuppression had not resolved. Those of the combined therapy group had smaller abscesses with less fungal elements and a higher infiltration by PMNs and showed a comparatively stronger inflammatory response.

Discussion

We established a reproducible lethal disseminated infection by *S. proliferans* in mice immunosuppressed with a combination of 5-fluorouracil and cyclophosphamide. The administration of these drugs at 150 and 200 mg/kg, respectively, had previously been indicated as appropriate to make mice neutropenic (blood PMN $< 100/\mu\text{L}$) for at least 10 days.⁸ This study confirmed the high virulence of this species for immunosuppressed mice, because all the mice in the untreated control group died during the survival study. The high virulence of the strain of *S. proliferans* tested had also been demonstrated previously by Cano *et al.*⁹ Our results correlate with clinical outcome in immunocompromised patients, who almost always die if the neutropenia is not resolved.⁶ Recovery of the phagocytic mechanisms in the form of rising neutrophil counts is a basic requirement for success of antifungal chemotherapy in these infections.

The combination of LAMB and G-CSF was clearly the most effective treatment. This therapy regime allowed the longest MST and the best survival rate. The combination of these two agents could provide important advantages for the treatment of refractory infections. The lipid vehicle of LAMB reduces toxicity and allows administration of higher doses, which results in higher concentrations of AMB in serum than treatment with conventional AMB.⁷ In addition, a more optimal tissue distribution is reached by LAMB, resulting in a higher concentration of the drug in reticuloendothelial tissues heavily involved in fungal infections.¹⁰ Clinical studies have demonstrated the efficacy of

Table 1. Survival of mice infected with *S. proliferans* and treated with AMB, LAMB, G-CSF or LAMB+G-CSF

Group ^a	No. of deaths/no. of animals tested	Survival (days) ^b	<i>P</i> ^c
Control	30/30	7.9 (7.5–8.4)	–
AMB	30/30	9.6 (7.7–11.5)	0.273
LAMB	30/30	9.1 (8.1–10.0)	0.022
G-CSF	29/30	7.5 (5.9–9.3)	0.021
LAMB+G-CSF	24/30	13.2 (9.8–16.6)	0.035

^aAMB, amphotericin B deoxycholate; LAMB, liposomal amphotericin B; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor.

^bKaplan–Meier estimate of mean survival in days. Values in parentheses are the 95% confidence intervals.

^cFor comparison with the control group by the log-rank test.

Table 2. Effects of treatment on colony counts of *S. prolificans* in kidney, brain and lungs

Group ^a	Colony counts (mean log ₁₀ cfu/g of organ weight)		
	kidney	brain	lung
Control	5.46 (3.90–6.98) ^b	4.21 (3.09–5.33)	4.11 (1.36–6.85)
AMB	4.96 (0.63–9.28)	3.90 (2.52–5.28)	3.77 (0.02–7.51)
LAMB + G-CSF	4.46 (2.86–6.06)	3.35 (1.92–4.78)	2.54 (1.94–3.14)

^aAMB, amphotericin B deoxycholate; LAMB, liposomal amphotericin B; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor.

^bValues in parentheses are 95% confidence intervals.

this compound for empirical antifungal therapy in neutropenic patients.^{11–13} G-CSF could contribute to recovery from the infection by increasing the number of differentiated granulocytes and their phagocytic activity.^{14,15} Our study seems to confirm this because histological examination revealed a greater inflammatory response by PMNs and a lower number of fungal cells in the LAMB + G-CSF-treated group than in the other groups. Graybill *et al.*¹⁶ reported no effect of G-CSF alone on survival of experimental cryptococcal meningitis, in agreement with Clemons *et al.*¹⁷ in their study of orogastrintestinal candidosis. However, the combination of G-CSF with antifungal drugs showed an additive effect in experimental murine aspergillosis.⁸

Treatment with AMB was ineffective in our study. In contrast, treatment with LAMB alone improved the MST compared with the control group, although all the animals died before the end of the testing. This latter compound has been used in several human infections caused by *S. prolificans* and in one of only two cases of disseminated infection that have been resolved.^{4,5} In a previous trial (data not published) the strain used in this study clearly showed *in vitro* resistance to AMB (MIC > 16 mg/L) by the method adapted from the National Committee for Clinical Laboratory Standards for moulds.¹⁸ This agrees with other *in vitro* studies that have shown high resistance of *S. prolificans* to AMB.^{4,6}

Our experimental results, although still preliminary, are promising for future treatment of *S. prolificans* infections in neutropenic patients. It is even possible that by increasing the LAMB doses and/or making the cytokine regimen more suitable, better results can be obtained. Some of the new antifungals are also promising candidates for new therapeutic strategies. For instance, the new triazole UR-9825 (Uriach, Barcelona, Spain) has showed excellent *in vitro* results.² Synergy of several antifungal drugs against clinical isolates of this species has also been documented *in vitro*.^{19,20} Nevertheless, these findings need to be viewed with caution and before using these compounds in the clinical setting, proof of their efficacy in adequate animal models is required.

Acknowledgements

We thank S. de Haro and A. Moreno for their technical assistance. This work was supported by CICYT (Ministerio de Educación y Ciencia of Spain) PM98-0059 and by the Fundació Ciència i Salut.

References

- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J. & Figueras, M. J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Baarn, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.
- Guarro, J., Cano, J., Gené, J., Solé, M. & Carrillo-Muñoz, A. J. (2000). *Scedosporium prolificans* as an emerging opportunistic human pathogen. In *Program and Abstracts of the Fourteenth Congress of the International Society of Human and Animal Mycology*, p. 84. ISHAM, Buenos Aires, Argentina.
- Cuenca-Estrella, M., Ruiz-Díez, B., Martínez-Suárez, J. V., Monzón, A. & Rodríguez-Tudela, J. L. (1999). Comparative in-vitro activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**, 149–51.
- Berenguer, J., Rodríguez-Tudela, J. L., Richard, C., Alvarez, M., Sanz, M. A., Gaztelurrutia, L. *et al.* (1997). Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. A report on 16 cases in Spain and a review of the literature. *Medicine* **76**, 256–65.
- Bouza, E., Muñoz, P., Vega, L., Rodríguez-Creixems, M., Berenguer, J. & Escudero, A. (1996). Clinical resolution of *Scedosporium prolificans* fungemia associated with reversal of neutropenia following administration of granulocyte colony-stimulating factor. *Clinical Infectious Diseases* **23**, 192–3.
- Gosbell, I. B., Morris, M. L., Gallo, J. H., Weeks, K. A., Neville, S. A., Rogers, A. H. *et al.* (1999). Clinical, pathologic and epidemiologic features in infection with *Scedosporium prolificans*: four cases and review. *Clinical Microbiology and Infection* **5**, 672–86.
- Graybill, J. R. & Bocanegra, R. (1995). Liposomal amphotericin B therapy in murine histoplasmosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 1885–7.
- Graybill, J. R., Bocanegra, R., Najvar, L. K., Loeberberg, D. & Luther, M. F. (1998). Granulocyte colony-stimulating factor and

LAMB and G-CSF therapy for *S. prolificans* infection

azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 2467–73.

9. Cano, J., Guarro, J. & Mayayo, E. (1992). Experimental infection with *Scedosporium inflatum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **30**, 413–20.

10. Torre-Cisneros, J., Villanueva, J. L., Kindelan, J. M., Jurado, R. & Sanchez-Guijo, P. (1993). Successful treatment of antimony-resistant visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases* **17**, 625–7.

11. Carrillo-Muñoz, A. J., Peman, J. & Gobernado, M. (1999). Review: Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Revista Española de Quimioterapia* **12**, 181–204.

12. Kelsey, S. M., Goldman, J. M., McCann, S., Newland, A. C., Scarffe, J. H., Oppenheim, B. A. *et al.* (1999). Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Bone Marrow Transplantation* **23**, 163–8.

13. Walsh, T. J., Yeldandi, V., McEvoy, M., Gozalez, C., Chanock, S., Freifeld, A. *et al.* (1998). Safety, tolerance and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 2391–8.

14. Dale, D. C., Liles, W. C., Summer, W. R. & Nelson, S. (1995). Review: granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)—role and relationships in infectious diseases. *Journal of Infectious Diseases* **172**, 1061–75.

15. Lieschke, G. J. & Burgess, A. W. (1992). Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2). *New England Journal of Medicine* **327**, 99–106.

16. Graybill, J. R., Bocanegra, R., Lambrosi, C. & Luther, M. F. (1997). Granulocyte colony stimulating factor therapy of experimental cryptococcal meningitis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **35**, 243–7.

17. Clemons, K. V. & Stevens, D. A. (2000). Treatment of orogastrointestinal candidosis in SCID mice with fluconazole alone or in combination with recombinant granulocyte colony-stimulating factor or interferon γ . *Medical Mycology* **38**, 213–9.

18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1998). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi: Proposed Standard M38-P*. NCCLS, Wayne, PA.

19. Meletiadiis, J., Mouton, J. W., Rodriguez-Tudela, J. L., Meis, J. F. G. M. & Verweij, P. E. (2000). *In vitro* interaction of terbinafine with itraconazole against clinical isolates of *Scedosporium prolificans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 470–2.

20. Pacheco, P., Sutton, D., Fothergill, A. & Rinaldi, M. (2000). *In vitro* susceptibility of *Scedosporium prolificans* human isolates to several drugs used alone and in combination. In *Program and Abstracts of the Fourteenth Congress of the International Society of Human and Animal Mycology*. Abstract 79, p. 234. ISHAM, Buenos Aires, Argentina.

Received 15 January 2001; returned 20 June 2001; revised 25 September 2001; accepted 27 November 2001

MYCOLOGY

Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model

M. ORTONEDA, F. J. PASTOR, E. MAYAYO*† and J. GUARRO

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut and *Institut d'Estudis Avançats, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus and †Servei de Patologia, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain

Scedosporium prolificans is an emerging opportunist fungus that causes different types of infections in immunocompetent and immunosuppressed people. These infections show an irregular geographical distribution and, generally, disseminated systemic infections are noticed only in specific countries. This study used a murine model of disseminated infection by this fungus to assess if strains from different origins have different virulence. Two strains from each of four different sources (disseminated infection, localised infection, asymptomatic cystic fibrosis patients and the environment) were tested. Two strains of *S. apiospermum* of clinical origin were also included in the study; these were clearly less virulent than those of *S. prolificans*. The *S. prolificans* strains tested were classified in three groups according to their virulence. The groups with higher and lower virulence were represented by only one strain each, and the intermediate group contained six strains. No significant differences were found between the strains from different geographic areas or different forms of disease.

Introduction

Scedosporium prolificans is a recently emerging opportunist fungus that causes different degrees of infection depending on the route of infection and the immune status of the host [1–3]. In approximately a quarter of the published cases, the isolation of the fungus is of doubtful clinical significance, being mainly from pulmonary colonisation in cystic fibrosis patients [1, 4, 5]. When *S. prolificans* infects immunocompetent people, there has usually been prior trauma in the form of puncture wounds, skin ulcers or surgery, and it produces localised infections that involve skin, bone or joints. In immunocompromised patients and especially in those suffering haematological malignancies, lesions spread and they are usually fatal in less than a month [6]. An altered immune status of the host seems to be the main cause of invasion by this mould, which mimics most of the pathogenic aspects of other opportunist fungi such as *Fusarium* spp. [7], *Acre-*

monium spp. [8] or even *Aspergillus fumigatus* [9]. In these cases the infection is probably acquired by inhalation of conidia and the fungus is able to develop in practically any body organ, although it mainly does so in kidney, lung, brain, spleen, thyroid and myocardium [1]. *S. prolificans* shows universal in-vitro and in-vivo resistance to available antifungal drugs [3, 10, 11], and recovery from neutropenia has been considered a mandatory prerequisite for resolving the infection irrespective of the antifungal treatment used [3].

The pattern of infections produced by *S. prolificans* has changed since the early reports. In the 1980s they were usually localised infections that involved musculoskeletal tissues in immunocompetent patients [12–14], but since 1990 disseminated infections have increased dramatically, mainly among patients with haematological malignancies, with a mortality rate close to 100%.

Infections by *S. prolificans* are not homogeneously distributed around the world, and are especially frequent in Spain, Australia and the USA. Disseminated infections are reported mainly in Spain and Australia, whereas in the USA most of the cases are localised osteoarticular infections, with a very small

Received 3 Dec. 2001; revised version received 12 May 2002; accepted 14 May 2002.
Corresponding author: Professor J. Guarro (e-mail: umb@fmcs.urv.es).

number of disseminated infections reported even in high risk groups (cancer and leukaemia patients) [14]. The present study was performed to assess if this irregular distribution could be a consequence of differing virulence of the strains. The main aim was to compare the virulence of strains from different geographical origins and clinical and environmental sources in a murine model. Two clinical strains of *S. apiospermum*, the other species of the genus also recognised as a common opportunist pathogen, were included in the study. This species is known to be less virulent, and could be more similar to the isolates of *S. prolificans* from the USA if they were demonstrated to be less virulent than the Spanish strains.

Materials and methods

Organisms

Ten *Scedosporium* spp. strains were used in the study (Table 1): eight isolates of *S. prolificans* (two from disseminated infections, two from localised infections, two from asymptomatic cystic fibrosis patients and two from the environment) and two isolates of *S. apiospermum* of clinical origin. All were isolated in Spain, except those from localised infections, which were provided by M. Rinaldi and were isolated in the southern USA. The strains were cultured on potato dextrose agar (PDA) for 7–10 days at 30°C. The inocula were prepared by flooding the surface of the agar plate with sterile saline, scraping the sporulating mycelium with a culture loop, and drawing up the resultant suspension with a sterile Pasteur pipette. The suspensions were then filtered once through sterile gauze to remove hyphae. The number of conidia in the suspensions was counted with a haemocytometer, adjusted to $(8 \times 10^5) - (1 \times 10^6)$ conidia/ml and verified by plating dilutions of the suspensions on PDA plates.

Animals

OF1 male mice (Charles River, Criffa SA, Barcelona, Spain) with a mean weight of 31.5 g were used. Animals were housed eight per cage in standard boxes with corncob bedding and free access to food and

water. Conditions were approved by the Animal Welfare Committee of the Faculty of Medicine of the university.

Infection

Inoculum suspensions (0.2 ml of 10^6 conidia/ml) of each fungal strain were injected intravenously *via* the lateral tail vein in groups of eight mice. Mortality was recorded daily for 30 days.

Histopathology

Representative portions of the organs were fixed in neutral buffered formaldehyde 10% for 10 days, embedded in paraffin wax and automatically processed. Sections (3 µm in thickness) of the embedded tissues were stained with methenamine silver (Grocott) for light microscopy observations.

Statistical analysis

Mean survival time (MST) was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups by the log-rank test.

Results and discussion

The fungal inoculum used in this work was chosen in a previous experimental murine model which compared the mortality rate caused by several inocula of the strain FMR 3569 of *S. prolificans* ranging from 10^6 to 10^8 conidia/ml. The inoculum chosen was 10^6 conidia/ml, which provoked a 100% mortality in 2 weeks (data not shown).

The results confirmed the high virulence shown by *S. prolificans* in man, as most of the strains tested in the present study produced lethal infections in all the mice, with deaths occurring mainly from day 5 to day 15 (Fig. 1). Six of the eight strains of *S. prolificans* showed a very similar virulence pattern with no significant differences among them ($p = 0.1930$) (Table 2). These isolates were the two environmental strains from Spain (FMR 6721 with an MST of 12.00 days and 100%

Table 1. Isolates of *Scedosporium* spp. included in the study and their origins

Species	Strain	Origin
<i>S. prolificans</i>	FMR 6721	Environment
	FMR 6802	Environment
	FMR 6719	Pulmonary colonisation
	FMR 6642	Pulmonary colonisation
	UTHSC 96-1714	Localised infection
	UTHSC 98-1371	Localised infection
	FMR 6649	Disseminated infection
	FMR 3569	Disseminated infection
	ACIA-F-303	Disseminated infection
<i>S. apiospermum</i>	FMR 4167	Disseminated infection

FMR, Facultat de Medicina de Reus; UTHSC, University of Texas Health Science Center; ACIA, Asesoría Científica y de Investigación Aplicada.

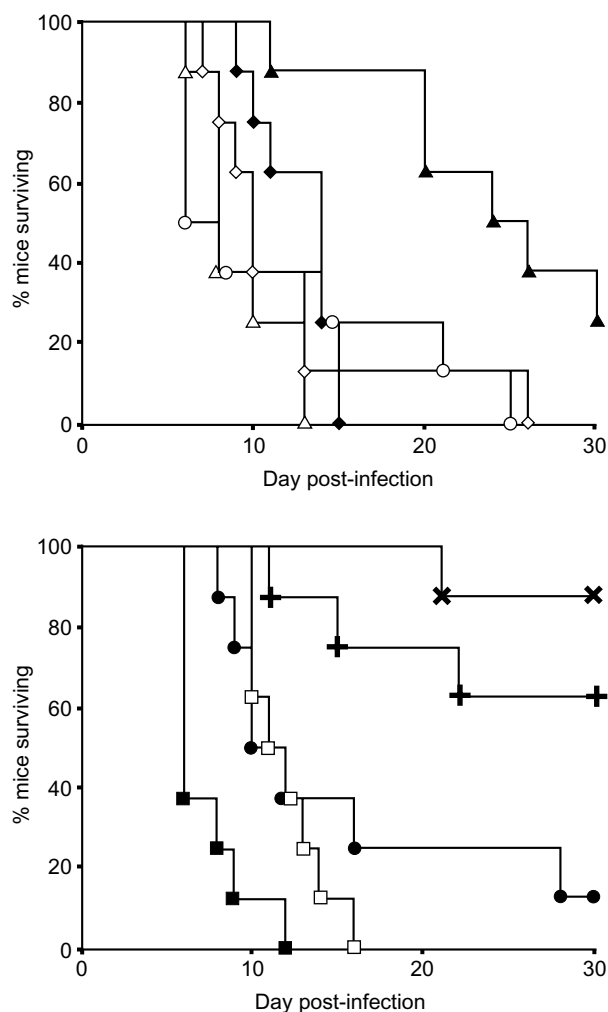


Fig. 1. Survival of mice infected with *Scedosporium* spp. Mice were infected with $(1.6\text{--}2.0) \times 10^5$ conidia and observed for 30 days. *S. prolificans*: environmental strains FMR 6721 ($\diamond$) and FMR 6802 ($\blacklozenge$), strains from pulmonary colonisation FMR 6719 ($\triangle$) and FMR 6642 ($\blacktriangle$), strains from localised infections UTHSC 96-1714 ($\circ$) and UTHSC 98-1371 ($\bullet$), strains from disseminated infections FMR 6649 ($\square$) and FMR 3569 ($\blacksquare$). *S. apiospermum* strains of clinical origin ACIA-F-303 ($\times$) and FMR 4167 ($+$).

mortality, and FMR 6802 with an MST of 12.75 days and 100% mortality); the two American isolates (UTSCH 96-1714 with an MST of 11.50 days and 100% mortality, and UTHSC 98-1371 with an MST of 15.38 and 87.5% mortality); and one each of the

colonising and disseminated infection isolates from Spain (FMR 6719 with an MST of 9.25 days and 100% mortality, and FMR 6649 with an MST of 12.00 days and 100% mortality), respectively. By contrast, two isolates clearly deviated from this group. They were strain FMR 6642 from pulmonary colonisation (MST of 23.88 days and 75% mortality), which was statistically less virulent than the main group referred to above ($p = 0.0009$), and strain FMR 3569 from disseminated infection (MST of 7.38 days and 100% mortality), which was statistically more virulent than the main group ($p = 0.0003$) (Table 2). According to these data, the strains of *S. prolificans* tested can be classified into three groups of virulence, containing those strains with high, intermediate or low virulence, respectively. The group with intermediate virulence contains six of the eight strains of *S. prolificans* tested, and the groups with higher and lower virulence contain only one strain each.

The two strains of *S. apiospermum* were clearly less virulent (MST of 26.81 days and mean mortality rate of 25%) than those of any of the three virulence groups of *S. prolificans* (MST of 7.38, 12.15 and 23.88 days and mean mortality rates of 100%, 97.9% and 75%, for the high, intermediate and low virulence groups, respectively) (Table 2). Similar results on the higher virulence of *S. prolificans* were obtained by Cano *et al.* [15], who compared the virulence of *S. prolificans* and *S. apiospermum* in a similar murine model. Drohuet *et al.* [16] tested a highly virulent strain of *S. prolificans* in murine and rabbit models and found close to 100% mortality with a low inoculum.

Although in this study, only a few strains have been compared because of the complexity of testing many animals, the results seem to demonstrate that Spanish isolates are no more virulent than those from the USA. Consequently, the reason why disseminated infections are more frequent in Spain than in the USA remains unexplained. It is possible that the clinical differences observed could be due to other factors, such as the different genetic susceptibility of people from different geographical regions. On the other hand, it seems clear that there are no differences in virulence between clinical and environmental strains and that any isolate, from the environment or from a clinical source, or

Table 2. *Scedosporium* spp. strains grouped according to their virulence in mice

Species	Degree of virulence	Strains	MST (95% CI) (days)	Mortality (%)	p value*
<i>S. prolificans</i>	High	FMR 3569	7.38 (5.85–8.90)	100	0.0003
	Intermediate	FMR 6721, FMR 6802, FMR 6719, UTHSC 96-1714, UTHSC 98-1371, FMR 6649	12.15 (10.57–13.72) [†]	97.9 [†]	
	Low	FMR 6642	23.88 (19.13–28.62)	75	0.0009
<i>S. apiospermum</i>		ACIA-F-303, FMR 4167	26.81 (23.89–29.73) [‡]	25 [‡]	0

MST, mean survival time in days (95% confidence interval).

*Significance versus the group with intermediate virulence in the log-rank test.

[†]Mean values for the six strains included in this group; strains were not statistically different among them ($p = 0.1930$).

[‡]Mean values for the two strains included in this group; strains were not statistically different among them ($p = 0.2511$).

from different geographical origins, can cause severe infections in a patient with predisposing factors. The presence of conidia of this fungus in the hospital environment, especially in those areas where neutropenic or severely ill patients are housed, can be extremely hazardous for those people. It is worth mentioning that the few existing reports on environmental isolates have been from potted plants in a hospital on two occasions [3, 17], and from air or dust samples in several Spanish hospitals that were undergoing building refurbishment [18, 19]. It seems important to include such species among the microorganisms that require special control measures in the atmosphere of critical areas of hospitals such as haematological wards, intensive care units or operating theatres. This is being done currently in most of the larger Spanish hospitals.

One of the aspects of this study that, in our opinion, needs further work is the existence of a few strains of *S. prolificans* with significantly different virulence from that of the intermediate virulence group, which included most of the isolates. Only two of the eight strains tested had this significantly different virulence, but their atypical virulence could be precisely related to the disease they have provoked; the mildly virulent strain was isolated from a pulmonary colonisation, and the highly virulent strain was isolated from a fatal disseminated infection, both in Spain. This could indicate that strains with different virulence patterns can exist in the same region. However, further studies with a larger number of strains from both sources are required to ascertain this point. In a study on strains of *S. apiospermum*, differences in virulence were found between a strain from a patient with subcutaneous infection and one from the environment [20].

The fact that *S. prolificans* infections are relatively frequent in some geographical regions and very rare in others [5] is difficult to explain. Although only few data exist, the soil seems to be a natural reservoir for this species [5, 21], and it is probable that this fungus proliferates more under the conditions of a Mediterranean climate (hot dry summers and cool humid winters). This irregular distribution of the infections produced by *S. prolificans* is not found in those caused by *S. apiospermum*, the other species of this genus. The latter is also an important and relatively common opportunist fungus that can cause a wide spectrum of diseases in man, ranging from superficial infections in immunocompetent people to severely disseminated infections in immunosuppressed patients [22]. However, analysis of the published cases seems to indicate a more or less regular distribution of *S. apiospermum* throughout the world.

The fact that *S. prolificans* has been isolated only from air and soil could indicate that the wind could disperse the conidia from soil to the air and that the susceptible patient would be infected by inhalation of such

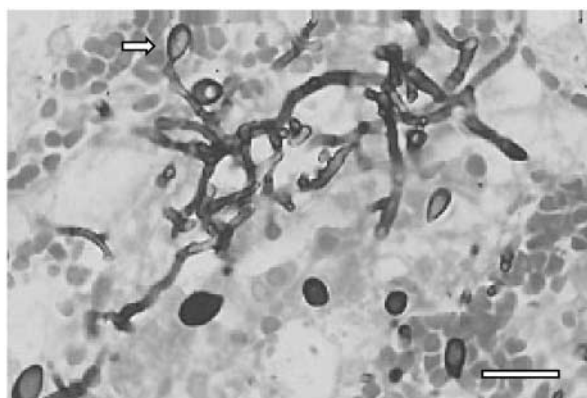


Fig. 2. Grocott-stained section of lung from a mouse infected with *S. prolificans*, showing hyphal elements and conidia (arrow). Bar = 10 μ m.

propagules. This agrees with Gosbell *et al.* [3] who, on the basis of the frequent pulmonary involvement of the patients with *S. prolificans* infections, have argued that this could be the main portal of entry. The rapid dissemination of the fungus in the patients could be facilitated by its ability to produce adventitious sporulation, as happens with other fungi that cause hyalohyphomycosis, such as *Fusarium*, *Acremonium* or *Paecilomyces* spp. [23]. In the present study, it was common to find reproductive structures such as conidiogenous cells and conidia in the tissue of the infected mice that died (Fig. 2).

Another intriguing aspect of *S. prolificans* infections not yet explained is why these infections were not noticed until the beginning of the 1990s [24, 25]. It is probable that previous cases were confused with infections by *S. apiospermum* or even *A. fumigatus*. The clinical appearance of all of them is very similar and can be distinguished only by an accurate histological examination of the fungus in tissue (although this is not always successful), or by culture.

In conclusion, *S. prolificans* is a highly virulent opportunist fungus, as the clinical and experimental data demonstrate. Because of the resistance of this fungus to all available antifungal drugs, it is of enormous importance to develop preventive strategies focusing on reducing both environmental and host risk factors, including decreasing exposure of the airways and reducing the risk associated with neutropenia.

This work was supported by CICYT (Ministerio de Educación y Ciencia of Spain) PM98-0059 and by the Fundació Ciència i Salut. We thank C. Sanmartí and A. Moreno for their technical assistance, and particularly M. Rinaldi for supplying the isolates from the USA.

References

1. Berenguer J, Rodríguez-Tudela JL, Richard C *et al.* Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. A report on 16 cases in Spain and a review of the literature. *Medicine* 1997; **76**: 256–265.

2. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Hyphomycetes. Genus: *Scedosporium*. In: Atlas of clinical fungi, 2nd edn. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2000: 899–901.
3. Gosbell IB, Morris ML, Gallo JH *et al.* Clinical, pathologic and epidemiologic features of infection with *Scedosporium prolificans*: four cases and review. *Clin Microbiol Infect* 1999; **5**: 672–686.
4. García E, Rodríguez V, Gartner S, Gené J. Aislamiento de *Scedosporium prolificans* en pacientes afectados de fibrosis quística. [Isolation of *Scedosporium prolificans* in patients with cystic fibrosis.] *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; **16**: 488–489.
5. Pontón J, Rüchel R, Clemons KV *et al.* Emerging pathogens. *Med Mycol* 2000; **38** Suppl 1: 225–236.
6. Alvarez M, Lopez Ponga B, Rayon C *et al.* Nosocomial outbreak caused by *Scedosporium prolificans* (inflatum): four fatal cases in leukemic patients. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 3290–3295.
7. Guarro J, Gené J. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; **14**: 741–754.
8. Guarro J, Gams W, Pujol I, Gené J. *Acremonium* species: new emerging fungal opportunists. *In vitro* antifungal susceptibilities and review. *Clin Infect Dis* 1997; **25**: 1222–1229.
9. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12**: 310–350.
10. Carrillo AJ, Guarro J. *In vitro* activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2151–2153.
11. Hennequin C, Bernailly N, Silly C *et al.* *In vitro* susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 2064–2066.
12. Salkin IF, McGinnis MR, Dykstra MJ, Rinaldi MG. *Scedosporium inflatum*, an emerging pathogen. *J Clin Microbiol* 1988; **26**: 498–503.
13. Wilson CM, O'Rourke EJ, McGinnis MR, Salkin IF. *Scedosporium inflatum*: clinical spectrum of a newly recognized pathogen. *J Infect Dis* 1990; **161**: 102–107.
14. Wood GM, McCormack JG, Muir DB *et al.* Clinical features of human infection with *Scedosporium inflatum*. *Clin Infect Dis* 1992; **14**: 1027–1033.
15. Cano J, Guarro J, Mayayo E, Fernandez-Ballart J. Experimental infection with *Scedosporium inflatum*. *J Med Vet Mycol* 1992; **30**: 413–420.
16. Drohuet E, Dupont B, Ravisse P. Étude expérimentale d'une souche hautement virulente de *Scedosporium inflatum* isolée d'une arthrite du genou. *J Mycol Med* 1991; **118**: 16–20.
17. Summerbell RC, Kradjen S, Kane J. Potted plants in hospitals as reservoirs of pathogenic fungi. *Mycopathologia* 1989; **106**: 13–22.
18. Durán MT, Larriba L, Rosales M, Torres JP, Molina M, Guerra A. Transmission cèrea de *Scedosporium prolificans* en la infección nosocomial. Abstracts of the VIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Palma de Mallorca. 1998: 316.
19. Muñoz P, Peláez T, Martín-Rabadán P, Rodríguez-Creixéms M, Mensalvas A, Bouza E. Incremento de las infecciones por *Scedosporium prolificans* en un hospital general. Abstracts of the VIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Palma de Mallorca. 1998: 315.
20. Bell RG. Comparative virulence and immunodiffusion analysis of *Petriellidium boydii* (Shear) Malloch strains isolated from feedlot manure and a human mycetoma. *Can J Microbiol* 1978; **24**: 856–863.
21. Hennebert GL, Desai BG. *Lomentospora prolificans*, a new hyphomycete from greenhouse soil. *Mycotaxon* 1974; **1**: 44–50.
22. Walsh M, White L, Atkinson K, Enno A. Fungal *Pseudoallescheria boydii* lung infiltrates unresponsive to amphotericin B in leukaemic patients. *Aust NZ J Med* 1992; **22**: 265–268.
23. Liu K, Howell DN, Perfect JR, Schell WA. Morphologic criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* species by histopathology. *Am J Clin Pathol* 1998; **109**: 45–54.
24. Guarro J, Gaztelurrutia L, Marín J, Barcena J. [*Scedosporium inflatum*, a new pathogenic fungus. Report of 2 cases with a fatal outcome.] *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; **9**: 557–560.
25. Marín J, Sanz MA, Sanz GF *et al.* Disseminated *Scedosporium inflatum* infection in a patient with acute myeloblastic leukaemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; **10**: 759–761.

Experimental pathogenicity of three opportunist paecilomyces species in a murine model

Journal of Medical Mycology, 12: 86-89, 2002.

I. Pujol, C. Aguilar, M. Ortoneda, J. Pastor, E. Mayayo, J. Guarro

The virulence of *Paecilomyces variotii*, *P. lilacinus* and *P. javanicus*, the most frequent species of *Paecilomyces* in human infections, was compared using a murine model. The mice were immunodepressed with cyclophosphamide and inoculated intravenously with 1×10^7 conidia/mouse of one isolate of each of the mentioned species. No significant differences in lethality among the three species were observed ($p > 0.05$). In contrast, fungal recovery from tissue was higher in animals inoculated with *P. variotii* and *P. lilacinus* than with *P. javanicus*. Spleen and liver were the organs most affected, followed by kidneys, heart and lungs. This animal model could be useful for evaluating the efficacy of different antifungal treatments in infections caused by these fungi.

Experimental treatment of a murine disseminated infection by *Paecilomyces variotii*

Journal of Medical Mycology, 13: 141-143, 2003.

I. Pujol, M. Ortoneda, C. Aguilar, F.J. Pastor, J. Guarro

Paecilomyces variotii is an opportunistic fungus that provokes different types of infections in humans. We have compared the efficacy of an increasing dosage of liposomal amphotericin B (1.5, 3, and 10 mg/kg/day) with amphotericin B deoxycholate (1.5 mg/kg/day) in a murine disseminated infection by *P. variotii*. Animals were infected with 1×10^7 conidia/mouse. Daily treatment was begun 48 h after challenge and continued for 10 days. No differences in survival were observed among the different treatments. Amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B reduced fungal counts significantly in liver, spleen, kidneys and lungs in comparison to control. Liposomal amphotericin B at 10 mg/kg/day was clearly more effective in liver than amphotericin B deoxycholate because it sterilised this organ in 57% of mice.



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

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

**FONGS OPORTUNISTES: AVALUACIÓ
DE LA PATOGÈNIA I LA SENSIBILITAT
ALS ANTIFÚNGICS**

Montserrat Ortoneda Pedrola

Tesi Doctoral

2003

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. GENERALITATS.....	2
1.2. ELS FONGS COM A AGENTS INFECCIOSOS.....	4
1.3. INFECCIONS FÚNGIQUES. CLASSIFICACIONS	6
1.3.1. Endògenes i Exògenes	7
1.3.2. Superficials, Cutànies, Subcutànies i Sistèmiques	7
1.3.2.1. Micosis superficials	7
1.3.2.2. Micosis cutànies (dermatomicosis)	8
1.3.2.3. Micosis subcutànies	8
1.3.2.4. Micosis sistèmiques	10
1.4. MICOSIS INVASORES EN L'HOSTE IMMUNOCOMPROMÈS	10
1.4.1. Fongs oportunistes	12
1.4.1.1. <i>Scedosporium</i>	15
1.4.1.2. <i>Fusarium</i>	17
1.4.1.3. <i>Paecilomyces</i>	19
1.4.2. Tractament de la infecció fúngica invasora	24
1.5. ANTIFÚNGICS	27
1.5.1. Polièns	28
1.5.2. Anàlegs precursors d'àcids nucleics. Antimetabolits	30
1.5.3. Azols	31

1.5.4. Al·lilamines	34
1.5.5. Equinocandines i pneumocandines	34
1.6. DETERMINACIÓ DE LA SENSIBILITAT ALS ANTIFÚNGICS	35
1.6.1. Mètodes <i>in vitro</i>	37
1.6.1.1. Els llevats	37
1.6.1.2. Els fongs filamentosos	38
1.6.2. Mètodes <i>in vivo</i> . Models experimentals	40
1.6.3. Correlació <i>in vitro-in vivo</i>	43
2. OBJECTIUS I INTERÈS DEL TREBALL	45
3. MATERIALS I MÈTODES	50
3.1. SOQUES UTILITZADES. CONSERVACIÓ	51
3.2. MODELS ANIMALS	52
3.2.1. Animals	52
3.2.2. Fàrmacs	53
3.2.3. Preparació, conservació i administració dels fàrmacs	55
3.2.3.1. Preparació i conservació	55
3.2.3.2. Administració	56
3.2.4. Preparació dels inòculs pels estudis <i>in vivo</i>	57
3.2.5. Model experimental per l'avaluació de paràmetres hematològics	58
3.2.6. Model experimental d'infecció disseminada	59
3.2.6.1. Estudi de supervivència	59

3.2.6.2. Estudi de recuperació fúngica	60
3.2.7. Anàlisi estadística de les dades	60
3.3. ESTUDIS <i>IN VITRO</i> . TÈCNICA DE MICRODILUCIÓ	61
3.3.1. Antifúngics utilitzats	61
3.3.2. Preparació de les microplaques d'antifúngics	62
3.3.3. Preparació de les microplaques amb combinacions d'antifúngics	63
3.3.4. Preparació dels inòculs pels estudis <i>in vitro</i>	65
4. RESULTATS	66
4.1. INFECCIÓ EXPERIMENTAL I COMPARACIÓ DE LA VIRULÈNCIA	67
4.1.1. Experimental pathogenicity of three opportunist <i>Paecilomyces</i> species in a murine model. Pujol I, Aguilar C, Ortoneda M, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. Journal de Mycologie Medicale 12:86-9. 2002.	
4.1.2. Comparison of the virulence of <i>Scedosporium prolificans</i> strains from different origins in a murine model. Ortoneda M, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. Journal of Medical Microbiology 51:924-8. 2002.	
4.2. IMMUNOSUPRESSIÓ EXPERIMENTAL	68
4.2.1. Efecte de diferents règims immunosupressors en els recomptes de cèl·lules sanguínies en ratolí. Ortoneda M, Capilla C, Pastor FJ, Guarro J. (En preparació).	
4.3. TRACTAMENTS	69
4.3.1. Experimental treatment of a murine disseminated infection by <i>Paecilomyces variotii</i> . Pujol I, Ortoneda M, Aguilar C, Pastor FJ, Guarro J. Journal de Mycologie Medicale. 2003. (En premsa).	

4.3.2. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46:2273-5. 2002.	
4.3.3. Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by <i>Scedosporium prolificans</i> . Ortoneda M, Capilla J, Pujol I, Pastor FJ, Mayayo E, Fernández-Ballart J, Guarro J. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49:525-9. 2002.	
4.3.4. Interaction of G-CSF and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Guarro J. (En preparació).	
4.4. INTERACCIÓ D'ANTIFÚNGICS	71
4.4.1. <i>In vitro</i> antifungal interactions of licensed and novel drugs against <i>Fusarium</i> spp. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Guarro J. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003. (En premsa).	
4.4.2. <i>In vitro</i> antifungal interactions of licensed and novel drugs against <i>Paecilomyces</i> spp. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003. (En revisió, 2ona versió).	
5. DISCUSSIÓ	72
5.1. INFECCIÓ EXPERIMENTAL I COMPARACIÓ DE LA VIRULÈNCIA	73
5.2. EFECTE DELS FÀRMACS IMMUNOSUPRESSORS I LES CITOQUINES ...	77
5.3. TRACTAMENTS ASSAJATS	79

5.4. INTERACCIÓ D'ANTIFÚNGICS	83
6. CONCLUSIONS	86
7. BIBLIOGRAFIA	90

1. INTRODUCCIÓ

1.1 GENERALITATS

Els fongs són organismes eucariotes heteròtrofs, que es nodreixen mitjançant l'absorció de nutrients solubles simples gràcies a la secreció de diversos enzims que degraden el medi extern fins a convertir-lo en substàncies assimilables pel fong, i que s'acumularan en forma de glicogen. Tenen una paret cel·lular constituïda per quitina i glucans com a principals components. Existeixen evidències fòssils de la presència de fongs fa més de 400 milions d'anys (Alexopoulos *et al.* 1996). Així, el fong filamentós terrestre fòssil més antic del que es té coneixement, i en el que s'hi poden veure hifes, espores multiseptades, i sembla que fins i tot fiàlides, va ser trobat a Suècia, i es situa al període Silurià de l'Era Paleozoica (Sherwood-Pike i Gray 1985). En l'actualitat existeixen milers d'espècies que es desenvolupen en substrats com la fusta, el sòl, la matèria orgànica en descomposició, o també en éssers vius com animals i plantes, i se n'alimenten. Els fongs formen part dels processos de biodegradació de restes animals i vegetals en els seus components químics bàsics i tenen un paper clau en el cicle del carboni i de diversos minerals. Els fongs que descomponen organismes morts que contenen cel·lulosa o midó s'anomenen **sapròtrofs**. Els que formen associacions simbiòtiques amb plantes en les quals els dos organismes en surten beneficiats s'anomenen **mutualistes**, com per exemple els que viuen associats als arrels de plantes formant micorrizes (Clay 1988). D'altres fongs, però, produeixen infeccions en plantes o animals, i es consideren **paràsits**. Els fongs provoquen milers de malalties diferents en plantes, incloent moltes de les que provoquen pèrdues econòmiques molt importants. Aquests patògens de plantes causen greus malalties en llavors, plançons i plantes madures, provocant un menor creixement i reproducció de les plantes (Shumann 1991). Els fongs també poden atacar els arbres i estructures de fusta.

Per altra banda, però, diverses espècies de fongs tenen una gran importància industrial perquè produeixen substàncies amb propietats antibacterianes (cefalosporina, penicil·lina, etc.) i antifúngiques (griseofulvina i caspofungina), vitamines, i també enzims que tenen

múltiples aplicacions en processos químics i en la producció d'aliments (pa, formatge, vi, cervesa, ...) (Carlile *et al.* 2001).

Els fongs els podem dividir en llevats, filamentosos, i dimòrfics.

Els **llevats** són fongs unicel·lulars i estan constituïts per cèl·lules que es divideixen per gemmació. Les característiques morfològiques d'aquests taxons es basen en la presència o no de càpsula, la mida i forma de les cèl·lules, el mecanisme de formació de la cèl·lula filla, la capacitat de formar pseudohifes o hifes veritables, i la capacitat de formar el teleomorf (estadi en el qual el fong es reproduïx de forma sexual, també anomenat perfecte). Les característiques fisiològiques són també importants per la seva identificació. Aquest grup de fongs inclou gèneres com *Candida*, *Saccharomyces* o *Cryptococcus* i té representants oportunistes i patògens (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) i d'altres amb una gran importància en la indústria alimentària (*Saccharomyces cerevisiae*).

La majoria dels fongs pertanyen, però, al grup dels **fongs filamentosos**. Es caracteritzen per tenir una estructura pluricel·lular formada per una xarxa d'hifes ramificades amb creixement apical (miceli). Creixen amb aquesta estructura filamentosa independentment de les condicions externes, que en l'únic que poden influir és en la velocitat de creixement, i la major o menor formació d'estructures reproductores, així com en la formació o no del teleomorf. La membrana cel·lular, situada a la part interna de la paret, té una estructura semblant a les membranes de les cèl·lules animals, amb la diferència que l'esterol present és l'ergosterol i no el colesterol. Els diferents gèneres i espècies de fongs filamentosos, en la seva fase asexual, es distingeixen principalment per la conidiogènesi, i les característiques morfològiques observades en els conidis i les cèl·lules conidiògenes són el que en permet la classificació (Alexopoulos *et al.* 1996).

Un grup que a nivell morfològic es troba entre els llevats i els fongs filamentosos són els

anomenats **fongs dimòrfics**. Comprèn una part important dels fongs amb importància mèdica que s'expressen fenotípicament de dues formes morfològiques diferents en funció de les característiques del medi (temperatura, concentració de CO₂, pH). Són fongs filamentosos quan creixen en cultius *in vitro* a 25°C i llevats o esfèrules quan es troben infectant un organisme (Rippon 1988).

Els principals representants amb importància mèdica d'aquest grup són: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffe* i *Sporothrix schenckii*.

1.2. ELS FONGS COM A AGENTS INFECCIOSOS

De les 100.000 espècies de fongs que hi ha descrites actualment, menys de 200 s'associen amb malalties humanes (Richardson i Warnock 1997), i encara són menys les espècies capaces de causar infeccions greus en individus sans. Són molts més els fongs que només són capaços de produir malaltia infecciosa sota circumstàncies inusuals, pràcticament sempre relacionades amb l'alteració del sistema immunitari de l'hoste. Actualment qualsevol fong capaç de créixer a la temperatura de l'hoste (37°C) i sobreviure en teixits amb un potencial redox disminuït (una situació que es dona als teixits danyats) s'ha de tenir en compte actualment com a patògen humà potencial (Richardson i Warnock 1997).

Els fongs que tenen una habilitat innata per causar infeccions i malalties en humans i també altres animals, són els anomenats **patògens primaris**, i comprenen un petit grup d'organismes format per *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* i *Sporothrix schenckii*. Comparteixen la característica de ser dimòrfics, i les infeccions que produeixen són endèmiques i es troben molt ben delimitades a nivell geogràfic

El focus primari de la infecció per aquests patògens es troba al tracte respiratori. La

inhalació de conidis o altres partícules infeccioses que queden retingudes a la membrana mucosa de l'arbre respiratori o als alvèols, poden produir infecció si no són fagocitats pels macròfags. Les malalties clíniques que produeixen els patògens primaris endèmics són en general lleus i de curta durada. La major part dels casos evolucionen sense clínica, i si el sistema immunitari pot protegir l'hoste, a més, s'aconseguirà una immunització per tota la vida. Per altra banda, si el sistema immunitari no és capaç de fer front a la infecció, o bé l'inòcul inicial al qual s'ha estat exposat és molt alt, la malaltia es desenvoluparà i caldrà recórrer a una teràpia antifúngica llarga, i potencialment tòxica. En aquests casos les infeccions poden tenir una progressió mortal ja que normalment no responen als tractaments (Magee i Cox 2002).

El desenvolupament del turisme internacional ha contribuït al fet que diverses micosis regionals com la histoplasmosi, la blastomicosi o la coccidiomicosi apareguin com a malalties infeccioses importades a valorar en el diagnòstic diferencial dels processos infecciosos del viatger. A més, als llocs on són endèmiques estan molt relacionades amb la síndrome d'immunodeficiència adquirida.

La histoplasmosi és una infecció pulmonar primària produïda per ***Histoplasma capsulatum***. Els focus d'infecció són excrements de colom, rat-penat, i gallina. Aquesta malaltia es caracteritza pel creixement intracel·lular del patogen en els macròfags i per la producció d'una reacció granulomatosa en certs teixits. En cas que la infecció es dissemini pot provocar la mort sobretot en infants i pacients immunocompromesos. Les diferents varietats d'aquesta espècie (*H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* i *H. capsulatum* var. *farciminosum*) es troben relacionades amb àrees geogràfiques concretes de l'Amèrica del Nord, Àfrica, Àsia i l'Europa de l'est (Kwon-Chung i Bennett 1992, Rippon 1988).

La coccidiomicosi està causada per ***Coccidioides immitis***. Les partícules infeccioses són artroconidis, que en cas de ser inhalats es transformen en esfèrules als pulmons. La major

part de les infeccions són subclíniques o amb símptomes molt lleus que poden fer pensar en la grip, i en general es resolen per si soles. Malgrat tot, si la infecció pulmonar es dissemina, no hi ha cap tractament que la pugui aturar. Aquest patogen està geogràficament restringit a zones àrides del sud-oest dels Estats Units i d'Amèrica Central i del Sud (Kwon-Chung i Bennett 1992, Rippon 1988).

La blastomicosi, és una infecció pulmonar primària causada per ***Blastomyces dermatitidis***. La blastomicosi es presenta en general com una pneumònia crònica, encara que pot disseminar-se. Aquest patogen es troba bàsicament en les valls dels rius Mississipí i Ohio de Nordamèrica, i a les zones est i central del Canadà (Kwon-Chung i Bennett 1992, Larone *et al.* 1999).

La paracoccidiomicosi està provocada per ***Paracoccidioides brasiliensis***. La manifestació clínica comença després de la inhalació de conidis com una infecció pulmonar benigna que sovint progressa cap a la formació de lesions granulomatoses cròniques a la pell o membranes mucoses. Aquesta malaltia es troba limitada a l'Amèrica Central i del Sud (Guého *et al.* 1997, Kwon-Chung i Bennett 1992).

L'esperotricosi és la malaltia causada per ***Sporothrix schenckii***. A diferència de la resta dels fongs dimòrfics anteriors no pertany a la família *Onygenaceae*, sinó a la família *Ophiostomataceae*. El tipus d'infecció que provoca és en general subcutània (veure apartat 1.3.2.2 Micosis subcutànies), i té una distribució universal (Summerbell 2003, de Hoog *et al.* 2000).

1.3. INFECCIONS FÚNGIQUES. CLASSIFICACIONS

Les infeccions fúngiques es poden classificar de diverses maneres, però les més informatives són les que fan referència a la font d'infecció (micosis endògenes i exògenes) i a la localització de la infecció (micosis cutànies, subcutànies i sistèmiques).

1.3.1. ENDÒGENES I EXÒGENES

Les micosis endògenes són les que es poden donar en hostes immunodeprimits a partir de la microbiota de pell i mucoses. Per exemple, *Candida albicans* es troba freqüentment com a part de la microbiota vaginal, però pot produir vaginitis o infeccions sistèmiques en pacients amb càncer sotmesos a quimioteràpia o en pacients amb SIDA.

Les micosis exògenes es produeixen degut a la inoculació traumàtica de l'agent infecciós en la pell o per la inhalació o la ingestió d'espores. Les micosis sistèmiques d'origen exogen normalment es produeixen com a conseqüència d'haver inhalat espores i acostumen a ser subseqüents a un focus primari pulmonar.

1.3.2. SUPERFICIALS, CUTÀNIES, SUBCUTÀNIES I SISTÈMIQUES

1.3.2.1. MICOSIS SUPERFICIALS

Les micosis superficials afecten només les capes més externes de l'estrat corni de la pell, com les provocades per *Hortaea werneckii* i *Malassezia* spp., o la cutícula del cabell, com les provocades per *Trichosporon* spp. (pedra blanca) i *Piedraia hortae*. Aquestes infeccions constitueixen sovint un problema només estètic i rarament s'estimula una resposta immunitària detectable de l'hoste (excepte ocasionalment en les infeccions provocades per *Malassezia* spp.). S'ha de tenir en compte, però, que pràcticament qualsevol fong pot produir una infecció greu en un hoste adequat. (Schell 1995). Per exemple *Trichosporon* spp., s'han descrit com a causa d'infeccions disseminades fatals en malalts de càncer neutropènics, en receptors de trasplantament de moll d'os, i en pacients cremats (Gueho *et al.* 1994). *M. furfur* s'ha vist implicada en infeccions a través de catèters intravenosos en pacients immunodeprimits i en neonats que reben alimentació suplementada amb lípids per via intravenosa (Rex i Pappas 2003).

1.3.2.2. MICOSIS CUTÀNIES (DERMATOMICOSIS)

Les micosis cutànies són infeccions produïdes en general per fongs dermatofits, i que es localitzen a l'epidermis, dermis i estructures queratinitzades (ungles, pèl). Aquestes infeccions rarament progressen cap als òrgans interns, i responen bé als tractaments, encara que aquests acostumen a durar diverses setmanes (Kane *et al.* 1997). Aquests fongs posseeixen més capacitat invasora que els fongs que provoquen infeccions superficials, però no solen sobrepassar els teixits queratinitzats. Provoquen un ampli espectre de quadres clínics (tinyes) que van de lesions lleus a processos inflamatoris greus. Aquests organismes penetren a l'estrat corni de la pell i el seu tegument interior a través de ferides o zones amb maceracions, i s'hi estableixen i es multipliquen gràcies a la capacitat de produir queratinaasa, que serveix per hidrolitzar la proteïna que forma part constitutiva de l'estrat corni cutani, les ungles i el pèl. La raó per la qual aquests agents no es desenvolupen en estrats més interns no es coneix, però es creu que factors com la immunitat cel·lular i la presència de transferrina al sèrum inhibeixen la seva disseminació. Alguns dermatofits han evolucionat cap a una relació de tipus comensal amb l'hoste i es poden aïllar de la pell en absència de lesions.

També hi ha micosis cutànies produïdes per fongs no dermatofits. Són infeccions degudes a fongs que posseeixen la capacitat de degradar la queratina malgrat que no es poden incloure en el grup dels dermatofits. Són membres dels gèneres *Candida*, *Fusarium*, *Scytalidium*, *Chrysosporium*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Hortaea* etc. Es localitzen principalment als plecs de la pell i a les mucoses (Gugnani 2000).

1.3.2.3. MICOSIS SUBCUTÀNIES

Els fongs que poden causar micosis subcutànies es troben de forma abundant al medi ambient i tenen en general un baix grau d'infectivitat. Aquests microorganismes penetren fins

al teixit subcutani per inoculació traumàtica. Les evidències histopatològiques indiquen que aquests organismes es desenvolupen a les capes de teixit subcutani gràcies a la producció d'enzims proteolítics. Alguns d'ells formen els anomenats **micetomes** eumicòtics (produïts per *Madurella* spp., *Acremonium* spp., i *Pseudallescheria boydii* entre altres fongs) que són tumefaccions inflamatòries produïdes per la proliferació del fong. Es caracteritzen per la presència d'abscessos o nòduls cutanis i subcutanis de dimensions diverses, que s'ulceren i exuden a través de nombrosos trajectes fistulosos intercomunicats. També poden afectar el teixit ossi pròxim en una forma destructiva d'osteomielitis.

Encara que la majoria dels fongs implicats en micosis subcutànies pertanyen al grup dels filamentosos, els agents que causen la **cromoblastomicosi** i l'**esporotricosi** són excepcions ja que són dimòrfics. La **cromoblastomicosi** està causada per un grup de fongs pigmentats (dematiacis) (*Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Cladosporium carrionii*, *Phialophora verrucosa*) que exhibeixen dues morfologies diferents; l'organisme pot existir en forma micel·liar o en forma de llevat. Quan infecta un organisme està format per cèl·lules esfèriques amb una paret gruixuda, anomenades cèl·lules muriformes, escleròtiques o cossos de Medlar. Malgrat tot, la transició cap a la morfologia escleròtica no és necessàriament un requeriment crucial per la patogènesi.

L'**esporotricosi** està provocada pel fong *Sporothrix schenckii*, que creix com a fong filamentós a la natura o quan es cultiva a 25°, però que adopta forma de llevat quan es troba en teixits. Les manifestacions clíniques de la malaltia causada per *S. schenckii* varien, depenent de l'estat immunològic del pacient. La forma més típica de la malaltia s'anomena esporotricosi limfocutània aguda i es produeix per la disseminació de l'organisme cap als ganglis limfàtics propers a partir de la infecció primària produïda per inoculació traumàtica. La malaltia no s'estén més enllà de la regió dels ganglis limfàtics que drenen el punt original de la infecció. Per altra banda, la inoculació de l'agent infecciós en llocs que no siguin la pell pot provocar altres lesions locals com per exemple otitis invasora o artritis micòtica. En

pacients immunocompromesos o en casos d'alcoholisme crònic també es pot desenvolupar una infecció pulmonar que podrà en alguns casos esdevenir disseminada (Kwon-Chung i Bennett 1992). Les manifestacions clíniques de les infeccions pulmonars varien depenent de l'estat immunològic del pacient. L'individu immunocompetent té un grau elevat de resistència innata a la malaltia, i en cas de detectar-se una infecció pulmonar no superficial, el fong resulta ser un simple colonitzador d'una cavitat pulmonar preexistent.

Hi ha també altres tipus d'infeccions subcutànies menys freqüents com la lobomicosi, la rinosporidiosi, les zigomicosis subcutànies, el quist feomicòtic, etc.

1.3.2.4. MICOSIS SISTÈMIQUES

Les micosis sistèmiques impliquen la disseminació de la infecció a 2 o més òrgans del cos. Són les més greus i poden resultar fatals pels individus amb un sistema immunitari deficient o quan el patogen és resistent al tractaments antifúngics. Les infeccions fúngiques generalment s'adquireixen a partir de la inhalació o inoculació traumàtica d'espores. Algunes infeccions es poden transmetre d'animals a humans o entre humans. En alguns casos els antifúngics són efectius per tractar infeccions sistèmiques, però donada la llarga durada dels tractaments (mesos o anys), aquests fàrmacs provoquen sovint nombrosos efectes secundaris.

1.4. MICOSIS INVASORES EN L'HOSTE IMMUNOCOMPROMÈS

Durant la segona meitat del segle XX, s'han observat importants canvis en la incidència d'infeccions fúngiques en humans. Hi ha nombrosos articles científics que recullen aquesta incidència creixent en malalts de càncer, trasplantats de ronyó i moll d'os, drogoaddictes per via intravenosa, i en pacients amb malalties pulmonars degeneratives o obstructives, amb

dèficits quantitatius i/o funcionals de fagòctis o limfòcits, o que reben tractaments amb antibiòtics durant períodes de temps llargs (Rippon 1988, Fridkin i Jarvis 1996).

Especialment en els últims 20 anys, l'aparició de la SIDA, i l'increment espectacular en el nombre d'afectats, va fer incrementar de forma alarmant el nombre de candidiasis de les mucoses, histoplasmosis i meningitis per criptococ. Les leucèmies i limfomes, els tumors sòlids, i diverses infeccions per virus com el VIH o els CMV, són les malalties de base de la població més susceptible de patir infeccions per fongs oportunistes (Formiga Pérez 1997). Entre aquestes causes, que podríem considerar naturals, també destaquen els desordres immunopatològics relacionats amb dèficits congènits de cèl·lules T, la malaltia granulomatosa crònica, trastorns endocrins com la diabetis mellitus o trastorns de tiroides, malnutrició, i l'edat, tant en nadons prematurs com ancians (Warnock 1991).

No hi ha dubte, però, que la part més significativa de l'increment en el nombre de casos de micosis oportunistes com en el d'espècies implicades en les infeccions es deu principalment a les pròpies tècniques mèdiques, com per exemple els trasplantaments d'òrgans sòlids que fins als anys 80 no van ser possibles, com els de cor i fetge, i sobretot el trasplantament de pulmó degut al fet que és la porta d'entrada natural a nombroses infeccions. Tots els trasplantaments, incloent el de ronyó, que tècnicament no presenta complicacions, i que ja té més de 50 anys d'història, no s'han pogut alliberar de les infeccions relacionades amb els tractaments immunosupressors administrats (Rubin 2003). Les importants fites mèdiques aconseguides en el camp dels trasplantaments d'òrgans sòlids i moll d'os, són, per tant, la causa de l'increment en el nombre de pacients susceptibles de patir una infecció fúngica. Degut a l'increment en el nombre de pacients neutropènics fruit dels tractaments amb quimioteràpics s'ha observat un increment en les infeccions nosocomials i una diversificació dels fongs implicats en aquestes infeccions, i s'ha demostrat que les condicions d'asèpsia en molts dels hospitals que els practicaven no eren les més idònies (Anaissie *et al.* 2003). La taxa d'infeccions fúngiques disseminades d'origen nosocomial es van multiplicar per 5 la

dècada dels 80, i va ser i és encara la principal causa de morbiditat i mortalitat entre els pacients trasplantats. Prop del 89% de les infeccions estan causades per llevats del gènere *Candida*, un 1.3% de totes les infeccions fúngiques estan provocades pels membres del gènere *Aspergillus*, i el 10% restant estan causades per una gran varietat de gèneres de llevats (*Malassezia* spp., *Trichosporon* spp.) i fongs filamentosos (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp.) (Fridkin i Jarvis 1996). Finalment també cal considerar les infeccions que es poden desenvolupar a l'hospital quan, degut als tractaments quimioteràpics, els pacients tenen períodes de neutropènia. Colonitzacions asimptomàtiques o lesions cutànies preexistents, poden esdevenir disseminades quan el pacient es sotmet a quimioteràpia. Posteriorment, sobretot els pacients trasplantats, seguiran essent especialment susceptibles a les infeccions degut a la teràpia immunosupressora que s'hauran de seguir de per vida (Virgili *et al.* 2002).

Actualment es considera que els pacients amb fungèmies tenen un índex de mortalitat que duplica el dels pacients amb bacterièmies (Richardson i Warnock 1997). Les estimacions fetes sobre la incidència d'aquestes infeccions, però, sembla que possiblement infravaloren la situació real perquè hi ha molts casos que no s'arriben a diagnosticar. El vint-i-cinc per cent dels pacients amb malalties malignes pateixen infeccions fúngiques invasores que sovint només es diagnostiquen en l'autòpsia.

1.4.1. FONGS OPORTUNISTES

Els **fongs oportunistes** capaços de provocar micosis invasores i disseminades, no es limiten als membres dels gèneres coneguts, com *Cryptococcus* spp., *Candida* spp. i *Aspergillus* spp., sinó que la llista s'ha d'ampliar contínuament amb els anomenats oportunistes emergents. Dins dels fongs oportunistes emergents, hi trobem els llevats (les

càndides no "albicans" i altres gèneres de llevats), un fong dimòrfic (*Penicillium marneffe*), i els fongs filamentosos que provoquen feohifomicosis i hialohifomicosis (Pontón *et al.* 2000).

La candidiasi disseminada, provocada en general per ***C. albicans***, és la micosi oportunista més freqüent. El tracte digestiu i els catèters intravasculars són les principals vies d'entrada per la candidiasi disseminada o visceral. Els òrgans diana són els ronyons, fetge, melsa, cervell, ulls, cor i altres teixits. Els principals factors de risc que predisposen a una candidiasi disseminada són els tractaments amb antibiòtics d'ampli espectre, quimioteràpia antineoplàstica, corticosteroides, catèters vasculars i els dèficits de cèl·lules T, com els provocats per la infecció per VIH. L'ús generalitzat de fluconazol per tractar les infeccions per *Candida*, però també el seu ús profilàctic, ha afavorit l'aparició de soques de *C. albicans* resistents al fluconazol i l'increment de les espècies del gènere resistents al fluconazol (Anaissie *et al.* 2003).

La criptococosi, causada per ***Cryptococcus neoformans***, provoca generalment pneumònia i meningitis. Els defectes en la immunitat cel·lular, sobretot els relacionats amb la SIDA, són els factors de risc més freqüents per desenvolupar criptococosi. La criptococosi, juntament amb la candidiasi representen un 90% de totes les infeccions per llevats (Valencia *et al.* 1997).

Altres llevats que fins fa poc eren considerats pràcticament no patògens com ***Trichosporon spp.*** i ***Malassezia spp.***, ***Saccharomyces cerevisiae*** i ***Rhodotorula rubra*** han estat la causa de diverses infeccions relacionades amb l'ús de catèters, i sovint amb el personal sanitari, que actua de portador.

L'aspergil·losi invasora, produïda per les diverses espècies del gènere *Aspergillus*, i principalment per ***A. fumigatus***, comença generalment als pulmons i es pot disseminar cap al cervell, ronyons, fetge, cor i ossos. El principal portal d'entrada per l'aspergil·losi és el tracte respiratori, però en alguns casos la inoculació traumàtica de l'agent també pot provocar la malaltia en certs individus immunocompromesos. Els principals factors de risc

són els defectes tant funcionals com quantitius dels neutròfils circulants, com per exemple, els observats en la neutropènia deguda a la teràpia antineoplàsica i l'administració de corticosteroids sistèmics.

La zigomicosi o mucormicosi, provocada per ***Rhizopus***, ***Rhizomucor***, ***Absidia***, i ***Mucor***, entre d'altres gèneres menys freqüents, engloba un ampli grup d'infeccions cutànies, gastrointestinals, pulmonars, rinocerebrals i disseminades (Schipper i Stalpers 2003). L'afectació rinocerebral és una forma especialment greu de zigomicosi, i es dona en pacients diabètics amb cetoacidosi. A més de la diabetis i la cetoacidosi, la neutropènia, el tractament sistèmic amb corticosteroids així com el tractament amb quelants del ferro i l'alumini són també factors de risc importants per la zigomicosi.

Les **feohifomicosis** engloben les infeccions produïdes per fongs dematiacis (amb pigments negres o marró). El nombre d'organismes que es consideren agents etiològics de feohifomicosis ha augmentat durant la última dècada. La llista dels organismes incloïa l'any 1996 unes 104 espècies que pertanyen a 57 gèneres, mentre que l'any 1986 només es consideraven 71 organismes inclosos en 39 gèneres (Rinaldi 1996). Aquests organismes tenen en general un cert tropisme cap al cervell, i en destaquen les espècies següents: *Cladophialophora bantiana*, *Wangiella dermatitidis*, *Ramichloridium mackenzii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Curvularia pallescens*, *Ochroconis gallopavum* i *Bipolaris spicifera*.

Les **hialohifomicosis** engloben les infeccions produïdes per una gran varietat de fongs, que només comparteixen la característica de formar hifes transparents (hialines) en els teixits infectats. Aquest terme s'utilitza generalment quan no es pot identificar el fong a nivell d'espècie o gènere. El grup de gèneres inclosos creix contínuament i inclou bàsicament: *Fusarium* spp., *Penicillium marneffe*, *Scedosporium* spp., *Paecilomyces* spp., *Acremonium* spp. *Scopulariopsis* spp.

Penicillium marneffe és un fong dimòrfic considerat com un patogen oportunista relacionat amb els malalts de SIDA d'origen asiàtic (l'Índia, la Xina, Tailàndia, Vietnam i Taiwan),

essent els seus portadors, uns rosegadors anomenats rates del bambú. Abans de la pandèmia de SIDA, s'havien descrit pocs casos d'infecció per aquest fong, que a més eren generalment asimptomàtics. L'elevat nombre de casos observats arreu del món en malalts infectats amb el VIH ha fet que en l'actualitat es consideri un patogen oportunista emergent (Duong 1996, Chariyalertsak 1996, Summerbell 2003).

1.4.1.1. *Scedosporium*

El gènere anamòrfic *Scedosporium* comprèn dues espècies de rellevància clínica, *S. apiospermum* i *S. prolificans*. Les dues espècies es troben dins de grup dels fongs que produeixen hialohifomicosis, encara que la primera és l'espècie més comuna. En la fase infectiva en teixit presenten una morfologia i ramificació de les hifes semblant a la d'*Aspergillus*, amb el que es poden confondre. Poden provocar un ampli ventall de patologies que van des de la colonització pulmonar o infeccions localitzades com otomicosis i sinusitis al·lèrgica, micosis broncopulmonars, queratitis, endocarditis, osteomielitis, endoftalmitis, i finalment infeccions pulmonars i disseminades. Poden produir infeccions o colonitzacions cròniques en malalts de fibrosi quística i malaltia pulmonar supurativa crònica, que sovint impedeixen que puguin ser admesos per trasplantaments de pulmó degut a les dificultats tècniques associades (Sigler 2003). La sensibilitat a l'amfotericina B, que és l'antifúngic més utilitzat per tractar les infeccions disseminades és diferent per les dues espècies que formen el gènere. Si tenim en compte les concentracions mínimes necessàries per inhibir el 90% dels aïllaments *in vitro*, els valors són superiors a 16 µg/ml per l'espècie *S. prolificans*, i estan entre 4 i 16 µg/ml per *S. apiospermum*, segons diferents autors (Meletiadiis *et al.* 2003, Carrillo i Guarro 2001, Espinel 2001b).

***Scedosporium apiospermum*.** Aquesta espècie va ser descrita l'any 1922 com a causant d'un micetoma del peu i anomenada *Allescheria boydii* [Shear, 1922], posteriorment es va

conèixer com *Petriellidium boydii* [Malloch, 1970], i finalment com *Pseudallescheria boydii* [McGinnis, Padhye i Ajello, 1982]. Inicialment es van proposar noms diferents pels tres estats que presenta, però posteriorment es va veure que corresponien tots a un sol organisme. El teleomorf, *Pseudallescheria boydii*, és un ascomicet no ostiolat, i els dos sinanamorfs que presenta són *Scedosporium apiospermum* i *Graphium* sp. (Figura 1). Des de la primera descripció s'ha descrit en nombroses ocasions com a agent etiològic d'un ampli espectre d'infeccions tant en individus immunocompetents com immunodeprimits. Provoca des de colonització pulmonar, otomicosis, i sinusitis alèrgica fins a endocarditis, endoftalmitis, i infecció pulmonar i disseminada. Pot afectar el cervell provocant abscessos cerebrals o meningitis, i també causa micetoma blanc. (Sigler 2003)

Les infeccions per ***Scedosporium prolificans*** són més recents. Des del seu descobriment en una biòpsia i la descripció l'any 1984 per Malloch i Salkin (Salkin *et al.* 1988), l'espècie ha rebut diversos noms. Inicialment es coneixia amb el nom de *S. inflatum*, fent referència a la seva típica fiàlide inflada a la base. Posteriorment, l'any 1991 Gueho i de Hoog el van anomenar *S. prolificans* perquè es va veure que era igual que *Lomentospora prolificans* (Gueho i de Hoog 1991). A diferència de *S. apiospermum* no presenta fase sexual, i tampoc no presenta la forma *Graphium* pròpia de l'altra espècie. Malgrat pertànyer als fongs hialins, forma colònies fosques de color gris marronós degut a la pigmentació dels conidis, i diferents autors inclouen les infeccions que provoca dins de les hialohifomicosis o de les feohifomicosis (Revankar *et al.* 2002, Dignani *et al.* 2003). Les cèl·lules conidiògenes estan inflades a la base, i aquesta característica ajuda a distingir-lo de *S. apiospermum* quan aquest no presenta les altres formes característiques en *Graphium*, o el teleomorf. Encara que el seu espectre de malalties és semblant al de *S. apiospermum*, *S. prolificans* s'associa més amb osteomielitis i artritis tant en humans com en animals.

Quan *S. prolificans* afecta persones immunocompetents la porta d'entrada acostuma a ser la pell, a través de ferides (talls, úlceres o cirurgia) i provoca infeccions localitzades que

afecten pell, ossos i articulacions (osteomielitis i artritis). Aquest tipus d'infeccions són les primeres que es van diagnosticar com a causades per aquest fong (Salkin *et al.* 1998). En altres casos la infecció s'adquireix per inhalació del fong i colonització pulmonar (Berenguer *et al.* 1997, de Hoog *et al.* 2000). En pacients immunocompromesos, i especialment en els leucèmics, les lesions es disseminen i acostumen a ser fatals en un període de temps inferior a un més (Gosbell *et al.* 1999). Aquest fong pot afectar pràcticament qualsevol òrgan, encara que els òrgans diana són ronyons, pulmons, cervell i melsa (Berenguer *et al.* 1997). A més de la seva virulència, *S. proliferans* presenta una elevada resistència *in vitro* i *in vivo* a tots els antifúngics comercialitzats (Hennequin *et al.* 1997, Gosbell *et al.* 1999).

És important destacar que les infeccions causades per *S. proliferans* tenen una distribució geogràfica peculiar. Als Estats Units hi ha nombrosos casos descrits, però pràcticament tots són infeccions localitzades. En canvi, a l'estat espanyol i a Austràlia una part molt elevada de les infeccions són disseminades i tenen un molt mal pronòstic (Gosbell *et al.* 1999, Idígoras *et al.* 2001). En els últims anys aquesta espècie ha estat inclosa en diverses revisions d'infeccions disseminades en pacients neutropènics, que demostren que la seva incidència és cada vegada més gran (Idígoras *et al.* 2001, Revankar *et al.* 2002).

1.4.1.2. *Fusarium*

Fusarium és un gènere anamòrfic que comprèn un elevat nombre d'espècies, la majoria de les quals són sapròtrofs del sòl o patògens de plantes. La característica que defineix morfològicament el gènere és la producció de conidis multiseptats en forma de falç, anomenats macroconidis, amb una cèl·lula peu més o menys marcada (Figura 2). Es formen a partir de fiàlides (cèl·lules conidiògenes que produeixen conidis a partir d'una obertura terminal). També formen microconidis, que són unicel·lulars, i es poden estructurar en caps mucosos o en cadenes. La taxonomia del gènere és complexa perquè comprèn moltes espècies i ha estat sotmès a diverses revisions, que van utilitzar diferents criteris per

diferenciar les espècies. A més, la variabilitat de les soques tant a la natura com en cultiu s'ha de tenir molt en compte, per la qual cosa la identificació de les espècies de *Fusarium* és força complexa fins i tot pels especialistes en el gènere. Probablement per aquesta raó en majoria de les infeccions per *Fusarium* les espècies no estan identificades (Guarro i Gené 1995). La major part de les espècies del gènere *Fusarium* tenen un patró similar d'infeccions, i fins els anys 70 se'ls atribuïa una importància limitada com a patògens. Principalment se les relacionava amb casos de toxicitat, infeccions superficials, i en menor grau, amb infeccions localitzades dels teixits. A partir d'aquesta data, les infeccions causades per aquest gènere han augmentat en nombre i en gravetat sobretot en els pacients neutropènics. La presència d'aquests fongs al sòl, i en tota mena de substrats fa que sigui molt fàcil l'adquisició del patogen per inoculació traumàtica. Les onicomicosis i queratomicosis són molt freqüents, i poden ser el focus primari per una posterior disseminació en el cas de malalts neutropènics (Boutati i Anaissie 1997). En general totes les espècies del gènere tenen una pobra resposta als antifúngics *in vitro*. Les CMI de l'amfotericina B estan entre 1 i 4 µg/ml per les diferents espècies del gènere *Fusarium* (Pujol *et al.* 1997b, Espinel 2001b).

F. solani és, juntament amb *F. oxysporum*, un dels fongs que amb més freqüència provoquen infeccions cutànies i disseminades en pacients immunocompromesos, i especialment en pacients neutropènics. *F. solani* és l'espècie del gènere que més sovint s'aïlla en queratitis i en úlceres cutànies arreu del món, i és una de les principals causes de ceguesa en àrees tropicals.

Fusarium verticillioides, que anteriorment es coneixia amb el nom de *F. moniliforme*, està principalment relacionada amb infeccions localitzades subcutànies i disseminades, sobretot en pacients neutropènics. Aquesta espècie és la més coneguda productora de fumonisines, micotoxines implicades en la malaltia degenerativa cerebral que és sovint fatal, coneguda com a leucoencefalomalàcia equina, que es produeix en cavalls que mengen aliments

contaminats. També produeix una gran varietat de metabòlits secundaris com àcid fusàric, i moniliformina (Summerbell 2003).

Fusarium oxysporum és l'espècie del gènere que més sovint es troba provocant onicomicosis i comparteix un lloc destacat amb alguns fongs més, com *Trychophyton mentagrophytes* i membres del gènere *Acremonium* com a agents etiològics de la onicomicosi blanca superficial. Aquesta espècie està àmpliament distribuïda als sòls i afecta una gran varietat de plantes. També destaca perquè produeix diversos metabòlits secundaris, encara que aquesta característica no està present en totes les soques.

1.4.1.3. *Paecilomyces*

Paecilomyces spp. és un gènere heterogeni, que inclou espècies que tenen característiques molt diferents de les de l'espècie tipus, *P. variotii*. Una part de les espècies del gènere s'inclouen per les seves característiques en els Eurotials. Aquestes espècies (*P. variotii* i *P. viridis*) són sensibles als poliens i desenvolupen colònies de color marró-oliva o verdós. La resta de les espècies (*P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *P. marquandii*) s'inclouen dins dels Hipocreals, mostren una resistència intrínseca als poliens i desenvolupen unes colònies de colors lila, rosa o blanc (Figura 3). Els membres amb importància clínica del gènere *Paecilomyces* es troben entre els fongs oportunistes que són relativament més senzills d'identificar a nivell d'espècie, sobretot perquè les espècies que més predominen (*P. variotii* i *P. lilacinus*) són força diferents entre elles. Per tant, com a mínim des de la publicació del "Compendium of Soil Fungi" per Domsh i col·laboradors l'any 1980 hi ha hagut un increment en el nombre de publicacions en les que s'identifica el fong a nivell d'espècie i un descens en les que ho fan només a nivell de gènere. Dins del gènere *Paecilomyces* és especialment important poder identificar l'espècie concreta, perquè hi ha grans diferències de sensibilitat als antifúngics entre les espècies (Summerbell 2003). La CMI de l'amfotericina B per *P. variotii* és de 0.08 µg/ml, per *P. javanicus* és de 0.8 µg/ml, però per *P. lilacinus* és superior a

10 µg/ml, i l'organisme és completament resistent *in vitro* a l'amfotericina B (Espinel 2001b, Aguilar *et al.* 1998).

Malgrat aquestes diferències, les infeccions causades per aquestes espècies tenen punts en comú perquè sovint estan relacionades amb la implantació de pròtesis com ara vàlvules cardíques, còrnies, catèters i implants mamaris. Aquests elements actuen com a reservori i focus de la infecció, que acostuma a ser localitzada, excepte que existeixi una neutropènia molt profunda. També s'ha pogut observar la relació entre diversos brots hospitalaris i la utilització de locions i solucions contaminades amb aquests fongs.

Paecilomyces variotii és una espècie que en general provoca infeccions (principalment endocarditis i endoftalmitis) relacionades amb la implantació de catèters, empelts i implants mamaris. També és relativament freqüent en pacients sotmesos a diàlisi (Williamson *et al.* 1992).

Paecilomyces lilacinus s'ha detectat en nombroses queratitis i endoftalmitis com a conseqüència de la implantació de lents oculars contaminades, o en pacients hospitalaris que utilitzaven locions contaminades. Es dona el cas que aquesta espècie de *Paecilomyces* és especialment resistent a les tècniques més usals d'esterilització de solucions i material clínic (Orth *et al.* 1996, Westenfeld *et al.* 1996).

Paecilomyces javanicus no es considera bàsicament patògen de mamífers, i només es troba ben descrit com a patògen per insectes tropicals. Segons les descripcions de l'espècie, no pot créixer a temperatures superiors a 35°C i fins i tot a 30°C el seu creixement és molt restringit. Malgrat això va ser estat descrit com l'agent etiològic de dues infeccions greus durant la dècada dels 80 (Ho *et al.* 1986, Allevato *et al.* 1984).

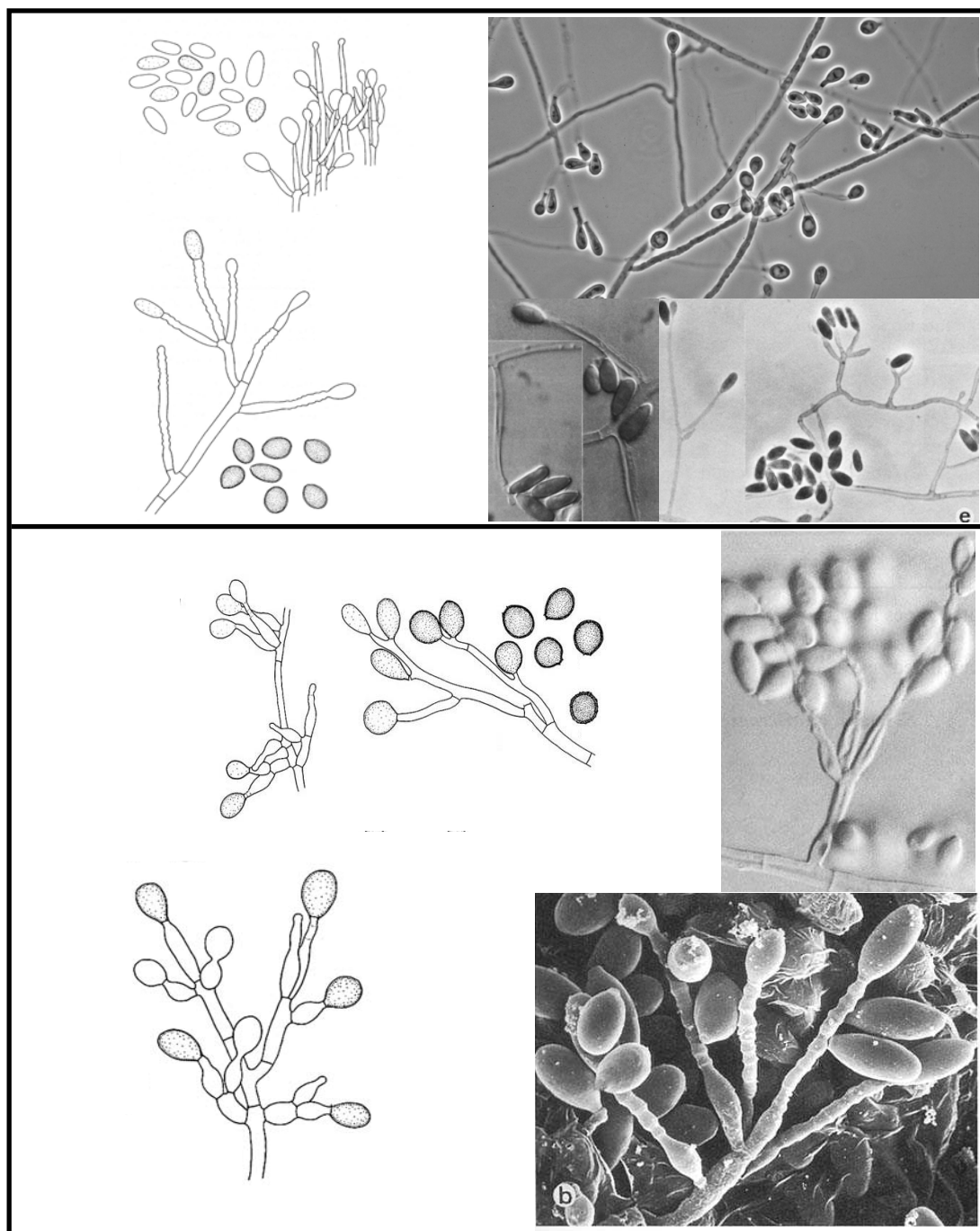


Figura 1. *Scedosporium prolificans* i *S. apiospermum* (de dalt a baix).

Esquemes i microfotografies de les hifes, conidis, i fiàlides de les dues espècies.

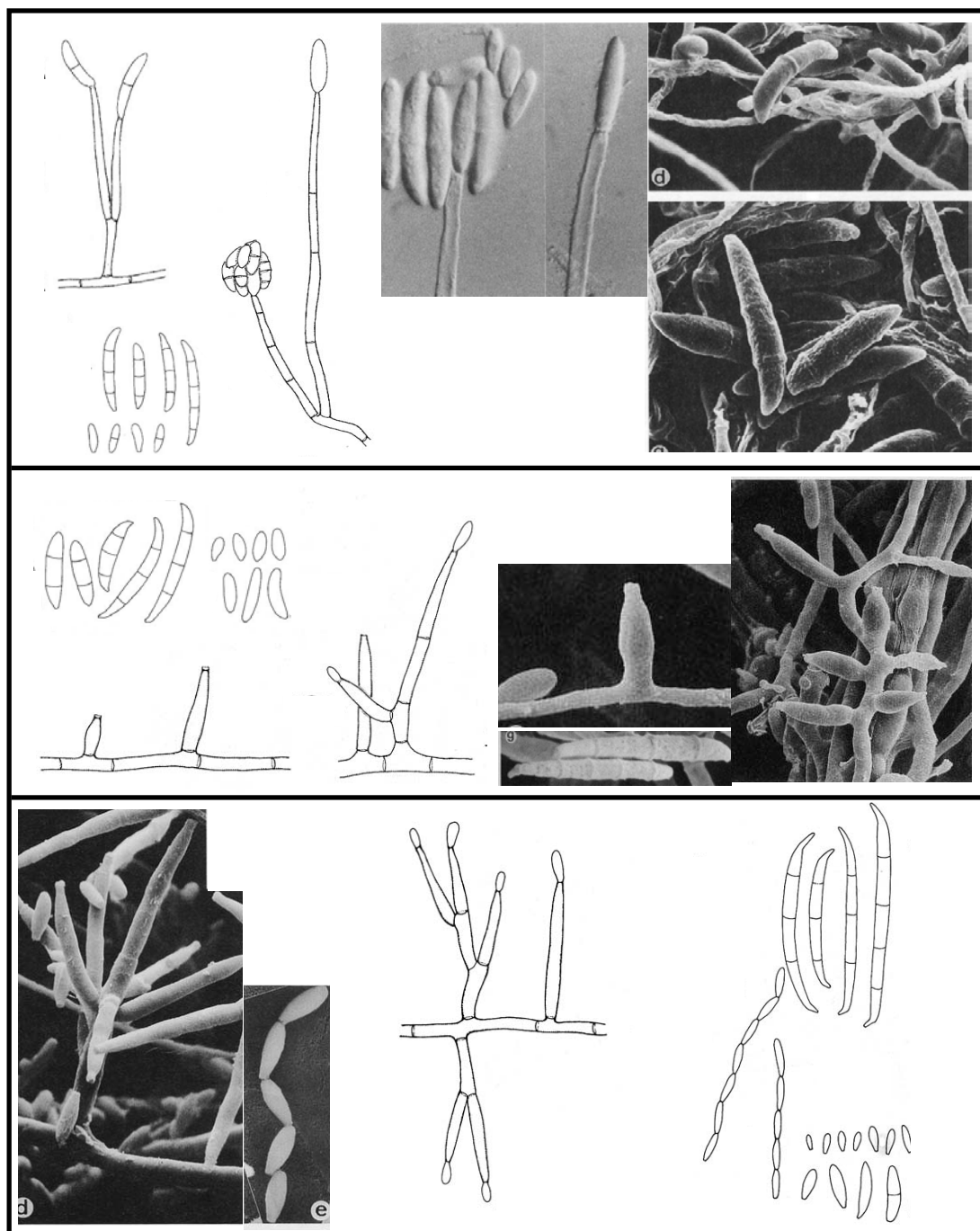


Figura 2. *Fusarium solani*, *F. oxysporum* i *F. verticillioides* (de dalt a baix).

Esquemes i microfotografies de les hifes, conidis i conidiòfors de les tres espècies.

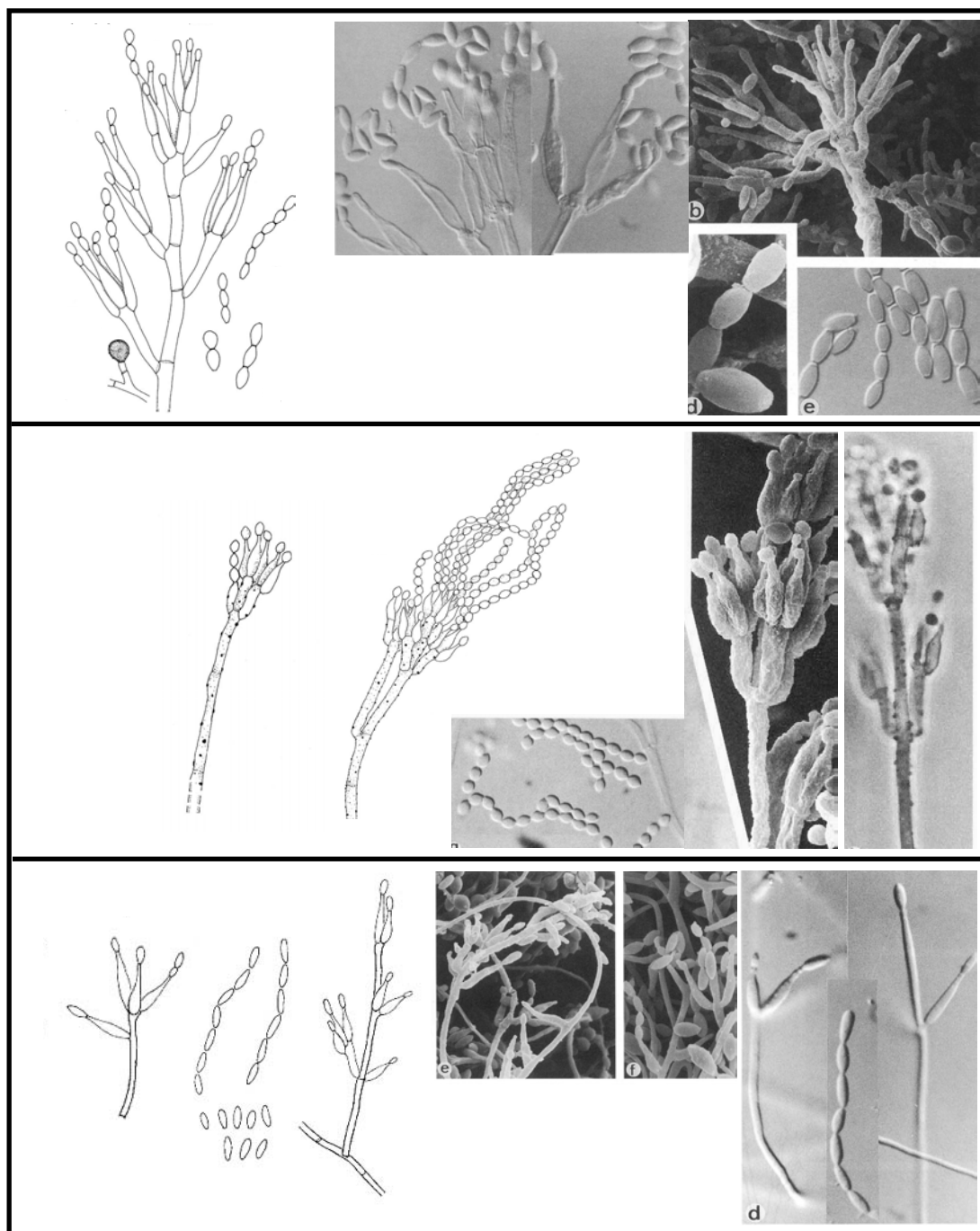


Figura 3. *Paecilomyces variotii*, *P. lilacinus* i *P. javanicus* (de dalt a baix).

Esquemes i microfotografies de les hifes, conidis i conidiòfors de les tres espècies.

1.4.2. TRACTAMENT DE LA INFECCIÓ FÚNGICA INVASORA

En l'hoste immunocompetent, la cirurgia, la instil·lació local d'antifúngics (intraocular, o intra-articular), i la teràpia antifúngica sistèmica poden resultar curatives. En l'hoste immunodeprimit el factor crític per un resultat favorable és recuperar-se de la immunosupressió. En aquest tipus de pacient, la cirurgia és rarament una opció degut a la trombocitopènia severa (Dignani *et al.* 2003). Per tant, l'esforç principal s'hauria d'enfocar a la prevenció d'aquestes infeccions en aquesta població de pacients i a millorar l'estatus del sistema immunitari del pacient quan ja s'ha produït la infecció, incloent com a punts principals:

- Eliminació o reducció de les dosis de fàrmacs immunosupressors (citotòxics), com els corticosteroids
- Infusió de cèl·lules mare pròpies si l'empelt de moll d'os es retarda
- Transfusió de granulòcits de donants tractats amb factor estimulador de colònies de granulòcits (G-CSF), factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF) i dexametasona
- Administració de citoquines recombinants (G-CSF, GM-CSF, o interferó- γ)

L'amfotericina B s'utilitza amb molta freqüència per tractar infeccions invasores i disseminades, i com a tractament empíric en malalts de càncer o trasplantats (Boutati i Anaissie 1997). Malgrat tot, la teràpia antifúngica s'hauria de basar en un patró conegut de la sensibilitat als antifúngics del patogen en qüestió i hauria de perllongar-se fins a dues setmanes després de la resolució de qualsevol troballa clínica o analítica d'infecció i de la recuperació de la immunosupressió (Bouza *et al.* 1996, Anaissie *et al.* 1988). De vegades, una teràpia per una infecció fúngica, especialment en les causades per fongs filamentosos, requerirà actuacions mèdiques i quirúrgiques coordinades, per poder tenir èxit. Hi ha

diversos estudis que relacionen una concentració mínima inhibidora (CMI) d'amfotericina B superior a 1 µg/ml amb fracassos terapèutics en les infeccions causades per *Aspergillus fumigatus* (Moore *et al.* 2000), però no hi ha estudis que relacionin la sensibilitat *in vitro* amb la resposta experimental o amb la resposta clínica per l'amfotericina B per cap de les espècies estudiades, si bé sembla lògic pensar que quan s'obtenen valors molt elevats de CMI *in vitro*, hi haurà poques possibilitats d'observar una resposta al tractament *in vivo*.

Infeccions específiques

Fusarium spp.

No s'ha establert encara el tractament òptim per les fusariosis disseminades. S'han utilitzat tractaments amb dosis altes d'amfotericina B, formulacions lipídiques d'amfotericina B, i una combinació d'altres agents antifúngics combinats amb amfotericina B, amb un èxit variable (Boutati i Anaissie 1997). També s'associa amb una millor prognosi l'eliminació de catèters. Les dades de sensibilitat *in vitro* a diversos antifúngics són limitades. Cal destacar la poca sensibilitat a la 5-fluorocitosina, al miconazol, i a l'itraconazol. L'amfotericina B mostra una activitat variable davant de les diverses espècies de *Fusarium*. La natamicina ha demostrat ser efectiva per tractar queratitis, però aquest antifúngic no està disponible per administrar-lo de forma sistèmica. En alguns casos en els quals els pacients no responien al tractament convencional basat en l'amfotericina B desoxicolat, s'ha observat que milloraven quan es canviava a complex lipídic d'amfotericina B, o bé amfotericina B liposòmica (Cofrancesco *et al.* 1992). Respecte dels fàrmacs antifúngics desenvolupats recentment, la caspofungina no sembla activa davant de *Fusarium* spp., i el voriconazol, malgrat que la seva activitat *in vitro* es limitada, s'ha administrat amb èxit en alguns casos, encara que sigui de forma ocasional (Consigny *et al.* 2003).

La major part dels pacients amb infeccions disseminades per *Fusarium* associades a

neutropènia profunda persistent, moren a causa de l'avanç de la infecció malgrat l'administració de qualsevol teràpia (Guarro i Gené 1995). L'estat immunitari de l'hoste és el factor més important a l'hora de predir el desenvolupament i el desenllaç de la infecció disseminada (Boutati i Anaissie 1996).

Actualment els tractaments es basen en l'administració de dosis elevades de formulacions lipídiques d'amfotericina B o nous triazols. També juga un paper important l'eliminació (desbridatge o resecció quirúrgica) de qualsevol teixit infectat (sinus, ull, teixit tou, os, ...) i, pel que fa a la neutropènia, la transfusió de granulòcits obtinguts mitjançant G-CSF i GM-CSF.

Scedosporium spp.

Les dades *in vitro* i *in vivo* mostren que *S. apiospermum* és resistent a l'amfotericina B i la 5-fluorocitosina i sensible als azols, incloent el voriconazol, desenvolupat recentment (Espinell-Ingroff 2001b). La resecció quirúrgica és clau per un desenllaç exitós si les lesions són localitzades (lesió pulmonar cavitant, sinusitis, artritis o osteomielitis). El tractament recomanat es basa en l'itraconazol intravenós o el voriconazol si se'n disposa. El desenllaç terapèutic és normalment dolent en el cas d'immunosupressió persistent. Hi ha alguns casos en els quals s'ha pogut resoldre la infecció i que poden servir de guies per establir les teràpies més adequades, com per exemple utilitzar una combinació de teràpia antifúngica i interferó- γ , que va donar bon resultat i va permetre controlar la infecció disseminada en un pacient amb malaltia granulomatosa crònica (Dignani *et al.* 2003).

S. prolificans ha demostrat ser resistent a tots els antifúngics tant *in vitro* com *in vivo* (Carrillo i Guarro 2001). El desbridament quirúrgic del teixit afectat és la millor manera d'aturar la progressió de la infecció en els casos en els que aquesta infecció és localitzada i afecta pell, ossos i articulacions. Les infeccions greus i disseminades són freqüentment fatals (Álvarez

et al. 1995, Revankar *et al.* 2002).

1.5. ANTIFÚNGICS

El terme antibiòtic antifúngic o antimicòtic inclou aquelles substàncies que poden produir una modificació en l'estructura fonamental de la cèl·lula fúngica que inhibeixi el seu desenvolupament, alterant la seva viabilitat o capacitat de supervivència sense alterar les cèl·lules de l'hoste (Kerridge i Vanden Bossche 1990).

Els antifúngics es classifiquen en base a la seva estructura química, el seu origen (produïts per organismes vius o obtinguts per síntesi química), el seu espectre (ampli o restringit), i el mecanisme d'acció (Carrillo-Muñoz *et al.* 1999).

Prenent com a referència la quantitat d'antibiòtics antibacterians que existeixen en l'actualitat, s'observa que d'antifúngics n'hi ha una quantitat molt menor, encara que de forma lenta es va incrementant. Aquest fet es deu bàsicament a la gran similitud que existeix entre les cèl·lules fúngiques i les cèl·lules animals, i que fa que pràcticament qualsevol molècula que es trobi com a diana en un fong es trobi també en una cèl·lula humana (Revankar i Graybill 2003). La major part dels antifúngics desenvolupats fins ara tenen com a blanc d'acció l'ergosterol, ja sigui en algun dels passos de la seva síntesi (azols) o en la seva forma final quan es troba formant part de la membrana cel·lular (amfotericina B). Altres antifúngics tenen com a blanc d'acció els àcids nucleics o els diversos components de la paret del fong (Debono i Gordee 1994). Malgrat tot, s'estan explotant noves dianes que es troben només a les cèl·lules dels fongs (factor d'elongació 3, els factors de ribosilació, diverses topoisomerases, inhibidors de l'adhesió), i s'han començat a desenvolupar alguns compostos que en un futur podrien tenir importants aplicacions en clínica (Revankar i Graybill 2003). Aquesta àrea té actualment un desenvolupament molt important perquè cada dia es fa més necessari trobar nous antifúngics que siguin menys tòxics, però que tinguin

una potència elevada.

1.5.1. POLIENS

Són substàncies antibiòtiques sintetitzades per actinomicets del gènere *Streptomyces* i van ser els primers antifúngics que es van desenvolupar. Se'n coneixen més de 100 compostos diferents, dels quals el més important és l'amfotericina B, encara que també hi ha altres compostos amb rellevància clínica com la nistatina o la tricomicina.

L'activitat antifúngica dels poliens es basa en la seva capacitat per unir-se a l'ergosterol, que és el principal lípid que forma la membrana dels fongs. Aquestes substàncies, en unir-se a l'ergosterol provoquen la formació de petits canals que permeten la sortida de petites molècules de l'interior de la cèl·lula fúngica i l'entrada d'altres (Revankar i Graybill 2003). La seva acció requereix només uns minuts per alterar l'equilibri osmòtic de la cèl·lula fúngica i provocar-ne la mort.

L'**amfotericina B** és una substància antifúngica que es va obtenir de l'actinomicet *Streptomyces nodosus* l'any 1956 (Stockstill i Kauffman 1983). Es va comercialitzar per a ús clínic a finals dels anys 50. Malgrat la seva antiguitat és sense cap mena de dubte encara el fàrmac més utilitzat, en part perquè ha estat durant molt de temps l'únic fàrmac del que es disposava per tractar les infeccions fúngiques disseminades. L'amfotericina B té normalment un efecte fungicida, que fa que sigui preferida davant dels azols, que tenen efecte fungistàtic.

En general l'espectre d'acció de l'amfotericina B és força ampli, però de vegades es detecten algunes soques resistents en espècies teòricament sensibles com passa en diverses espècies el gènere *Candida*. A més hi ha algunes espècies que són resistents, com per exemple *Fusarium* spp., *Scedosporium prolificans*, *Pseudallescheria boydii*, *Aspergillus terreus*, *Trichosporon* spp. o *Malassezia furfur* (Graybill 2000a).

Malgrat que l'activitat *in vitro* de l'amfotericina B davant de la majoria dels fongs filamentosos i dels llevats és prou elevada, existeixen una sèrie de factors que han fet que el seu ús en clínica hagi estat marcat per restriccions en la dosificació i en la durada dels tractaments. Un dels problemes principals ha estat durant molt de temps que la formulació utilitzada (desoxicolat d'amfotericina B) presenta una elevada toxicitat, provocant alteracions bàsicament en la funció renal (Deray 2002). Els efectes adversos provocats per l'administració d'aquest fàrmac són bàsicament calfreds, tremolors i vòmits, dolor articular, i muscular, però sobretot un deteriorament de la funció renal que en molts casos fa necessari l'abandonament de la teràpia (Richardson i Kokki 2001). L'absència durant molt de temps d'un tractament alternatiu eficaç i menys tòxic ha fet que es seguís administrant el desoxicolat d'amfotericina B en la majoria de les infeccions sistèmiques.

En algunes infeccions causades sobretot per llevats (candidèmia, candidiasi disseminada, meningitis per criptococ, criptococosi invasiva) s'ha demostrat que l'associació de l'amfotericina B amb la 5-flucitosina augmenta l'eficàcia del tractament. Les associacions d'amfotericina B amb azols no es recomanen en general, però sí en cas de tractaments seqüencials, administrant amfotericina B durant un temps, i després canviant a algun azol, com per exemple el fluconazol (candidiasi disseminada, endoftalmitis per *Candida*, coccidiomicosi pulmonar, meningitis per *Coccidioides* o *Cryptococcus*, infeccions per *Penicillium marneffe*), o itraconazol (esporotricosi pulmonar o infeccions per *Penicillium marneffe*) (Richardson i Kokki 2001). Aquestes associacions, però, no han demostrat ser útils en infeccions provocades per altres fongs com per exemple *Fusarium* spp. (Guarro *et al.* 1999).

En l'actualitat, i malgrat que la formulació tradicional és encara la més emprada, s'han començat a utilitzar d'altres formulacions que permeten d'administració de dosis més elevades d'amfotericina B i presenten molts menys problemes de toxicitat. Aquestes noves formulacions són l'amfotericina B liposòmica, el complex lipídic d'amfotericina B i

l'amfotericina B en dispersió col·loïdal (Graybill 1996).

D'entre totes les noves formulacions de l'amfotericina B, la que presenta una reducció més important de la toxicitat és l'**amfotericina B liposòmica**. Aquesta formulació, comercialitzada per Gilead Sciences amb el nom comercial d'AmBisome, incorpora l'amfotericina B a la bicapa d'un liposoma unilaminar específicament dissenyat, amb un diàmetre al voltant dels 80 nm. Els liposomes que s'utilitzen s'elaboren amb fosfolípids purs que porten cadenes laterals d'àcids grassos saturats i incorporen colesterol. Com a components del liposoma d'AmBisome es van escollir molècules amfipàtiques de fosfatidilcolina de soja hidrogenada i diestearoil fosfatidil glicerol, que augmenten la estabilitat i rigidesa de la formulació final. El colesterol incrementa en un grau molt considerable l'estabilitat liposòmica, sobretot en presència de plasma. La lipofília de l'amfotericina B permet que aquesta molècula s'integri a la membrana bicapa del liposoma mitjançant l'associació no covalent amb els fosfolípids i el colesterol que formen la membrana. La seva composició i estructura són responsables de les seves propietats farmacocinètiques, de la seva seguretat, tolerància i perfil terapèutic (Boswell *et al.* 1998).

1.5.2. ANÀLEGS PRECURSORS D'ÀCIDS NUCLEICS. ANTIMETABOLITS

La **5-fluorocitosina** és l'únic exemple d'aquesta classe. De fet es va desenvolupar inicialment com un fàrmac anticancerigen, i posteriorment se li van detectar les propietats antifúngiques. La 5-fluorocitosina s'activa un cop és a dins del fong i es desamina, convertint-se en 5-fluorouracil. La molècula de 5-fluorouracil és una pirimidina i actua com a anàleg de base perquè s'incorpora al RNA del fong en substitució de l'uracil. Aquesta molècula és la que actua com antimetabòlit i provoca una síntesi incorrecta de DNA del fong i de diverses proteïnes (Graybill 2000a). Degut al fet que els fongs poden desenvolupar resistència a la flucitosina en molts punts diferents, incloent l'absorció i la desaminació del compost actiu, aquest antifúngic s'administra generalment en combinació amb l'amfotericina

B o fluconazol per millorar-ne l'eficàcia. El seu espectre d'activitat es limita, però als **llevats**, i més concretament a algunes espècies del gènere *Candida* i a *Cryptococcus neoformans* (Edwards 1997). Cal tenir en compte, però, que el 5-fluorouracil té un important efecte immunosupressor, i de fet l'hem utilitzat en els estudis *in vivo* per immunodeprimir els animals conjuntament amb la ciclofosfamida.

1.5.3. AZOLS

Aquesta és la classe d'antifúngics que té més representants. El seu mecanisme bàsic d'acció és comú. S'uneixen a la lanosterol desmetilasa, un enzim del citocrom P450 que actua en un pas inicial de la síntesi de l'ergosterol. Quan es bloqueja l'activitat d'aquest enzim, s'inhibeix la síntesi de l'ergosterol i es provoca l'acumulació de diversos esterols intermediaris. En conjunt això provoca la reducció de la integritat de la membrana cel·lular i l'alteració de l'activitat de diversos enzims oxidatius. Aquest efecte d'inestabilització de la membrana és molt més lent que en el cas de l'amfotericina B i fa que els azols es considerin fungistàtics i no fungicides (Como i Dismukes 1994).

Els primers azols (imidazols) es van desenvolupar a finals dels anys 60, encara que els primers representants van resultar molt tòxics quan s'administraven sistèmicament (**clotrimazol**, **miconazol**), i van quedar només com a antifúngics d'ús tòpic. El clotrimazol provocava l'autoinducció dels enzims de degradació del fetge, convertint-lo en un fàrmac suïcida. En el cas del miconazol, aquest antifúngic encara s'utilitza per tractar algunes micosis disseminades resistents, com les provocades per *S. proliferans*, encara que presenta nombrosos problemes de toxicitat. Als anys 80 es va desenvolupar el **ketoconazol**, que va ser el primer antifúngic imidazòlic que es va poder administrar oralment. Malgrat els nombrosos efectes secundaris que anaven des de nàusees, vòmits, hepatitis i polihipoendocrinopaties, fins a alteracions en el cicle menstrual, pèrdua del color del cabell, i alteracions en el metabolisme de la vitamina D o hiperlipidèmies, el ketoconazol es va

convertir en el primer triazol d'ampli espectre i va demostrar activitat en moltes infeccions sistèmiques per *Candida*, feohifomicosis, i esporotricosis (Edwards 1997). Actualment el seu ús és principalment tòpic perquè hi ha altres azols menys tòxics, del grup dels triazols, que l'han desplaçat en els tractaments sistèmics.

Els nous azols desenvolupats a partir del ketoconazol són els triazols, i es poden agrupar en dues classes. Tenen en comú que la toxicitat és molt més baixa, en part perquè l'afinitat per l'enzim diana del fong és molt més alta que per l'enzim homòleg humà, i en part també perquè els problemes farmacocinètics que presentaven els primers imidazols es van poder resoldre.

La primera classe de triazols té només un representant que és el **fluconazol**. Aquest antifúngic és soluble en aigua, té pocs problemes de toxicitat i es pot administrar tant per via oral com intravenosa. Com a inconvenients cal assenyalar que el seu espectre d'acció està pràcticament reduït als llevats dels gèneres *Candida* i *Cryptococcus* i als fongs que provoquen micosis endèmiques (Goa i Barradell 1995).

La segona classe de triazols té diversos representants, dels quals els més importants són l'itraconazol, el voriconazol, el ravuconazol i el posaconazol. Tenen una afinitat més elevada per les membranes fúngiques que per les de les cèl·lules dels mamífers, i són més potents que el fluconazol. Són en general poc solubles en aigua i requereixen vehicles especials per poder ser administrats per via oral o intravenosa. L'**itraconazol** fins fa molt poc temps només es podia administrar per via oral en forma de càpsules o xarop. L'absorció no supera el 55% en aquestes formulacions, i a més depèn molt del pH de l'estómac i de si s'administra amb menjar, sobretot en el cas de les càpsules. A més, aquest fàrmac provoca nombroses interaccions farmacocinètiques. En l'actualitat s'ha aprovat la formulació intravenosa en alguns països, que permet assolir concentracions elevades en sèrum més ràpidament que amb les formulacions orals i té una absorció del 99% (Richardson i Kokki 2001). Aquesta formulació permet disposar d'un nou fàrmac parenteral amb activitat davant

d'*Aspergillus*.

En el cas del **posaconazol** el problema de la baixa solubilitat s'ha resolt administrant un profàrmac que és hidrosoluble i que es converteix *in vivo* en la fórmula activa. Les interaccions amb altres fàrmacs són destacables i també hi ha efectes secundaris indesitjables i que encara no estan completament estudiats, com per exemple les lesions neurològiques amb desmielinització (mielitis transversa) que provoca el posaconazol en gossos després de tractaments perllongats. El posaconazol està actualment al final de l'etapa dels assajos clínics, encara que de moment no s'ha comercialitzat a l'estat espanyol. Hi ha diversos articles que li atorguen una efectivitat elevada en infeccions que no havien respost a la teràpia clàssica basada en l'amfotericina B, com per exemple els casos de zigomicosi causada per *Rhizopus* i hialohifomicosi causada per *Acremonium*, descrits per últimament (Herbrecht et al. 2002, Tobón et al. 2003).

El **voriconazol** és estructuralment similar al fluconazol i s'està desenvolupant per poder ser administrat per via intravenosa i oral. Està actualment en la fase d'assajos clínics. S'han descrit alguns casos en els que ha estat efectiu en infeccions per *Aspergillus* spp. i en una cas d'infecció disseminada per *Paecilomyces lilacinus* en un pacient amb SIDA, encara que són molt pocs per poder establir cap conclusió (Schwartz et al. 1997, van't Hek et al. 1998, Martin et al. 2002). També s'han descrit casos d'infeccions causades per *S. apiospermum* i *S. prolificans* que han respost al voriconazol sol o bé combinat amb terbinafina (Bosma et al. 2003, Howden et al. 2003, Muñoz et al. 2000).

El **ravuconazol** s'està desenvolupant per ser administrat per via oral. Té una vida mitja molt llarga, que segurament permetrà l'administració d'una única dosi diària.

L'**albaconazol** és un fàrmac que actualment es troba en la fase II del seu desenvolupament. Hi ha estudis que demostren que té una certa activitat contra *Scedosporium prolificans* *in vitro* (Carrillo i Guarro 2001) i *in vivo* (Capilla et al. 2003).

1.5.4. AL·LILAMINES

Les al·lilamines són una nova classe d'inhibidors de la biosíntesi de l'ergosterol. Actuen de manera diferent que qualsevol altre agent antifúngic inhibidor de l'ergosterol, tant a nivell funcional com a nivell químic. Tenen com a representants més importants la terbinafina i la naftina.

La **terbinafina** bloqueja la ruta de síntesi de l'ergosterol en el primer pas, que és en el que l'enzim esqualè epoxidasa transforma l'esqualè en ergosterol. A diferència dels azols l'enzim bloquejat no depèn del citocrom P450. Com a resultat s'acumula esqualè al citoplasma i disminueix la quantitat d'ergosterol a la membrana plasmàtica. En aquest cas la cèl·lula fúngica no només veu reduïda la seva capacitat de creixement degut a la deficiència en ergosterol, sinó que a més l'esqualè resulta tòxic pel fong quan s'acumula en grans quantitats. Malgrat el seu efecte fungicida i la seva elevada activitat *in vitro* per una gran varietat d'espècies, la terbinafina, encara que s'administri de forma sistèmica (oral o intravenosa), es concentra ràpidament a l'estrat corni lipofílic, als fol·licles pilosos i al cabell (Hosseini-Yeganeh i McLachlan 2002). És per això que les indicacions d'aquest antifúngic es limiten a les infeccions cutànies, bàsicament a les produïdes per fongs dermatòfits.

1.5.5. EQUINOCANDINES I PNEUMOCANDINES

La paret de les cèl·lules fúngiques està formada per un entramat de fibres de glucà que manté la forma de la cèl·lula i la protegeix dels canvis osmòtics del medi exterior. Les candines són polipèptids cíclics que bloquegen la síntesi del glucà, que és el polímer que constitueix el principal component de la paret fúngica. Actuen inhibint l'enzim (1,3)-B-D-glucano sintetasa, que és l'encarregat de formar els polímers de glucà de la paret fúngica. Aquest enzim no es troba en les cèl·lules animals i per això constitueix una bona diana. Són antifúngics amb una alta toxicitat selectiva (només actuen en les cèl·lules dels fongs), i a

més poden ser utilitzats en cas d'observar-se resistències als azols perquè les dianes són totalment diferents.

El primer antifúngic d'aquest grup, la **ciclofungina**, no va tenir èxit perquè el vehicle que necessitava per la seva administració era tòxic, però va servir per desenvolupar-ne d'altres com la **caspofungina** (MK-0991), la **micafungina** (FK463) i l'**anidulafungina** (Ver-02). La caspofungina és la que està més avançada en el procés de desenvolupament. Ha estat aprovada recentment als Estats Units, però només pel tractament de l'aspergil·losi en pacients refractaris o intolerants a d'altres teràpies. Els altres dos representants d'aquesta classe d'antifúngics (micafungina i anidulafungina) estan encara en estudis clínics i, concretament l'anidulafungina, s'està estudiant pel tractament de la candidiasi esofàgica (Pacetti i Gelone 2003).

1.6. DETERMINACIÓ DE LA SENSIBILITAT ALS ANTIFÚNGICS

Els mètodes i tècniques d'estudi de la sensibilitat *in vitro* dels fongs als agents antifúngics són similars a les dels antibacterians, i el seu disseny segueix les mateixes directrius (Espinel-Ingroff i Shadomy 1989, Shadomy i Shadomy 1991). La tècnica més utilitzada pels fongs filamentosos és la dilució en medi líquid (micromètode), encara que per alguns fongs de creixement molt lent com els dermatòfits encara s'utilitza el mètode de difusió en agar (Shadomy *et al.* 1991). Mitjançant aquestes tècniques es pot quantificar l'activitat de l'antifúngic, expressada com la CMI o la concentració mínima letal (CML). Així es pot avaluar la sensibilitat *in vitro* d'un fong a un o més antifúngics, correlacionar aquests resultats amb l'activitat dels fàrmacs en estudis *in vivo* i predir el pronòstic terapèutic. És útil també per detectar el desenvolupament de soques resistents i determinar el potencial valor terapèutic d'un nou agent antifúngic (Espinel-Ingroff 1994). Per desgràcia el procés requerit per l'estandardització de les proves d'estudi dels antifúngics ha estat lent, degut al gran nombre de variables que poden influir en els resultats, com són: el medi de cultiu, el pH del medi, la

densitat de l'inòcul, la temperatura i el temps d'incubació (Pfaller i Rinaldi 1992, Espinel-Ingroff i Shadomy 1989, McGinnis i Rinaldi 1991, Shadomy *et al.* 1991, Doern *et al.* 1986, Rex *et al.* 1993, Pujol *et al.* 1997a) i també de les característiques inherents dels fongs com són, la gran varietat de morfològica que existeix entre les diferents espècies de fongs filamentosos i el seu creixement lent, sobretot en algunes espècies (Espinel-Ingroff 1994). Els estudis que han avaluat les correlacions *in vitro* – *in vivo* són molt escassos, i això fa que es posi en dubte la utilitat dels resultats obtinguts en estudis *in vitro* (Kobayashi i Spitzer 1989). Malgrat tot, aquestes proves han jugat un paper important en el desenvolupament dels nous antifúngics, així com també en les avaluacions *in vivo* que precedeixen als estudis clínics. El seu veritable valor al laboratori clínic, no ha estat encara completament establert.

Els mètodes per determinar la sensibilitat dels fongs *in vitro* no va tenir cap rellevància fins als anys 70, quan es van començar a utilitzar els primers azols. Cal tenir en compte que el primer antifúngic es va descobrir 30 anys després del primer antibacterià, i que van passar gairebé 20 anys abans que la determinació de la sensibilitat tingués algun sentit, ja que la 5-fluorocitosina i els primers azols no es van introduir fins als anys 70, i no existien alternatives a l'amfotericina B. Les proves de sensibilitat als antifúngics porten uns 50 anys de retràs respecte de les proves de sensibilitat als antibiòtics (Revankar i Graybill 2003).

És per això potser, que els mètodes per avaluar la sensibilitat dels fongs filamentosos més freqüents als diversos antifúngics no ha estat estandarditzada fins l'any 2002 (NCCLS M38-A). També hi pot haver influït el fet que les infeccions per fongs són molt menys freqüents que les infeccions bacterianes, i això implica que hi ha un nombre inferior de dades per establir possibles correlacions. Tenir una important quantitat de dades acumulades és el més important a l'hora de poder establir els punts crítics i poder separar les soques sensibles de les resistents.

1.6.1. MÈTODES *IN VITRO*

L'any 1982 el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), va crear un subcomitè per mirar d'estandarditzar les proves de sensibilitat als antifúngics. El seu objectiu va ser unificar els criteris metodològics, primer pels llevats i més tard pels fongs filamentosos, a fi d'establir les correlacions entre els resultats obtinguts al laboratori i en clínica.

1.6.1.1. ELS LLEVATS

La primera iniciativa del subcomitè, l'any 1986, va ser realitzar una enquesta amb la finalitat de conèixer l'estat dels estudis de sensibilitat *in vitro* dels antifúngics als Estats Units (Calhoun *et al.* 1986). Els resultats de les enquestes, enviades a 350 hospitals amb més de 300 llits, van mostrar que, malgrat que existia un gran interès per ells, molt pocs hospitals en realitzaven, i els que ho feien, només els utilitzaven per llevats. La major part dels hospitals que realitzaven estudis de sensibilitat, utilitzaven el mètode de macrodilució en medi líquid, encara que la metodologia utilitzada era molt diversa.

Els anys 1987, 1988, 1990, i 1993 es van dur a terme quatre estudis col·laboratius en els quals es van anar perfilant quines eren les condicions amb les quals s'obtenia una major uniformitat en els resultats i que una millor correlació amb els resultats clínics. Els antifúngics assajats van ser l'amfotericina B, la 5-fluorocitosina i el ketoconazol, que eren els fàrmacs aprovats en aquella època als EEUU, pel tractament sistèmic de les micosis. Es va començar per comparar quatre mètodes de preparació de l'inòcul amb llevats. El mètode espectrofotomètric va ser el que va mostrar una més gran correlació dels resultats tant intra com entre els laboratoris participants. Tot això va ser corroborat posteriorment per altres autors (Espinell-Ingroff i Kerkering 1991, Espinell-Ingroff *et al.* 1992, Fromtling *et al.*, 1993, Pfaller *et al.*, 1990). Posteriorment es van avaluar quatre medis de cultiu: YNB (medi amb

base de nitrogen per llevats) glucosat, H-R, medi sintètic d'aminoàcids, i RPMI-1640, tots ells tamponats amb MOPS (àcid morfolinopropanosulfònic) a pH 7.0, i es van comparar dues temperatures d'incubació (30 i 35°C). Finalment es va establir el criteri de lectura dels resultats obtinguts per cada un dels antifúngics testats. Com a resultat de tots aquests estudis realitzats de forma col·laborativa entre diferents laboratoris, l'any 1992 es va poder redactar una proposta, el document M27-P. Durant els quatre anys següents (1992-1996), es van establir els rangs de referència de les CMI's dels antifúngics disponibles per dues soques control. A més també es van establir les condicions pel mètode de microdilució, en paral·lel al mètode de macrodilució. Aquesta informació es va incloure en una versió revisada publicada l'any 1995 (M27-T). En una revisió posterior el subcomitè va centrar la seva atenció en desenvolupar punts de tall significatius pels diferents antifúngics, (Rex *et al.* 1997) i que van ser inclosos al document M27-A publicat l'any 1997 (NCCLS M27-A). A partir d'aquell moment, el subcomitè va establir rangs de referència per les CMI's llegides a 24 i 48 hores per tots els antifúngics, tant els tradicionals com els nous (Barry *et al.* 2000). Els resultats d'aquest estudi estan recollits al document M27-A2 actual.

1.6.1.2. ELS FONGS FILAMENTOSOS

Prenent com a punt de partida les condicions bàsiques acordades al document M27-A, el subcomitè de la NCCLS va formar un grup per fer estudis, recollir dades, i refinar la metodologia per poder realitzar els estudis de sensibilitat amb els fongs filamentosos. Espinel-Ingroff i Kerkering en un estudi publicat l'any 1991 van avaluar el mètode espectrofotomètric per la preparació de les suspensions de conidis que constitueixen l'inòcul en el cas dels fongs miceliars (Espinel i Kerkering 1991). Es van assajar 25 soques de fongs filamentosos que incloïen *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Pseudallescheria boydii* i *Sporothrix schenckii*. Es van establir els rangs de % de transmittància als quals s'havia d'ajustar les suspensions de cada gènere tenint en compte la mida dels conidis dels

diferents fongs filamentosos. Ajustant a 78-82% de transmitància, s'obtenien inòculs de 0.8 a 5×10^6 ufc/ml. El medi de cultiu que el subcomitè va avaluar com a medi de referència potencial per realitzar els estudis de sensibilitat va ser l'RPML 1640, perquè havia donat bons resultats en els estudis per llevats. El subcomitè va avaluar també altres medis, però l'RPML permetia identificar la possible resistència de soques d'*Aspergillus* a l'itraconazol (Denning *et al.* 1997b). Per preparar l'inòcul es va continuar utilitzant les dilucions dels procediments prèviament aprovats pels llevats al document M27 (Pujol *et al.* 1997b).

Posteriorment el subcomitè de l'NCCLS va proposar un estudi multicèntric per avaluar per una banda el mètode per la preparació de suspensions de conidis recomanat per Espinel i Kerkering el 1991, i per l'altra, per comparar entre els mètodes de macro i microdilució en la determinació de l'activitat *in vitro* dels antifúngics davant dels fongs filamentosos (Espinel-Ingroff *et al.* 1995). Van participar sis laboratoris i es van utilitzar 25 soques que pertanyen a les espècies *Aspergillus flavus* i *A. fumigatus*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* i *Sporothrix schenckii*. La concentració dels inòculs formats per suspensions de conidis es va ajustar amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre a un valor de transmitància diferent per cada espècie assajada, i que en general oscil·lava entre el 68 i el 82%. Es va utilitzar el medi RPMI 1640, la temperatura va ser de 35°C i la concentració de l'inòcul utilitzat en ambdós mètodes va ser d'aproximadament 10^4 ufc/ml, en comptes del recomanat pels llevats que és de 10^3 ufc/ml. Els valors de CMI per l'amfotericina B, el fluconazol, l'itraconazol, el miconazol i el ketoconazol, en ambdós mètodes, van ser determinats a les 24 hores d'incubació en el cas de *Aspergillus* spp. i *Rhizopus arrhizus* i de 72 hores per la resta. La reproducibilitat (± 2 dilucions) dels resultats que es van obtenir pels mètodes de macro i microdilució va ser alta tant intra com entre els laboratoris participants i per tots els antifúngics assajats, excepte per l'itraconazol.

En estudis posteriors es va estudiar l'efecte de l'inòcul, per saber si hi hauria major concordança entre laboratoris utilitzant un inòcul final elevat (10^4 ufc/ml) o baix (10^3 ufc/ml).

També es va comparar el mètode de microdilució amb un mètode colorimètric comercialitzat (Alamar Blue) (Espinel-Ingroff 1994, Espinel-Ingroff *et al.* 1997, Pujol *et al.* 1997b, Espinel-Ingroff *et al.* 1998).

Com a resultat dels dos estudis col·laboratius es va assolir un acord pel que fa referència a les condicions de preparació de l'inòcul i la seva grandària, temps i temperatura d'incubació, formulació del medi, i criteris per la determinació de la CMI. Un estudi addicional va demostrar un cert grau de correlació entre els resultats dels tests *in vitro* i la resposta als tractaments en els estudis amb models animals (Espinel-Ingroff *et al.* 1997, Odds *et al.* 1998). Amb aquesta informació es va redactar el document M38-P, una proposta del mètode de referència que s'estava desenvolupant però que encara necessitava més estudis comparatius i, en general, que la major quantitat possible de laboratoris adoptessin aquest mètode de treball per tenir una visió més general de com funcionava. Van passar quatre anys fins que no es va publicar el document aprovat, el M38-A, que és pràcticament igual que el document de l'any 1998.

El mètode descrit en el document M38-A fa referència a un nombre molt limitat de gèneres de fongs filamentosos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallescheria boydii*, i la forma miceliar del fong dimòrfic *Sporothrix schenckii*). Amb posterioritat a la publicació del document aprovat, s'han realitzat més estudis col·laboratius per trobar les condicions més idònies per determinar la sensibilitat de fongs poc comuns als antifúngics clàssics i també als nous (Espinel-Ingroff *et al.* 2001a, Espinel-Ingroff *et al.* 2002).

1.6.2. MÈTODES *IN VIVO*. MODELS EXPERIMENTALS

Les proves realitzades amb animals d'experimentació són crucials pel desenvolupament de nous fàrmacs antifúngics. La major part dels antifúngics nous acostumen a ser anàlegs d'altres ja coneguts, però també n'hi ha que tenen blancs d'acció diferents. Tots ells es

proven primer *in vitro* davant d'un rang ampli de fongs per determinar si són capaços de alentir o impedir-ne el creixement. Després de moltes d'altres determinacions (solubilitat, toxicitat, efectes sobre el sistema immunitari) que es realitzen en cultius cel·lulars, el nou compost pot passar a la última fase de la investigació preclínica, els estudis en animals.

Per poder arribar als estudis clínics, primer el nou compost ha de demostrar la seva eficàcia *in vivo*. Cal escollir el model animal que pugui reproduir de forma adequada la infecció, i a més, els animals utilitzats poden reflectir les anormalitats a nivell immunitari que s'associen a certes infeccions per fongs. L'eficàcia de la teràpia es pot mesurar tant per la reducció de la càrrega fúngica als òrgans afectats, com per l'increment del temps de supervivència. Els models animals serveixen també per començar a establir les propietats farmacocinètiques del compost. Amb aquestes dades es pot triar la millor via d'administració, la distribució als teixits, la seva eliminació, i les possibles interaccions amb altres fàrmacs. Finalment, els models animals serveixen per determinar si el nou fàrmac es tolera bé. Aquestes determinacions inclouen mesures de toxicitat a curt i llarg termini i carcinogenicitat (Graybill 2000b).

Mesurar l'eficàcia *in vivo* és l'objectiu més important, i el primer que cal investigar un cop superades les proves *in vitro*. La demostració de l'eficàcia depèn molt de les condicions experimentals, i està influenciada per l'absorció, la distribució i l'eliminació de l'antifúngic, de la concentració i via d'administració de l'inòcul, de l'estat immunològic de l'hoste i de la durada del tractament. En general l'eficàcia del tractament es mesura mitjançant l'increment de la supervivència i la reducció de la quantitat de fong present als òrgans. Cada model té avantatges i desavantatges, i depèn de quin tipus d'infecció s'aplicarà als animals. Els estudis de supervivència tenen l'avantatge que demostren que el fàrmac és actiu i no tòxic pels animals d'experimentació. La mesura de la reducció de la quantitat de fong als òrgans permet comparar els recomptes realitzats en els animals tractats i en els controls. També permet comprovar la capacitat d'esterilitzar els òrgans, quan després d'homogeneïtzar un

òrgan sencer no s'hi detecta cap unitat formadora de colònia.

En general als estudis, a part d'un grup control tractat només amb placebo, també s'hi inclou un grup que rep el tractament tradicional. Aquest grup permetrà saber si el nou fàrmac té una activitat més elevada que el tradicional.

A més d'administrar tractament antifúngic, i sobretot en les infeccions per patògens oportunistes, és important tenir en compte l'estat immunològic de l'hoste. En general, les dosis d'inòcul que s'han d'administrar a animals immunocompetents perquè desenvolupin una infecció són molt superiors als que s'han d'administrar a animals neutropènics. A més, la evolució de la infecció no és la mateixa, i l'efecte exercit per l'antifúngic, sovint tampoc. De vegades no és possible instaurar una infecció si l'animal no es tracta amb fàrmacs citotòxics o corticosteroids, o bé no s'aconsegueix que una infecció pulmonar esdevingui disseminada (Kirkpatrick *et al.* 2000, Odds *et al.* 1998).

Els models animals ens permeten establir la infecció en l'òrgan que volem estudiar. Ens permeten alterar la immunitat dels animals per fer-los més semblants a la realitat clínica, i permeten modificar la via d'administració del tractament. Finalment ens permeten estudiar si les combinacions de dos antifúngics, o d'antifúngics i citoquines mostren un efecte superior quan s'administren conjuntament.

És important remarcar que les teràpies amb citoquines s'han combinat molts cops amb antifúngics tant en estudis *in vivo* com en pacients (Stevens 1998). Les respostes als tractaments amb citoquines no han estat suficientment estudiades, i de vegades, si la dosi administrada és massa elevada, es produeix toxicitat sistèmica deguda a un efecte exagerat produït sobre el sistema immunitari.

Malgrat que les proves preclíniques que es realitzen en animals són molt importants i necessàries, hi ha una sèrie de factors que no es poden oblidar. En primer lloc, les propietats farmacocinètiques difereixen molt entre espècies, i no es pot extrapolar

directament de la dosificació de models amb ratolins, per exemple, a aplicacions clíniques. L'eliminació dels fàrmacs es pot realitzar mitjançant mecanismes diferents i a velocitats també molt diferents. Aquest tipus de problemes s'han de tenir molt en compte i impedeixen de fer afirmacions sobre si un fàrmac és més potent que un altre, fins que no s'han administrat en estudis clínics tots dos. Per altra banda, els estudis amb animals molt petits, com els ratolins, són molt poc informatius pel que fa a la toxicitat del fàrmac en qüestió. Els estudis de toxicitat s'han de realitzar en un ventall ampli d'espècies animals i durant un temps suficient per poder demostrar l'absència de, per exemple, carcinogenitat.

Fins i tot els estudis *in vivo* realitzats amb la major cura no poden predir completament els resultats clínics, però ajuden a incrementar la probabilitat que el tractament administrat al primer pacient clínic sigui efectiu i no tòxic.

1.6.3. CORRELACIÓ IN VITRO-IN VIVO

La interpretació de les CMI de fongs filamentosos ha estat considerada sempre problemàtica. Per exemple, Dixon i Polak (1987) no van trobar cap relació entre les CMIs de l'amfotericina B, la 5 fluorocitosina, el fluconazol, el ketoconazol, l'amorolfina i la terbinafina obtingudes pel mètode de dilució en agar, i la resposta terapèutica en una infecció experimental, amb diverses espècies de fongs filamentosos implicats en feohifomicosi, (*Cladophialophora bantiana*, *Ochroconis constricta*, i *Wangiella dermatitidis*).

En un altre estudi força extens es comprovava la correlació de la sensibilitat *in vitro* de diverses soques de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Pseudallescheria boydii*, i *Rhizopus arrhizus* (Odds *et al.* 1998). Un cop més no es veia una bona correlació entre els valors de CMI, aquesta vegada obtingudes amb el mètode de referència del NCCLS i la resposta dels grups d'animals infectats amb les diferents soques estudiades. La poca correlació *in vitro-in vivo* es va relacionar amb variables no controlades que podien emascarar o confondre les

possibles correlacions. Amb aquest estudi també van quedar il·lustrades les limitacions dels models animals, quan no es van poder establir *in vivo* models d'infeccions per totes les soques.

Utilitzant una sèrie d'aïllaments clínics d'*A. fumigatus* el grup de Denning i col·laboradors van poder fer un pas important en aquesta àrea (Denning *et al.* 1997a, Denning *et al.* 1997b). Els treballs es van realitzar amb dues soques obtingudes de pacients que no van respondre al tractament amb itraconazol. Aquests aïllaments es van mostrar resistents en un estudi experimental i tenien CMI's d'itraconazol elevades, que es van detectar seguint les condicions descrites al document M38, però afegint un 2% de glucosa al medi RPMI. Aquestes condicions no van permetre, però, detectar *in vitro* la resistència a l'amfotericina B d'un aïllament obtingut d'un pacient que no havia respost a un tractament amb amfotericina B a altes dosis.

Malgrat tot, altres autors (Lass-Flörl *et al.* 1998) han pogut relacionar CMI's d'amfotericina B superiors a 1 µg/ml amb un percentatge elevat de fracassos terapèutics.

L'any 2000 Moore i col·laboradors van revisar tota la informació que existia fins llavors sobre aquest tema (Moore *et al.* 2000), i van arribar a la conclusió que és possible que en un futur no llunyà es pugui predir la resposta clínica de les soques d'*Aspergillus* a l'itraconazol, però que en el cas dels poliens, s'està encara molt lluny d'aconseguir-ho. Aquesta opinió és força compartida, perquè la correlació per l'itraconazol i *Aspergillus* és la única que de moment té prou base com per poder-se utilitzar com a predicció de l'evolució de la infecció en pacients clínics. Detectar resistència *in vitro* a l'amfotericina B és encara molt problemàtic (Rex *et al.* 2001). En aquest cas, és important poder identificar el fong a nivell d'espècie per detectar la resistència intrínseca relacionada amb espècies com *Aspergillus terreus*, *Scedosporium apiospermum* i *S. prolificans*.

2. OBJECTIUS I INTERÈS DEL TREBALL

Les teràpies comunament emprades pel tractament de les infeccions invasores causades per fongs oportunistes estan lluny de ser les òptimes. Aquestes infeccions en pacients amb malalties de base que n'alteren la immunitat, generalment no responen als tractaments actuals i la taxa de mortalitat associada és molt elevada. Malgrat que *Aspergillus* és responsable d'un elevat percentatge d'aquestes infeccions, hi ha altres gèneres com *Fusarium*, *Scedosporium* i *Paecilomyces* que també causen infeccions cada vegada més freqüents i que no tenen un tractament efectiu. Per tant, **contribuir a trobar nous tractaments front a aquests patògens emergents o millorar els ja existents** és l'objectiu principal d'aquesta tesi.

L'antifúngic que es sol emprar en la majoria d'infeccions causades per aquests fongs és l'amfotericina B, que és el de més ampli espectre, però el tractament acostuma a ser empíric ja que hi ha pocs estudis *in vivo* que demostrin l'efectivitat d'aquest fàrmac. En els últims anys, com hem dit abans, s'han desenvolupat noves formulacions que permeten administrar dosis més altes amb menys efectes secundaris. L'amfotericina B liposòmica és una d'elles, i la comparació de la seva eficàcia amb la de la formulació tradicional en el tractament de les infeccions invasores causades pels fongs esmentats, mereix ser investigada.

Per la recuperació d'una infecció invasora per fongs oportunistes, tant o més important que el tractament amb fàrmacs antifúngics, és l'estat immunològic dels pacients. Com és sabut, aquests fongs solen afectar a persones amb malalties de base importants i que pel seu tractament reben fàrmacs immunosupressors que produeixen al malalt un grau elevat de neutropènia. Per a què el tractament amb antifúngics tingui èxit és fonamental que el període de neutropènia sigui el més curt possible i que el pacient recuperi ràpidament els nivells normals de leucòcits. L'administració de citoquines pot ajudar a aquesta recuperació, i per tant també a resoldre la infecció. La incidència de les infeccions per fongs filamentosos és baixa, i en determinats hospitals la seva casuística és insignificant per poder dur a terme estudis d'eficàcia de fàrmacs que puguin ser concloents. S'obtenen resultats objectius quan

es realitzen estudis multicèntrics en els que participen molts hospitals, però tot i això, moltes d'aquestes infeccions es diagnostiquen malament i les espècies implicades sovint estan mal identificades. Una de les millors aproximacions a aquest problema, tot i sabent la distància filogenètica que hi ha entre els diferents animals d'experimentació i els humans, consisteix en l'avaluació de l'eficàcia dels fàrmacs en els models animals adequats. **Desenvolupar models animals que siguin reproduïbles i que puguin simular la infecció fúngica humana a fi i efecte de poder comparar l'eficàcia de l'amfotericina B desoxicolat i l'amfotericina B liposòmica, i avaluar l'eficàcia de les citoquines en el tractament de les infeccions per fongs oportunistes, és un altre dels objectius generals de la tesi.**

Els punts concrets d'aquest objectiu són:

- Desenvolupar un model reproduïble de fusariosi disseminada en ratolins.
- Desenvolupar un model reproduïble d'infecció disseminada per les espècies més importants de *Paecilomyces*.
- Desenvolupar un model reproduïble de d'infecció disseminada per *Scedosporium prolificans* en ratolins.
- Avaluar l'eficàcia d'un tractament amb dosis elevades d'amfotericina B liposòmica en un model de fusariosi disseminada en ratolins.
- Avaluar l'eficàcia d'un tractament amb dosis altes d'amfotericina B liposòmica en un model d'infecció disseminada per *Paecilomyces*.
- Avaluar l'eficàcia d'un tractament amb dosis altes d'amfotericina B liposòmica en un model d'infecció disseminada causada per *Scedosporium prolificans*.

Generalment els fongs que produeixen infeccions oportunistes són poc virulents, i per poder reproduir la infecció experimental en animals, aquests s'han d'immunosuprimir utilitzant diferents fàrmacs. En aquests models animals, l'efecte produït per les diferents teràpies immunosupressores aplicades, ha estat analitzat de forma parcial i utilitzant una gran

diversitat de metodologies que en fa difícil obtenir resultats concloents. **Comparar l'efecte dels fàrmacs immunosupressors i de les citoquines en les diferents poblacions de cèl·lules blanques dels ratolins és un altre dels objectius d'aquesta tesi.**

De forma més concreta:

- Comparar la disminució en els recomptes de leucòcits produïda per diversos fàrmacs immunosupressors (ciclofosfamida, 5-fluorouracil i cortisona) en ratolins.
- Avaluar l'efecte sobre els recomptes de leucòcits d'una citoquina, el G-CSF, en ratolins immunodeprimits, administrant-la de forma preventiva i terapèutica.

Es desconeix si les soques de les diferents espècies del mateix gènere procedents de diferents orígens, és a dir ambientals o clíniques, o que s'hagin aïllat de diferents formes d'infecció, presenten la mateixa virulència per l'hoste susceptible. Conèixer aquest punt seria interessant per poder generalitzar els tractaments. **Per tant, constitueix una altre objectiu general de la tesi, una vegada disposem dels models animals adequats, investigar si la virulència de soques d'una mateixa espècie però procedents de diferents orígens és igual o presenten diferències importants.**

Concretament:

- Comparar la virulència de diverses espècies del gènere *Paecilomyces*, en ratolins immunodeprimits.
- Comparar la virulència de les dues espècies, *S. prolificans* i *S. apiospermum*, en animals immunocompetents.
- Comparar la virulència en animals immunocompetents de soques ambientals i clíniques, i procedents de diferents orígens geogràfics de *Scedosporium prolificans*.

Per desgràcia, a part de l'amfotericina B que és, tal i com hem dit, el fàrmac més emprat per combatre les infeccions oportunistes per les espècies dels gèneres esmentats, els altres

antifúngics, tant els existents com els que estan en les fases finals d'experimentació, han demostrat poca eficàcia al menys *in vitro*, i els resultats clínics són molt escassos. **És per això que una línia d'investigació que hem considerat interessant ha estat poder demostrar el possible efecte sinèrgic d'algunes de les possibles combinacions de dos antifúngics. Aquesta investigació constitueix un altre objectiu de la tesi.**

Els objectius concrets d'aquest punt son:

- Avaluar l'activitat *in vitro* d'antifúngics tradicionals i nous, sols i en combinació davant de les tres espècies més comunes del gènere *Fusarium* seguint la metodologia del NCCLS amb algunes modificacions.
- Avaluar l'activitat *in vitro* d'antifúngics tradicionals i nous, sols i en combinació davant de les dues espècies més relacionades amb infeccions invasores del gènere *Paecilomyces* seguint la metodologia del NCCLS amb algunes modificacions.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. SOQUES UTILITZADES. CONSERVACIÓ.

Per la realització dels diferents estudis es van utilitzar un total de 30 soques de fongs filamentosos de vuit espècies diferents (Taula 1).

Taula 1. Relació de les soques utilitzades en els diferents estudis de la tesi.

Soca	Origen de la mostra
<i>Fusarium solani</i>	FMR 4391 (UTSCH 91-798) ^a Hemocultiu.
	FMR 6468 (CBS 166.87) Aïllat de terra de castanyer. Estats Units.
	FMR 6631 Mostra clínica de malalt hematològic.
	FMR 7139 (F-228) Aïllada de tortuga.
	FMR 6730 Ferida al cuir cabellut. Subministrada per la Dra. Amalia del Palacio de l'Hospital 12 de Octubre.
<i>Fusarium verticillioides</i>	FMR 6488 (H 375/96) Hemocultiu.
	FMR 7265 (238) Mostra clínica. Subministrada per la Dra. Maria del Carmen Rubio de l'Hospital Clínico de Zaragoza.
	FMR 4382 (UTSCH 91-1478) ^a Hemocultiu.
<i>Fusarium oxysporum</i>	FMR 4384 (UTHSC 89-1134) ^a Mostra de cervell (autòpsia).
	FMR 5205 (HUCFF 9443) ^b Subministrada pel Dr. Marcio Nucci, del HUCFF de Rio de Janeiro, Brasil.
	FMR 7241 (Soca 237) Lesió de pell. Subministrada per la Prof. Maria del Carmen Rubio de l'Hospital Clínico de Zaragoza.
<i>Paecilomyces variotii</i>	FMR 5515 (UTHSC 95-2515) ^a Biòpsia pulmonar.
	FMR 5516 (UTHSC 95-911) ^a Hemocultiu.
	FMR 5517 (UTHSC 95-366) ^a Oïda mitja.

	FMR 5518 (UTHSC 94-2617) ^a	Exsudat peritoneal.
	FMR 4647 (ATCC 36257)	Soca control.
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	FMR 5519 (UTHSC 95-2294) ^a	Biòpsia d'os.
	FMR 5522 (UTHSC 95-589) ^a	Líquid articular del genoll.
	FMR 5540 (170038)	Zoo de Londres. Pulmó d'au.
<i>Paecilomyces javanicus</i>	FMR 5796 (CBS 134.22)	Aïllat de l'abella <i>Stephanoderis</i> sp. Indonèsia.
<i>Scedosporium prolificans</i>	FMR 3569 (H 326.470)	Hemocultiu. Hospital de La Fe de València.
	FMR 6721	Terra. Jardí parc Güell. Barcelona.
	FMR 6802	Aire. Parc de la Creueta. Barcelona.
	FMR 6642	Esput. Hospital Vall d'Hebron, mostra 35.
	FMR 7252 (UTHSC 96-1714) ^a	Sinus frontal.
	FMR 6719	Fibrosi quística. Hospital 12 de Octubre.
	FMR 7257 (UTHSC 98-1371) ^a	Sinus maxil·lar.
	FMR 6649	Sang de catèter intravascular. Hospital Vall d'Hebron, mostra 160.
<i>Scedosporium apiospermum</i>	FMR 4167	Otitis humana. Valladolid.
	FMR 6649	Abscés cerebral.

FMR Facultat de Medicina de Reus.

UTHSC University of Texas Health Science Center. San Antonio, Texas, Estats Units.

HUCFF Hospital Universitario Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, Brasil.

^a Subministrada pel Dr. Rinaldi. UTHSC, Texas, Estats Units.

Els fongs es mantenen a temperatura ambient en tubs d'agar inclinat recoberts de vaselina

o com a suspensions de conidis en aigua destil·lada estèril. Per la obtenció dels inòculs, es subcultivaven les soques en plaques de PDA (agar de patata i dextrosa) i s'incubaven a 30°C durant 7-10 dies, fins que s'observava una correcta esporulació. En el cas de partir d'un tub de vaselina es feia una nova sembra als 4-5 dies per eliminar completament la vaselina del cultiu.

3.2. MODELS ANIMALS

3.2.1. ANIMALS

En tots els experiments es van utilitzar ratolins mascles OF1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) amb un pes mig de 30 g. Tots els estudis realitzats van ser aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat Rovira i Virgili.

Els animals es van estabular en condicions estàndard i amb accés lliure a l'aigua i al menjar. En el cas d'observar una disminució de la mobilitat o un cert grau d'atàxia en els animals, símptomes típics de la majoria de les infeccions fúngiques provocades, es canviava el tipus de bec del biberó d'aigua i es posava menjar a dins de la gàbia per facilitar l'alimentació. En cas que el patiment d'algun animal superés el màxim establert al protocol de supervisió era sacrificat mitjançant una sobredosi d'anestèsia.

3.2.2. FÀRMACS

Desoxicolat d'amfotericina B. Es va utilitzar el preparat comercial Fungizona[®], fabricat per Bristol-Myers Squibb Co., New Brunswick, New Jersey, EEUU, i distribuït per Squibb Industria Farmacéutica, S.A., de Barcelona). Es presenta en vials de 50 mg amb un liofilitzat d'amfotericina B estèril en forma de complex d'amfotericina B i desoxicolat sòdic, que forma una dispersió coloïdal de color groc intens adequada per ser administrada per via

intravenosa. S'ha de mantenir a la nevera i protegit de la llum.

Amfotericina B liposòmica. Es va utilitzar el preparat comercial AmBisome[®], fabricat per Gilead Sciences, Madrid. Es presenta en vials amb un liofilitzat de color groc intens, de 50 mg d'amfotericina B encapsulada en una bicapa de liposomes. Els vials s'han de mantenir a la nevera i protegits de la llum.

Cortisona. Es va utilitzar el preparat comercial Actocortina 100[®], fabricat per Byk Leo Laboratorio Farmacéutico, SL. Es presenta en vials amb 100 mg de hidrocortisona sodi fosfat, i ampolles d'1 ml per reconstituir-los.

Ciclofosfamida. Es va utilitzar el preparat comercial Genoxal[®] fabricat per Laboratoris Funk S. A. de Barcelona. Es presenta en vials de 200 mg o 1 g amb un liofilitzat de color blanc al seu interior que s'han de conservar en nevera.

5-Fluorouracil. Es va utilitzar el preparat comercial Fluoro-uracil, fabricat per Productos Roche S. A. de Madrid. Es presenta en vials de 5 ml a una concentració de 50 mg/ml, llestos per la seva utilització que es conserven a temperatura ambient.

G-CSF o filgrastim (factor humà metionil recombinant, no glicosilat, d'estimulació de colònies de granulòcits). Es va utilitzar el preparat comercial Granulokine[®] fabricat per Laboratorios Pensa de Barcelona. Es presenta en xeringues a una concentració de 300 µg/ml en una solució aquosa.

Halotà. Es va utilitzar el preparat comercial Fluothane[®] fabricat per Zeneca Farma, SA. És un anestèsic inhalatori que s'utilitzava per sacrificar els ratolins.

3.2.3. PREPARACIÓ, CONSERVACIÓ I ADMINISTRACIÓ DELS FÀRMACS

3.2.3.1. PREPARACIÓ I CONSERVACIÓ

Desoxicolat d'amfotericina B. Es reconstituïa en primer lloc un vial mitjançant l'addició de

10 ml d'aigua destil·lada i per injecció (sense agents bacteriostàtics) a dins del mateix vial, i s'agitava fins a la total dissolució del liofilitzat. La solució d'amfotericina B quedava llavors transparent, mantenint el color groc intens. La concentració de la solució era de 5 mg/ml, i per preparar les dosis pels ratolins es realitzaven dilucions en solució glucosada al 5%. Per administrar una dosi de 1.5 mg/kg/d als ratolins calia diluir la solució del vial de la manera següent:

$$1.5 \text{ mg/kg} \times 1 \text{ kg}/1000 \text{ g} \times 30 \text{ g/ratolí} = 0.045 \text{ mg}$$

Per administrar 0.045 mg en una dosi de 0.2 ml, la solució ha d'estar a una concentració de 0.225 mg/ml.

dosi en mg/kg x 0.15 = concentració de la solució en mg/ml

Factor de conversió de les dosis de mg/kg per administrar la dosi que volem als ratolins en un volum de 0.2 ml

S'administraven dosis des de 1 fins a 2.5 mg/kg. En funció del nombre de ratolins als quals s'havia d'administrar aquest tractament, en preparàvem un volum més o menys gran.

El vial amb la solució mare (de 5 mg/ml) es conservava un màxim de 7 dies a la nevera. Les solucions diluïdes amb solució glucosada s'havien d'administrar immediatament després de la seva preparació i s'havien de mantenir sempre protegides de la llum.

Amfotericina B liposòmica. Es reconstituïa en primer lloc mitjançant l'addició de 12 ml d'aigua destil·lada i per injecció (sense agents bacteriostàtics) a dins del mateix vial, i s'agitava fins a la total dispersió del liofilitzat. El preparat d'amfotericina B quedava llavors uniforme i opac, mantenint el color groc intens. La concentració del preparat era de 4 mg/ml, i per preparar les dosis pels ratolins es realitzaven dilucions en solució glucosada al 5%. Es van administrar dosis des de 3 mg/kg fins a 40 mg/kg.

En funció del nombre de ratolins als quals s'havia d'administrar aquest tractament, en preparàvem un volum més o menys gran.

El vial amb la solució mare (de 4 mg/ml) es pot conservar un màxim de 48 h a la nevera. Les solucions diluïdes amb solució glucosada s'havien d'administrar immediatament després de la seva preparació i s'havien de mantenir sempre protegides de la llum. Es preparaven cada dia.

Ciclofosfamida. Es reconstituïa en primer lloc mitjançant l'addició de 10 o 50 ml d'aigua per injecció, segons si el vial era de 200 mg o d'1 g, a dins del mateix vial, i s'agitava fins a la total dissolució del liofilitzat. La solució de ciclofosfamida quedava llavors transparent i incolora, a una concentració de 20 mg/ml. Per administrar una dosi de 250 mg/kg als ratolins s'havia d'injectar 0.3 ml de la solució mare, sense fer cap més dilució.

5-Fluorouracil. Es presentava a una concentració de 50 mg/ml. Per administrar una dosi de 150 mg als ratolins s'administraven 0.1 ml del preparat original.

Factor estimulator de colònies de granulòcits. Es presentava en xeringues precarregades amb una solució incolora i transparent-límpida, i a una concentració de 300 µg/ml. Per preparar les dosis pels ratolins es realitzaven dilucions en solució glucosada al 5%. Es van administrar dosis de 150 a 300 µg/kg/d als ratolins.

Les xeringues precarregades es guardaven a la nevera. Les solucions diluïdes en solució glucosada s'havien d'administrar immediatament després de la seva preparació.

Cortisona. Es va reconstituir el preparat amb el vial d'aigua per injecció que es subministra. La concentració del preparat reconstituït era de 100 mg/ml.

3.2.3.2. ADMINISTRACIÓ

Via intravenosa: 5-fluorouracil i amfotericina B liposòmica. Per injectar productes per

aquesta via es feien servir xeringues de 0.3 mm d'ample i 13 mm de llarg (30 G x 1/2). S'administraven per les dues venes que hi ha al a cua del ratolí, que es troben situades a la banda dreta i esquerra de la cua, respectivament. A la part superior i a la inferior hi ha dues artèries.

Via intraperitoneal: fungizona, ciclofosfamida i G-CSF. Per injectar productes per aquesta via es feien servir xeringues de 0.45 mm d'ample i 12 mm de llarg (26 G x 1/2), perquè són curtes i així es minimitza el risc de provocar algun dany a l'animal. S'introduïa l'agulla per la part inferior de l'abdomen, mentre es mantenia el ratolí immobilitzat i en posició de Trendelenburg (inclinat perquè els intestins se li situessin cap al diafragma).

Via subcutània: cortisona. Per injectar productes per aquesta via es feien servir xeringues de 0.45 mm d'ample i 12 mm de llarg (26 G x 1/2). Es pinçava la pell del coll i s'introduïa l'agulla per sota la pell que quedava entre els dits.

Via inhalatòria: halotà. Aquest anestèsic s'utilitzava per sacrificar els animals. Se'n posava una mica en un cotó, que es dipositava al fons d'un pot d'1 litre de capacitat. Uns segons després es feia entrar al pot els animals que calia sacrificar i es tancava el pot perquè respiressin el producte. Degut a l'elevada concentració, els ratolins primer s'adormien i després morien degut a la sobredosi d'anestèsic.

3.2.4. PREPARACIÓ DELS INÒCULS PELS ESTUDIS *IN VIVO*

Els inòculs es van preparar raspant, amb l'ajuda d'una nansa, la superfície d'una placa que contenia el fong esporulat. La massa extreta formada per hifes i conidis del fong es transferia a un tub de plàstic de 5 ml de capacitat que contenia 10 - 20 ml de solució salina estèril. En els cas de necessitar inòculs molt elevats es raspava un nombre més gran de plaques (fins a 12 plaques per a obtenir un inòcul de 10^9 conidis/ml). Després d'homogeneïtzar la suspensió es filtrava a través d'una gassa estèril. La concentració de

conidis de la suspensió resultant es mesurava amb l'ajuda d'una càmera de Neubauer per ajustar-lo a la concentració desitjada. Aquest inòcul es verificava sembrant 0.1 ml de les dilucions convenients en plaques de petri amb medi PDA.

Aquest inòcul és el que s'utilitzava per infectar els animals, als quals se'ls n'administraven 0.2 ml per via intravenosa a través de la vena lateral de la cua.

3.2.5. MODEL EXPERIMENTAL PER L'AVALUACIÓ DE PARÀMETRES HEMATOLÒGICS

En aquests estudis s'obtenien mostres periòdiques de sang dels ratolins per analitzar-les i avaluar els canvis en diversos paràmetres sanguinis provocats per l'administració de diversos tractaments. La sang s'obtenia de la vena safena, situada a la part posterior de les potes del darrera.

El primer dia de l'estudi es rasurava el pèl de la zona amb un bisturí, per deixar al descobert el recorregut de la vena. La sang s'obtenia per punció de la vena, a partir de la gota que es formava. La primera gota es destinava a fer una extensió en un portaobjectes, i després s'agafaven 20 µl amb una micropipeta per realitzar la quantificació de diversos paràmetres. Després es pressionava la ferida durant uns moments fins que deixava de sagnar. Els 20 µl recollits es diluïen en un volum de 10 ml de solució salina per hematologia. Se'n determinava la concentració de leucòcits, hemoglobina i plaquetes. L'extensió es tenyia amb panòptic ràpid i es realitzaven recomptes diferencials de polimorfonuclears, limfòcits i monòcits.

Durant tot aquest procés el ratolí es mantenia en un tub de manera que la part davantera de l'animal estava immobilitzada, i només sobresortien les potes del darrere.

3.2.6. MODEL EXPERIMENTAL D'INFECCIÓ DISSEMINADA

Es van establir dos esquemes bàsics per avaluar les diferents infeccions, que són els estudis de supervivència i els de recuperació fúngica. Al primer els animals es supervisaven durant 30 dies després de la infecció i se'n valorava la supervivència. Al segon els animals es sacrificaven uns dies després de la infecció, se'ls extreien asèpticament una sèrie d'òrgans i es valorava la concentració dels elements fúngics presents als diferents òrgans.

Els ratolins es van immunosuprimir en alguns dels estudis per facilitar la infecció en el cas de les espècies menys virulentes. Els ratolins van rebre una dosi única de dos fàrmacs el mateix dia que van ser infectats. Aquests dos fàrmacs són la ciclofosfamida (Genoxal, Laboratorios Funk S. A., Barcelona) administrada per via intraperitoneal a 200 mg/kg, i el 5-fluorouracil (Fluoro-uracil, Productos Roche S. A., Madrid) administrat per via intravenosa a 150 mg/kg.

3.2.6.1. ESTUDI DE SUPERVIVÈNCIA

En cada estudi s'establí el nombre de grups necessaris per la seva realització. Els ratolins s'agrupaven de forma aleatòria en grups de 5 a 30 animals, depenent del tipus d'estudi a realitzar. El dia de la infecció (considerat el dia zero de l'estudi) els animals rebien per via intravenosa 0.2 ml de l'inòcul infectiu que els corresponia. En aquell mateix dia podien rebre també el tractament immunosupressor, si el model ho requeria. A partir del dia de la infecció els animals eren supervisats diàriament durant un període de 30 dies, en general. Es prenia nota de les morts ocorregudes cada dia i de l'estat dels ratolins mitjançant un examen que comprenia: estat del pèl (normal o ericat), postura (normal o amb l'esquena encorbada), mobilitat (normal o reduïda), atàxia i moviments involuntaris (presència o absència), reducció de pes.

3.2.6.2. ESTUDI DE RECUPERACIÓ FÚNGICA

En cada estudi s'establia el nombre de grups necessaris per la seva realització. Els ratolins s'agrupaven de forma aleatòria en grups de 10 a 30 animals, depenent del tipus d'estudi a realitzar. El dia de la infecció (considerat el dia zero de l'estudi) els animals rebien per via intravenosa 0.2 ml de l'inòcul infectiu que els corresponia. En aquell mateix dia podien rebre també el tractament immunosupressor, si el model ho requeria. A partir del dia de la infecció els animals eren supervisats diàriament i es prenia nota de les morts ocorregudes fins el dia en el que se sacrificaven els animals supervivents. En aquest dia els animals eren sacrificats mitjançant una sobredosi de l'anestèsic inhalatori halotà, o bé, en alguns estudis, anestèsia amb halotà seguida de dislocació cervical. Un cop morts els ratolins, es procedia a realitzar l'estudi necròptic de les cavitats necessàries. Els òrgans que es van extraure en la majoria dels estudis van ser fetge, melsa, ronyó i pulmó, però també cervell, ull i cor. L'extracció es va realitzar de forma asèptica, i els òrgans eren rentats amb aigua destil·lada estèril. Una part d'aquests òrgans es destinava a l'estudi de recuperació fúngica i l'altra a l'estudi histopatològic. Per l'estudi de recuperació fúngica els òrgans o fragments d'òrgans eren pesats, homogeneïtzats en 1 ml d'aigua destil·lada estèril amb l'ajuda de varetes de vidre amb un extrem tallant.

3.2.7. ANÀLISI ESTADÍSTICA DE LES DADES

Per la realització dels diferents estudis estadístics es va utilitzar el paquet de programes estadístics SPSS per Windows en les versions 9.0 i 10.0.

Mètode de Kaplan Meier. Aquest mètode permet calcular el Temps Mitjà de Supervivència (TMS) per un grup de ratolins. Té en compte els animals que queden vius al final de l'estudi i també quin dia han mort els que no sobreviuen fins al final del període d'observació. Un cop calculats els TMS per cada grup, s'utilitza el Log-rank test per comparar els TMSs dels

diferents grups entre si o respecte del grup control i establir quins grups són estadísticament diferents i quins s'han de considerar iguals.

Anàlisi de la Variància. Aquest és un mètode paramètric d'anàlisi que s'aplica als estudis en els que es realitza la quantificació del fong en diversos òrgans. Permet comparar la mitjana de recuperació per cada òrgan entre els diferents grups de l'estudi. Com que és un mètode paramètric, cal que les dades segueixin una distribució normal, i per això s'acostuma a treballar amb els logaritmes en base 10 dels recomptes de colònies obtinguts. Aquest mètode no és útil quan els grups de dades són petits, i llavors és més recomanable realitzar un test no paramètric com el test U de Mann-Whitney.

Test U de Mann-Whitney. Aquesta prova no paramètrica permet comparar les dades obtingudes en els recomptes de colònies per gram d'òrgan. No compara les mitjanes, sinó que ordena les dades dels dos grups que es comparen i en determina uns rangs. En aquest test, per tant no cal que les dades segueixin una distribució normal i podem treballar tant amb les dades originals com amb els logaritmes perquè obtindrem els mateixos resultats.

3.3. ESTUDIS *IN VITRO*. TÈCNICA DE MICRODILUCIÓ

3.3.1. ANTIFÚNGICS UTILITZATS

Per la realització dels estudis *in vitro* es van utilitzar els següents antifúngics, que van ser subministrats directament pels laboratoris fabricants. Tots els antifúngics utilitzats als estudis *in vitro* van ser substàncies pures. No es van utilitzar en cap cas preparats comercials.

Amfotericina B. Es va obtenir de la farmacopea americana USP (Rockville, Maryland, EEUU).

Itraconazol. Es va utilitzar la substància pura fabricada pels laboratoris Janssen Pharmaceutical de Beerse, Bèlgica.

Voriconazol (UK-109496). Es va utilitzar la substància pura fabricada pels laboratoris Pfizer, de Madrid.

Albaconazol (UR-9825). Es va utilitzar la substància pura fabricada pels laboratoris Uriach i Cia. de Barcelona.

Ravuconazol (BMS-207147). Es va utilitzar la substància pura fabricada per Bristol-Myers Squibb Company, de New Brunswick, New Jersey, EEUU.

Terbinafina. Es va utilitzar la substància pura fabricada pels laboratoris Novartis de Basilea, Suïssa.

Tots es van emmagatzemar a temperatura ambient, excepte la terbinafina, que es va guardar a la nevera.

3.3.2. PREPARACIÓ DE LES MICROPLAQUES D'ANTIFÚNGICS

El mètode que es va seguir per la preparació de les microplaques està descrit de forma detallada al document M38 del NCCLS. De forma resumida, primer s'establia per cada antifúngic el rang de dilucions que es volien testar. Si l'antifúngic estava inclòs al document M38 (amfotericina B, itraconazol, ketoconazol), s'utilitzava el rang indicat, i si l'antifúngic no estava inclòs (ravuconazol, albaconazol, terbinafina), es consultava la bibliografia existent. A continuació es preparava un banc de dilucions dobles seriades utilitzant com a dissolvent DMSO (dimetil sulfòxid), seguint l'esquema que es mostra a la Figura 4. A partir de la dilució més concentrada (solució mare de 1600 µg/ml a l'exemple representat a la figura), cada concentració representa la meitat de l'anterior.

Les dilucions es preparaven seguint un esquema que minimitza els errors de pipetejar. A partir del primer tub que estava a una concentració de 1600 es preparaves els tres tubs següents (800, 400, 200). A partir del tub amb una concentració de 200 es preparaven els tubs amb 100, 50, i 25, i a partir d'aquest últim es preparava la resta.

Posteriorment es diluïa el contingut de cada un dels 10 tubs en medi RPMI en proporció 1:50 i es dispensava en les microplaques (100 µl/pouet). Cada dilució es dispensava en una columna començant per la columna 1 en ordre de major a menor concentració. Les dues últimes columnes s'omplien amb medi RPMI + 2%DMSO. S'utilitzaven per fer el control negatiu (control de medi) i el positiu (control de creixement del fong). Les plaques un cop preparades es guardaven congelades a -20°C.

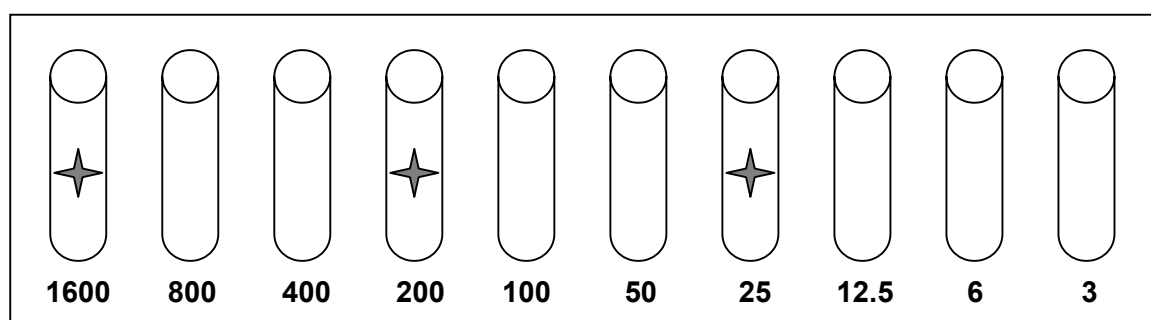


Figura 4. Esquema de les dilucions d'un antifúngic. Els tubs assenyalats amb una estrella són els que serveixen per preparar les tres dilucions següents.

3.3.3. PREPARACIÓ DE LES PLAQUES AMB COMBINACIONS D'ANTIFÚNGICS

Es va preparar un gradient de concentracions per cadascun dels antifúngics utilitzats seguint el mètode descrit al document M38-P i M38-A. Es van utilitzar microplaques de 96 pouets de fons còncav. El volum final va ser de 100 µl d'antifúngic. Es van estudiar un total de 9 combinacions d'antifúngics, que es van disposar en files o en columnes a les microplaques per acabar formant un doble gradient de concentracions en forma de tauler d'escacs (Figura 5).

Amfotericina B. Es va utilitzar un gradient de concentracions 0.12 a 8 µg/ml, que es van dispensar a les files 1 - 7 de la microplaca per les interaccions amb els azols i la terbinafina.

Terbinafina. Es va utilitzar un gradient de concentracions de 0.5 a 32 µg/ml, que es van dispensar a les files 1-7 de la microplaca per les interaccions amb els azols. Es va utilitzar un gradient de concentracions de 0.06 a 32 µg/ml, que es van dispensar a les columnes 2-11 de la microplaca per les interaccions de l'amfotericina B.

Itraconazol, voriconazol, ravuconazol i UR-9825. Es va utilitzar un gradient de concentracions de 0.03 to 16 µg/ml, que es van dispensar a les columnes 2 - 11 de la microplaca per les interaccions amb l'amfotericina B i la terbinafina.

A la fila A i columna 1 de cada microplaca, s'hi dispensava un únic antifúngic per establir la CMI de les soques de fong davant dels diferents antifúngics per separat.

Els pouets de la última columna (A12 - G12) es destinaven al control positiu (creixement del fong en absència d'antifúngics). Els pouets dels extrems de la microplaca (H1 i H12) es destinaven al control negatiu (control d'esterilitat del medi de cultiu).

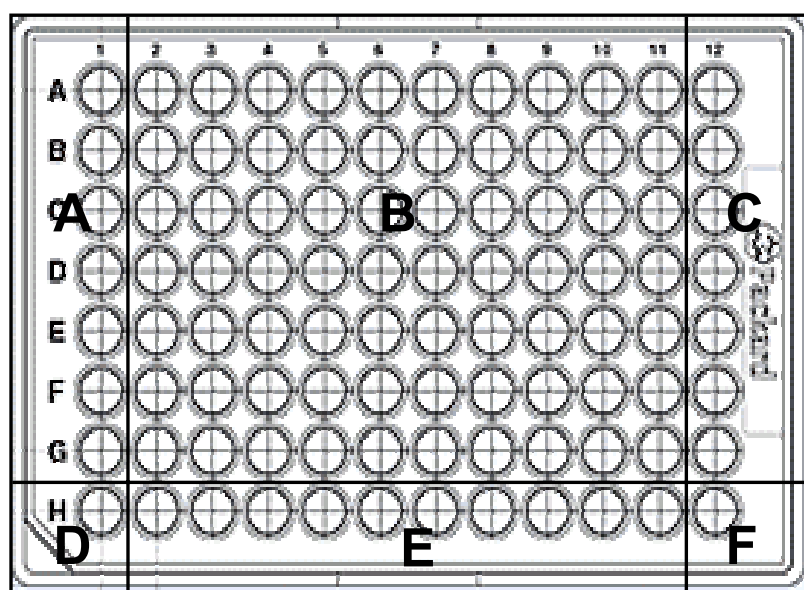


Figura 5. Esquema de la distribució de les diferents concentracions d'antifúngics en una placa de combinació d'antifúngics. Es definien 6 zones: A) zona amb només l'antifúngic que es dispensava a les files , B) zona de combinacions dels dos antifúngics en forma de tauler d'escacs, C) zona amb només medi RPMI utilitzada com a control de creixement, D) control d'esterilitat del medi, E) zona amb només l'antifúngic que es dispensava a les columnes, F) control d'esterilitat del medi.

Definicions: Per tots els antifúngics la CMI es va definir com la concentració més baixa que provocava un 100% d'inhibició del creixement fúngic després de 48-72 h d'incubació a 35°C. Nosaltres vam utilitzar l'índex de concentració inhibidora fraccional (FICI) per classificar les interaccions dels antifúngics com a sinèrgiques, additives, indiferents o antagonistes. El FICI correspon a la suma dels FICs per cada droga. El FIC es defineix com la CMI de cada droga quan actua en combinació dividida per la CMI quan actua sola, arrodonit a un sol decimal.

$$\text{FICI} = \frac{\text{CMI de A en combinació}}{\text{CMI de A sol}} + \frac{\text{CMI de B en combinació}}{\text{CMI de B sol}}$$

Es va definir la interacció com a sinèrgica si el FICI < 1, additiva si FICI = 1, indiferent si $1 < \text{FICI} \leq 2$ i antagonista si FICI > 2.

3.3.4. PREPARACIÓ DELS INÒCULS PELS ESTUDIS *IN VITRO*

Els inòculs es van preparar rasant, amb l'ajuda d'una nansa, la superfície de la placa que contenia el fong esporulat. La massa extreta que contenia hifes i conidis del fong es transferia a un tub amb 20 ml d'aigua destil·lada estèril. Després d'homogeneïtzar la suspensió es filtrava a través d'una gassa estèril. La concentració de conidis de la suspensió resultant es mesurava amb l'ajuda d'un fotoanàlitzador (Dinko mod. D-105) i s'ajustava fins a obtenir una concentració final de $0.4 - 5 \times 10^6$ conidis/ml. Aquest inòcul es verificava sembrant 0.1 ml de la dilució 10^{-3} i 10^{-4} en plaques de petri amb PDA. Aquest inòcul és el que s'utilitzava per inocular les microplaques, després de fer una dilució 1:50 en medi RPMI.

4. RESULTATS

4.1. INFECCIÓ EXPERIMENTAL I COMPARACIÓ DE LA VIRULÈNCIA

4.1.1. Patogènia experimental de tres espècies oportunistes de *Paecilomyces* en un model murí.

Experimental pathogenicity of three opportunist *Paecilomyces* species in a murine model.

Pujol I, Aguilar C, Ortoneda M, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. Journal de Mycologie Médicale 12:86-89. 2002.

4.1.2. Comparació de la virulència de soques de *Scedosporium prolificans* de diferents orígens en un model animal.

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

4.2. IMMUNOSUPRESSIÓ EXPERIMENTAL

4.2.1 Efecte de diferents règims immunosupressors en els recomptes de cèl·lules sanguínies en ratolí.

Ortoneda M, Capilla C, Pastor FJ, Guarro J. (En preparació).

4.3. TRACTAMENTS

4.3.1. Tractament experimental d'una infecció disseminada causada per *Paecilomyces variotii* en ratolins.

Experimental treatment of a murine disseminated infection by *Paecilomyces variotii*. Pujol I, Ortoneda M, Aguilar C, Pastor FJ, Guarro J. Journal de Mycologie Médicale 13:141-143. 2003.

4.3.2. Eficàcia de l'amfotericina B liposòmica en el tractament de fusariosi sistèmica en ratolins.

Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46:2273-2275. 2002.

4.3.3. Teràpia amb amfotericina B liposòmica i factor estimulador de colònies de granulòcits en un model murí d'infecció invasiva per *Scedosporium prolificans*.

Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. Ortoneda M, Capilla J, Pujol I, Pastor FJ, Mayayo E, Fernàndez-Ballart J, Guarro J. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49:525-529. 2002.

4.3.4. Interacció de G-CSF i dosis altes d'amfotericina B liposòmica en el tractament de la scedosporiosi sistèmica murina.

Interaction of G-CSF and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Guarro J. (En preparació).

4.4. INTERACCIÓ D'ANTIFÚNGICS

4.4.1. Interaccions antifúngiques *in vitro* de drogues autoritzades i novedoses contra *Fusarium* spp.

In vitro antifungal interactions of licensed and novel drugs against *Fusarium* spp. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Guarro J. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003. (En premsa).

4.4.2. Interaccions antifúngiques *in vitro* de drogues autoritzades i novedoses contra *Paecilomyces* spp.

In vitro antifungal interactions of licensed and novel drugs against *Paecilomyces* spp. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003. (En revisió, 2ona versió).

5. DISCUSSIÓ

5.1. INFECCIÓ EXPERIMENTAL I COMAPRACIÓ DE LA VIRULÈNCIA

Els tres gèneres de fongs utilitzats en els estudis *in vivo* representen una part important dels agents etiològics involucrats en les infeccions que afecten pacients immunocompromesos i que estan produïdes per fongs filamentosos oportunistes. Aquestes infeccions sovint no responen als tractaments, que en general es basen en l'ús del desoxicolat d'amfotericina B. Donat que la limitació principal d'aquest fàrmac és la seva toxicitat (Deray 2002), que no en permet l'administració de dosis elevades, un dels principals objectius de la present tesi ha estat demostrar que les infeccions que no responen a un tractament basat en l'amfotericina B, poden respondre al fàrmac si s'administra en un vehicle que en disminueixi la toxicitat i en permeti l'administració de dosis més altes (més de 30 vegades la dosi que es pot administrar en forma de desoxicolat) (Proffitt *et al.* 1991).

La metodologia que es va seguir va ser la mateixa pels tres gèneres estudiats. En primer lloc es va establir un model d'infecció disseminada que fos reproduïble i amb el que s'aconseguís una mortalitat adequada, per després poder avaluar els efectes dels diferents tractaments en la supervivència dels animals o en la presència del fong en diversos òrgans diana. Els inòculs administrats per les diferents espècies van variar degut a que no totes les espècies són igualment virulentes i a que l'estat immunològic dels animals no va ser igual a tots els estudis. En el cas de l'estudi realitzat amb *Fusarium verticillioides* els animals eren immunocompetents. Els animals infectats amb *Paecilomyces* spp. estaven immunodeprimits amb ciclofosfamida, i els infectats amb *Scedosporium* amb ciclofosfamida i 5-fluorouracil. Les pautes d'immunosupressió que se solen administrar en els estudis *in vivo* són molt diverses, i depenen de la necessitat d'obtenir una immunosupressió més o menys severa, del tipus d'animal que s'utilitza i del fong escollit per la infecció; no obstant, l'experiència prèvia dels autors és un aspecte important a l'hora d'establir el tractament immunosupressor (Lozano-Chiu *et al.* 1999, Graybill 2000b, Denning i Warn 1999, Graybill *et al.* 1998).

Un dels aspectes importants i novedosos d'aquesta part de la tesi el constitueix el fet que vàrem poder establir un model reproduïble d'infecció per *Fusarium verticillioides* en animals immunocompetents, que d'altres autors no havien pogut aconseguir, ni tant sols utilitzant animals immunodeprimits (Odds *et al.* 1998). En el model desenvolupat per nosaltres, la mortalitat del grup control era suficient per permetre avaluar l'eficàcia dels diferents tractaments.

S'ha comprovat que membres de l'espècie *F. verticillioides* són menys virulents que membres de l'espècie més coneguda del gènere, que és *Fusarium solani*. Amb aquesta última sí que diversos autors han pogut establir models en ratolins tant immunocompetents com immunodeprimits (Mayayo 1999, Graybill 2003, Legrand *et al.* 1991). L'inòcul que es va haver d'utilitzar en el nostre cas d'infecció per *F. verticillioides* era molt concentrat (10^9 ufc/ml) i va produir al principi diversos problemes derivats de la seva elevada concentració. Si s'administrava tot el volum alhora (0.2 ml) els ratolins inoculats morien en pocs minuts degut a la gran acumulació de conidis als capil·lars dels pulmons, que en provocava l'obstrucció. Quan l'inòcul es va administrar fraccionat en dos volums de 0.1 ml aquest efecte ja no es va observar. Amb aquest model la mortalitat assolida va ser superior al 50% en 12 dies, però es pot clarament dissociar de l'efecte provocat per la inoculació, perquè les morts dels animals es produïen de forma gradual a partir del dia 2 després de la infecció .

En el model d'infecció disseminada per fongs del gènere *Paecilomyces* es va comparar la virulència de les dues espècies que són responsables de la majoria de les infeccions causades per aquest gènere, *P. variotii* i *P. lilacinus*, i una tercera espècie, *P. javanicus*, que s'ha identificat en molt poques ocasions com a agent etiològic d'infecció en l'home. La poca virulència de les tres espècies va quedar palesa a l'estudi ja que no es van aconseguir mortalitats que superessin el 50% en 20 dies malgrat que els animals van estar sotmesos a un règim immunosupressor (ciclofosfamida, 250 mg/kg cada 5 dies) que els va mantenir neutropènics durant la pràctica totalitat de l'experiment. Per l'estudi de tractaments es va

escollir *P. variotii*, que és l'espècie que va produir una mortalitat més elevada. Els òrgans més afectats en els ratolins infectats amb *P. variotii* van ser la melsa, seguida de fetge, pulmó, ronyó i cor. El cervell i els ulls van quedar molt poc afectats, encara que cal tenir en compte la dificultat en la extracció d'aquests òrgans i sobretot dels ulls, degut a les seves petites dimensions i a la dificultat d'homogeneïtzar-los correctament. En estudis d'altres autors l'inòcul administrat va ser inferior a l'administrat per nosaltres, i la virulència que es va detectar en aquest fong va ser encara menor (Naidu i Singh 1992).

Pel que respecta al model d'infecció disseminada amb la soca FMR 3569 de *S. proliferans* es va aconseguir establir models reproduïbles tant en animals immunocompetents com en animals immunodeprimits amb una combinació de 5-fluorouracil i ciclofosfamida. En animals immunocompetents la concentració de l'inòcul administrat va ser de 10^6 ufc/ml, amb el qual s'aconseguia una mortalitat del 100% en 12 dies. En animals immunodeprimits la concentració de l'inòcul administrat per aconseguir una mortalitat similar va ser de 2.5×10^5 ufc/ml. Aquests estudis van confirmar l'elevada virulència de les soques d'aquesta espècie, i de la soca FMR 3569 en particular, tant en animals immunocompetents com immunodeprimits, perquè tots els animals infectats no tractats morien en un temps inferior als 12 dies. L'elevada virulència d'aquesta soca de *S. proliferans* s'havia demostrat ja prèviament en un estudi dut a terme per Cano i cols. (Cano *et al.* 1992) i per Drouhet i cols. (Drouhet *et al.* 1991). En referència a la virulència d'aquesta espècie existeix una certa controvèrsia sobre la distribució irregular de les infeccions disseminades que provoca, perquè aquestes es troben limitades a àrees geogràfiques concretes, i són pràcticament desconegudes a la resta. Concretament, les infeccions disseminades provocades per *S. proliferans* es concentren a Austràlia i a l'Estat espanyol (Gosbell *et al.* 1999). En altres zones amb clima similar, com per exemple el Sud dels Estats Units, les infeccions provocades per aquesta espècie acostumen a ser localitzades (Wilson *et al.* 1990). El fet que en molts països no s'hagin descrit infeccions per aquesta espècie, no és d'estranyar

perquè encara avui en dia és poc freqüent la identificació a nivell d'espècie o fins i tot de gènere dels fongs causants de les infeccions en la majoria dels hospitals. La epidemiologia de les infeccions fúngiques topa per tant, amb un obstacle important perquè s'ha d'assumir que només s'obtidran dades concretes de les infeccions per fongs filamentosos en els hospitals en els quals es realitzi de forma habitual la identificació a nivell d'espècie. No obstant això, donat que als Estats Units hi ha descrits un nombre important de casos d'infeccions localitzades per *S. prolificans*, sembla que es pot assumir que si no es diagnostiquen infeccions disseminades per aquesta espècie, és que realment no se'n produeixen. Existeix la possibilitat, també, que en algunes ocasions s'hagi pogut confondre amb l'altra espècie del gènere, *S. apiospermum*, que és més coneguda.

Es va comparar, en animals immunocompetents, la virulència de 8 aïllats de *S. prolificans* procedents de diferents orígens geogràfics, i també d'origen clínic i ambiental. Es van incloure a l'estudi dues soques de l'espècie *S. apiospermum*, que en treballs anteriors s'havia vist que era menys virulenta (Cano *et al.* 1992). La menor virulència de les soques de l'espècie *S. apiospermum* es va confirmar en el nostre estudi ja que cap de les dues soques estudiades va provocar una mortalitat superior al 40% en els animals.

Sis de les 8 soques de *S. prolificans*, en canvi, van provocar la mort de tots els animals durant el període d'observació. Aquestes incloïen 2 soques aïllades d'infeccions localitzades als Estats Units, dues soques ambientals aïllades a Barcelona i dues soques procedents d'infecció disseminada i colonització pulmonar aïllades a l'estat espanyol. De les altres dues soques, una va resultar més virulenta que el grup principal de soques, causant la mort de tots els animals en 12 dies, i una altra va resultar ser menys virulenta que el grup principal, però tot i així era encara més virulenta que les soques de *S. apiospermum*. Dins del grup principal hi havia soques de tots els orígens estudiats, i per tant no es van poder establir diferències clares en virulència en relació a l'origen que poguessin explicar l'estranya distribució de les infeccions disseminades causades per *S. prolificans*.

5.2. EFECTE DELS FÀRMACS IMMUNOSUPRESSORS I LES CITOQUINES

Les pautes d'immunosupressió emprades als estudis *in vivo* són molt diverses, i una mateixa pauta provoca alteracions molt diferents en els animals segons diferents autors. Vàrem decidir fer un estudi administrant als ratolins els tractaments immunosupressors més freqüents per poder, de forma objectiva, avaluar els canvis que provoquen en ratolins, que és el model animal que hem utilitzat en tots els estudis. El mètode utilitzat per nosaltres va ser la punció de la vena safena, i es van extreure diverses mostres al llarg de 14 dies a set animals per cada grup de tractament. Aquest és dels pocs mètodes que permet obtenir mostres de sang repetides d'un mateix animal sense causar-li moltes molèsties. D'altres tècniques, com la punció cardíaca o l'extracció del plexe braquial només permeten una extracció per animal, que després s'ha de sacrificar. La punció al plexe retroorbital és dolorosa per l'animal, li pot deixar seqüeles, i no es pot dur a terme repetides vegades en un mateix animal. La obtenció de sang a partir del seccionament de la cua permet obtenir un cert nombre de mostres, però la ferida causada pot interferir en la qualitat de la sang que s'obté (Álvarez i Tendillo 2001). El mètode que vam utilitzar, va demostrar ser bo, perquè els nivells de tots els paràmetres estudiats es van mantenir estables en el grup control. En els altres treballs existents sobre aquest tema, la metodologia utilitzada per l'obtenció de la sang per fer els hemogrames (tall de la cua, punció retroorbital, exanguinació per punció cardíaca o pel plexe braquial) i els resultats obtinguts, varien segons els autors, i fins i tot en diferents articles d'un mateix autor (Graybill *et al.* 1997, Graybill i Mitchell 1978, Matsumoto *et al.* 1987, Lord *et al.* 1991).

En el nostre cas l'administració de ciclofosfamida va provocar una disminució transitòria dels recomptes de PMNs, que van arribar a nivells d'aproximadament 100/ μ l, però que només va durar un dia. Quan administràvem una segona dosi, els nivells es mantenien en el punt més baix durant un temps més llarg, entre 5 i 6 dies. L'administració conjunta de ciclofosfamida i 5-fluorouracil va provocar que els nivells de PMNs es mantinguessin al

voltant de 100/ μ l durant 4 dies. L'administració de cortisona, en canvi, no va provocar modificacions importants en els recomptes dels diferents paràmetres sanguinis, encara que potser en aquest cas s'hauria hagut de valorar l'activitat de les diferents poblacions cel·lulars.

S'ha demostrat que el G-CSF provoca leucocitosi, incrementant el recompte de PMN diferenciats i la seva activitat fagocítica (Stevens 1998). En teoria, l'administració de G-CSF hauria de ser beneficiosa, però en el nostre model animal no es va observar aquest efecte. Les nostres observacions estan, en part, en la línia de les observacions d'altres investigadors que no van trobar cap efecte del G-CSF quan s'administrava en diversos models experimentals d'infecció per criptococ i de candidiasi orogastrointestinal (Polak 1999, Clemons i Stevens 2000, Graybill *et al.* 1997). Malgrat la pràcticament nul·la resposta a aquest fàrmac en general, la combinació de G-CSF amb antifúngics va mostrar un efecte additiu en un model d'aspergil·losi experimental en ratolí quan el tractament començava tres dies abans de la infecció (profilaxi) (Polak 1999). Les diferències observades entre els diferents autors s'expliquen fàcilment perquè les dosis administrades, la duració de la teràpia i el dia d'inici de la teràpia, variaven molt. A més, en la pràctica clínica, els beneficis de l'administració profilàctica de G-CSF a pacients amb un mal pronòstic no han estat demostrats (Dale *et al.* 1995).

En el nostre estudi, el grup immunosuprimit i tractat amb G-CSF va mostrar recomptes de leucòcits totals i polimorfonuclears molt superiors als nivells normals el dia 0 de l'estudi, però que dos dies després estaven molt per sota dels nivells normals. La disminució en el nombre de PMNs en aquest grup es va donar un dia abans que en el grup immunosuprimit però no tractat amb G-CSF, i es van mantenir al voltant de 100/ μ l des del dia 4 fins el 7, dia a partir del qual els dos grups es van comportar de forma similar. En el nostre estudi, per tant, el G-CSF no va poder reduir l'efecte del tractament immunosupressor ni en durada ni en

intensitat. Sembla evident que hi ha un nombre de factors no controlats que poden afectar la resposta a aquest tractament.

Per altra banda, el tractament amb G-CSF sol va provocar un increment molt important en el recompte de PMNs que van arribar a nivells de 30,000/ μ l després de la setena dosi, resultat que també va ser observat per diversos autors (Graybill *et al.* 1998, Lord *et al.* 1991), que van administrar una dosi similar i van observar un increment de 14 vegades en el recompte de PMNs en quatre dies.

5.3. TRACTAMENTS ASSAJATS

El tractament antifúngic comú a tots els estudis va ser l'amfotericina B liposòmica, i en tots els casos es va comparar al desoxicolat d'amfotericina B. La durada del tractament va ser igual en tots els estudis, començant el dia després de la infecció (dia +1) i administrant-se diàriament fins el dia 10 després de la infecció, excepte en el cas de la infecció per *P. variotii*, en la qual el tractament s'iniciava 48 hores després de la infecció, per donar més temps al fong a arribar als òrgans diana. En el cas dels estudis amb *S. proliferans*, es va voler avaluar també l'efecte del G-CSF. Aquest tractament es va administrar sol i combinat amb l'amfotericina B liposòmica.

L'amfotericina B liposòmica en clínica s'administra generalment a dosis inferiors a 5 mg/kg/d. Existeixen però, estudis en els quals es demostra que no existeix toxicitat del producte a dosis de fins a 15 mg/kg/d (Walsh *et al.* 2001). Als nostres estudis vam administrar dosis als animals d'entre 1.5 i 40 mg/kg d'amfotericina B liposòmica. En cap cas es va observar toxicitat del producte, ja que la dosi letal 50 per ratolins és superior a 175 mg/kg, i es pot administrar a dosis de 50 mg/kg durant 14 dies sense que s'observin efectes secundaris importants (Proffitt *et al.* 1991).

Per *P. variotii* vàrem demostrar que els resultats obtinguts amb dosis baixes d'amfotericina B liposòmica (1.5 i 3 mg/kg) són equivalents als obtinguts amb les dosis màximes permeses de la formulació tradicional, i que quan s'incrementa molt la dosi de la formulació liposòmica (10 mg/kg), també augmenta l'efecte observat. El model d'infecció per *P. variotii* va ser l'únic en el qual es va observar que la formulació tradicional de l'amfotericina B era eficaç, perquè si bé la supervivència en el grup control no era prou baixa per poder apreciar diferències significatives, va provocar una reducció important del recompte de ufc/g en els òrgans. També era l'única soca de les que vam utilitzar pels estudis *in vivo* que a priori semblava sensible a l'amfotericina B (Taula 2). Malgrat aquest fet, en la majoria de les infeccions clíniques per *P. variotii* els tractaments no són efectius. Cal tenir en compte que la major part de les infeccions per aquest fong que es resolen positivament són aquelles en les que hi ha un implanta que es pot eliminar amb celeritat (catèter venós, diàlisi peritoneal, ...), i per tant s'elimina la porta d'entrada (Bibashi *et al.* 2001). Altres tipus d'infeccions com les endocarditis, també associades a implants, tenen una pitjor prognosi perquè en aquest cas és més complicat d'eliminar l'implant (Kalish *et al.* 1982).

Taula 2. Sensibilitat a l'amfotericina B de les soques utilitzades als estudis *in vivo*.

Soca	Amfotericina B
	CMI (µg/ml)
<i>P. variotii</i> FMR 5515	≤ 0.125
<i>F. verticillioides</i> FMR 4382	4
<i>S. prolificans</i> FMR 3569	8 - >16

En les infeccions produïdes per les altres dues soques (*S. proliferans* i *F. verticillioides*), el tractament amb desoxicolat d'amfotericina B a 1.5 mg/kg no va tenir cap efecte, i només es va observar un augment del TMS incrementant la dosi de desoxicolat d'amfotericina B fins a 2.5 mg/kg en el cas de *F. verticillioides*. L'amfotericina B liposòmica va fer augmentar el TMS dels animals fins i tot a concentracions força baixes (3 mg/kg). També va provocar una important disminució de la quantitat de fong present en els diferents òrgans estudiats, que va ser més evident per les dosis més altes (10 i 20 mg/kg).

Les experiències clíniques d'èxit terapèutic en infeccions disseminades per *Fusarium* son escasses, però s'han obtingut alguns èxits administrant diverses formulacions d'amfotericina B (Cofrancesco 1992), incloses en diverses revisions del tema (Guarro i Gené 1995, Boutati i Anaissie 1997).

En el cas de la infecció per *S. proliferans*, es va observar un increment del TMS, que va ser directament proporcional a l'augment de la dosi d'amfotericina B liposòmica. Sense tractament, els animals no superaven els 8 dies de mitjana. Amb un tractament de 10 mg/kg es va aconseguir incrementar en 5 dies el TMS dels animals. Aquest augment va ser molt més important, fins a 14 dies, quan la dosi d'amfotericina liposòmica administrada va ser de 40 mg/kg.

Respecte de la importància de l'estat immunològic en la resolució de la infecció es va estudiar en model d'infecció disseminada per *S. proliferans*. En el nostre cas els tractaments combinats de G-CSF i amfotericina B liposòmica van mostrar un efecte additiu per la dosi més baixa (10 mg/kg) d'amfotericina B liposòmica. Per les dosis altes (40 mg/kg), l'addició de G-CSF no va millorar els resultats obtinguts pel tractament amb només amfotericina B liposòmica. Sembla, doncs, que els efectes de la teràpia amb amfotericina B liposòmica a dosis elevades serien molt més importants que l'efecte teòricament beneficiós del G-CSF.

Hi ha estudis clínics que demostren l'eficàcia del G-CSF com a teràpia antifúngica empírica en pacients neutropènics (Carrillo-Muñoz *et al.* 1999, Kelsey *et al.* 1999, Walsh *et al.* 1998).

Sembla que l'efecte beneficiós del G-CSF rau en la capacitat que té d'augmentar el nombre de granulòcits diferenciats i la seva capacitat fagocítica (Dale *et al.* 1995, Lieschke i Burgess 1992). L'estudi histopatològic que vam realitzar va revelar una resposta inflamatòria més important per PMNs en el grup tractat amb G-CSF i amfotericina B liposòmica que en el grup control, però cal tenir en compte que no es va realitzar estudi histopatològic del grup tractat amb G-CSF només. De fet, els resultats en supervivència que vam observar als grups tractats només amb G-CSF van ser fins i tot pitjors que els del grup control. Hi ha diversos estudis en els que es demostra que el G-CSF sol no millora la supervivència en infeccions per *Cryptococcus* o *Candida* (Graybill *et al.* 1997, Clemons i Stevens 2000). Malgrat tot, quan es combina amb antifúngics, hi ha casos en els que mostra un efecte additiu (Graybill *et al.* 1998).

El problema de la manca d'efecte del G-CSF en els diferents models animals no estaria en el fàrmac en si, ja que de fet els ratolins tractats amb G-CSF augmenten molt els seus nivells de leucòcits, sinó en el fet que no se sap si cal administrar-lo en el moment de la infecció o un cert temps abans, fins quan cal seguir-ne administrant, i quina és la dosi més adequada. Potser el G-CSF no és la citoquina més adequada, i s'obtindrien millors resultats amb GM-CSF, interleuquines o interferó γ . El que és clar és que la major part dels infectats per fongs patògens oportunistes i que desenvolupen una infecció disseminada són pacients hematològics, normalment amb leucèmies i que han estat sotmesos a trasplantament de moll d'os. El risc de desenvolupar la infecció està molt relacionada amb els nivells de PMNs. Si els pacients es troben profundament neutropènics la infecció té poques possibilitats de poder ser superada. En els únics casos que un pacient immunocompromès ha pogut superar la infecció la neutropènia s'havia resolt (Bouza *et al.* 1996, Berenguer *et al.* 1997). En un tercer cas presentat per Wood, la infecció sembla que es limitava a l'esòfag, i es va resoldre amb tractament antifúngic malgrat que la neutropènia es va mantenir (Wood *et al.* 1992). Les infeccions disseminades que es produeixen en la població de risc tenen una

mortalitat de pràcticament el 100% en pacients amb neutropènia persistent (Revankar *et al.* 2002) i el temps entre l'inici del tractament i la mort és sovint inferior a una setmana, com es pot comprovar observant les estadístiques de diverses revisions de casos clínics (Revankar *et al.* 2002, Guerrero *et al.* 2001).

5.4. INTERACCIÓ D'ANTIFÚNGICS

Els gèneres escollits per avaluar l'efecte de les diferents combinacions d'antifúngics van ser *Fusarium* i *Paecilomyces*. En el cas de *Fusarium* la CMI₉₀, és a dir, la concentració mínima d'antifúngic que inhibeix el 90% de les soques va ser de 4 µg/ml. No es va observar diferències entre les tres espècies estudiades. En el cas dels quatre azols que es van provar i de la terbinafina, les CMI₉₀ van ser molt altes, i sovint eren superiors a la concentració màxima que assajada. Les dues espècies estudiades de *Paecilomyces* es van comportar de manera molt diferent, mentre que *P. variotii* va ser sensible a l'amfotericina B i a la resta d'antifúngics, *P. lilacinus* només va respondre als azols de nova generació, com són el voriconazol, l'albaconazol i el ravuconazol. Resultats similars ja havien estat observats en altres estudis realitzats per altres investigadors (Aguilar *et al.* 1998, Pujol *et al.* 1997b, Capilla *et al.* 2001 i Espinel-Ingroff 2001b).

El propòsit dels estudis, doncs, va ser trobar combinacions sinèrgiques d'antifúngics i per això es va calcular l'índex FIC (Concentració Inhibitòria Fraccional), que és una mesura objectiva per avaluar l'efecte d'una combinació de fàrmacs (Arikan *et al.* 2002, Meletiadiis *et al.* 2003). En els nostres estudis vam adoptar el criteri següent: interacció sinèrgica quan l'índex FIC era superior a 1, indiferent quan era igual a 1, additiva quan era superior a 1 però inferior o igual a 2, i antagonista quan l'índex FIC era superior a 2.

Tant en el cas de *Paecilomyces* com en el de les diferents espècies de *Fusarium*, es va

observar una major quantitat d'interaccions sinèrgiques en les combinacions de terbinafina i azols, que en les combinacions d'amfotericina B i azols. En els nostres estudis, només la combinació amfotericina B-ravuconazol va mostrar efectes sinèrgics davant de més del 50% de les soques de *Fusarium*. La combinació d'amfotericina B i azols sembla que actuen com a antagonistes quan els dos agents s'afegeixen simultàniament (Polak 1999, Viudes 2001), encara que Walsh i col·laboradors van observar que l'amfotericina B combinada amb diversos azols tenia un efecte sinèrgic davant de *P. boydii* (Walsh *et al.* 1995). Aquestes combinacions no s'havien provat mai fins ara per *Fusarium* ni per *Paecilomyces*. En el cas de *Fusarium* s'han publicat diversos estudis avaluant l'eficàcia de l'amfotericina B combinada amb alguns antibiòtics com la rifabutina, rifampicina i l'azitromicina, i altres antifúngics com la caspofungina i la 5 fluorocitosina (Guarro *et al.* 1999, Arikan 2002, Clancy *et al.* 1998, Clancy i Nguyen 1998). Malgrat que en alguns d'aquests estudis s'observaven bons resultats *in vitro*, sembla que no s'han pogut demostrar aquestes mateixes tendències en estudis amb animals. La única combinació que a priori sembla prometedora és la combinació d'amfotericina amb caspofungina, pel mode d'acció d'aquests dos antifúngics.

En canvi, en el cas de la terbinafina combinada amb els azols, es va observar que un elevat nombre de les combinacions tenien valors de FICI inferiors a 1 tant per *Fusarium* com per *Paecilomyces*. Encara que no hi ha altres estudis sobre l'efecte de la combinació de terbinafina i azols davant dels dos gèneres estudiats per nosaltres, aquesta tendència s'ha observat per altres fongs filamentosos com *Aspergillus* i *Scedosporium* (Mosquera *et al.* 2002, Ryder i Leitner 2001, Meletiadi *et al.* 2003). Aquesta interacció positiva pot ser deguda a l'efecte combinat de la terbinafina i els azols en diferents dianes de la ruta de biosíntesi de l'ergosterol.

Més enllà, però, de l'efecte d'un antifúngic sobre l'altre, i el valor de FICI obtingut per cada combinació, hi ha la qüestió de si la combinació d'antifúngics que ha mostrat un efecte sinèrgic és eficaç a dosis assolibles en clínica. Aquest fet topa, ja en el seu plantejament,

amb el problema que pels fongs filamentosos encara no s'han marcat els punts de tall per considerar una soca resistent o sensible a un antifúngic. El document M38-A només indica que per *Aspergillus*, CMI's d'amfotericina B inferiors a 2 µg/ml s'associen amb èxit terapèutic, mentre que valors de CMI superiors a 2 µg/ml, s'associen amb fracàs terapèutic, però aquestes dades estan basades en un grup molt petit de casos (Lass-Flörl *et al.* 1998). Respecte de l'itraconazol i els nous triazols, CMI's d'itraconazol superiors a 8 µg/ml estan associats a resistència clínica (Denning *et al.* 1997a, Denning *et al.* 1997b, NCCLS M38-A). Malgrat aquestes limitacions, en alguns estudis s'han assumit les concentracions màximes assolibles en sèrum com a referència per poder veure quines combinacions sembla que tinguin més possibilitats de funcionar en una infecció clínica (Meletiadis *et al.* 2003, Ryder i Leitner 2001). Seguint les indicacions descrites en aquests dos treballs, són poques les combinacions d'antifúngics que, a priori, podrien ser efectives en un estudi *in vivo*, tant per *Fusarium* com per *Paecilomyces*, i la majoria serien de terbinafina combinada amb algun azol. Aquestes combinacions topen, d'entrada, amb un problema important, que és que encara no s'ha trobat un model animal que permeti avaluar l'eficàcia de la terbinafina. Les propietats farmacocinètiques d'aquest antifúngic fan que tingui un tropisme molt important pels teixits adiposos i la pell, i que la seva concentració als òrgans i al plasma sigui molt baixa (Hosseini-Yeganeh i McLachlan 2002). Els intents de traduir l'activitat observada *in vitro* a models *in vivo* no ha prosperat, encara que les concentracions necessàries per inhibir les soques *in vitro* fossin molt baixes (Dannaoui *et al.* 2002, Schmitt *et al.* 1990).

Malgrat els problemes dels models *in vivo*, hi ha diverses experiències clíniques en les quals s'ha demostrat l'eficàcia de les combinacions de terbinafina amb azols per infeccions causades per espècies que normalment no responen als tractaments, com per exemple *Scedosporium prolificans*, *Scedosporium apiospermum*, *Scopulariopsis brevicaulis* (Verweij *et al.* 1997, Howden *et al.* 2003, Cox i Irving 1993).

6. CONCLUSIONS

- 1.** S'ha comparat la virulència de tres espècies del gènere *Paecilomyces* en ratolins immunodeprimits.
 - La mortalitat provocada per les tres espècies no va superar el 50% dels animals en 20 dies.
 - En els animals infectats amb *P. variotii* i *P. lilacinus* es va recuperar el fong en la majoria dels òrgans estudiats.
 - Malgrat que *P. javanicus* va provocar una mortalitat més elevada que les altres dues espècies estudiades, no es va poder recuperar en la majoria dels òrgans analitzats.
- 2.** S'ha desenvolupat un model reproduïble d'infecció disseminada per *Fusarium verticillioides* en ratolins immunocompetents.
 - Degut a que és una espècie poc virulenta, va ser necessari utilitzar un inòcul força elevat (10^9 ufc/ml) per obtenir una mortalitat important.
- 3.** S'ha desenvolupat un model reproduïble d'infecció disseminada per *Scedosporium prolificans* en ratolins immunocompetents i immunodeprimits.
 - En animals immunocompetents l'inòcul necessari va ser superior a l'utilitzat en animals immunodeprimits (10^6 ufc/ml i 2.5×10^5 ufc/ml, respectivament), tot i que en ambdós casos s'aconseguia una mortalitat del 100% dels animals en 12 dies.
- 4.** S'ha comparat la virulència de soques de les dues espècies del gènere *Scedosporium*, *S. prolificans* i *S. apiospermum*, en animals immunocompetents.
 - Les soques de *S. apiospermum* es van mostrar menys virulentes que les d'*S. prolificans*, ja que varen provocar una mortalitat inferior al 40%, mentre que la majoria de les soques de *S. prolificans* van provocar un 100% de mortalitat.

- 5.** S'ha comparat la virulència en animals immunocompetents de soques ambientals i clíniques, i procedents de diferents orígens geogràfics de *Scedosporium prolificans*.
- No es van detectar diferències en virulència que es poguessin associar a l'origen de les soques.
- 6.** S'han estudiat els canvis en els recomptes de leucòcits i cèl·lules polimorfonuclears (PMNs) de sang de ratolí produïts per diversos tractaments immunosupressors.
- L'administració de ciclofosfamida va fer disminuir transitòriament els nivells de leucòcits i PMNs, i l'administració conjunta de ciclofosfamida i fluorouracil o una segona dosi de ciclofosfamida va fer augmentar el temps en el qual els recomptes van estar per sota de la normalitat.
- 7.** S'ha avaluat l'efecte del factor estimulador de colònies de granulòcits (G-CSF) en els recomptes de leucòcits i PMNs en ratolins normals i immunodeprimits.
- L'administració de G-CSF va fer augmentar els recomptes de PMNs fins a 15 vegades per sobre del que és normal en una setmana.
- 8.** S'ha comparat l'eficàcia del desoxicolat d'amfotericina B i de l'amfotericina B liposòmica en diferents models d'infecció experimental.
- En ratolins infectats amb *P. variotii*, les dues formulacions van ser equivalents a dosis baixes, però l'administració d'amfotericina B liposòmica a 10 mg/kg va provocar una disminució significativa de la presència del fong en alguns òrgans.
 - Les dosis baixes d'amfotericina B liposòmica va fer augmentar el TMS dels ratolins infectats amb *F. verticillioides*. Les dosis altes, a més, van fer

disminuir significativament la presència del fong en diversos òrgans.

- En els ratolins infectats per *S. proliferans*, es va observar un increment del TMS, que va ser més evident amb la dosi més alta d'amfotericina B liposòmica. L'administració de G-CSF amb la teràpia antifúngica no va millorar els resultats.

9. S'ha avaluat l'activitat *in vitro* de nou combinacions d'antifúngics davant de tres espècies del gènere *Fusarium* seguint la metodologia del NCCLS amb algunes modificacions.

- Les combinacions que s'han comportat de forma sinèrgica per un nombre més elevat de soques han estat les de ravuconazol combinat tant amb amfotericina B com amb terbinafina, i aquesta última combinada amb voriconazol.

10. S'ha avaluat l'activitat *in vitro* de nou combinacions d'antifúngics davant de *Paecilomyces variotii* i *Paecilomyces lilacinus* seguint la metodologia del NCCLS amb algunes modificacions.

- Les combinacions que s'han comportat de forma sinèrgica per un nombre més elevat de soques han estat totes les de terbinafina combinada amb azols.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar C, Pujol I, Sala J, Guarro J.** 1998. Antifungal susceptibilities of *Paecilomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:1601-1604.
- Alexopoulos CJ, Mims, CW, Blackwell M.** 1996. *Introductory mycology*. 4th ed. Wiley J and sons, Inc., New York.
- Allevato PA, Ohorodnik JM, Mezger E, Eisses JF.** 1984. *Paecilomyces javanicus* endocarditis of native and prosthetic aortic valve. *American Journal of Clinical Pathology* 82:247-252.
- Álvarez Gómez de Segura I, Tendillo Cortijo FJ.** 2001. Procedimientos experimentales: vías de administración, obtención de fluidos. En: *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Eds: Zúñiga JM, Tur Marí JA, Milocco SN, Piñeiro Gonzalez R. Mc Graw-Hill, Interamericana de España S. A. U.
- Alvarez M, Lopez Ponga B, Rayon C, García Gala J, Roson Porto MC, Gonzalez M, Martínez-Suarez JV, Rodriguex Tudela JL.** 1995. Nosocomial outbreak caused by *Scedosporium prolificans (inflatum)*: four fatal cases in leukemic patients. *Journal of Clinical Microbiology* 33:3290-3295.
- Anaissie E, Kantarjian H, Ro J, Hopfer R, Rolston K, Fainstein V, Bodey G.** 1988. The emerging role of *Fusarium* infections in patients with cancer. *Medicine* 67:77
- Anaissie EJ, Mahfouz TH, Kiwan EN.** 2003. Fungal infections in the patient with cancer. En: *Clinical Mycology*. Eds: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Elsevier Science, USA.
- Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH.** 2002. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:245-247.
- Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C, Rennie RP, Rex JH, Rinaldi MG.** 2000. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3457-3459.
- Berenguer J, Rodríguez-Tudela JL, Richard C, Alvarez M, Sanz MA, Gaztelurrutia L, Ayats J, Maertínez-Suárez JV.** 1997. Deep infections caused by

Scedosporium prolificans. A report on 16 cases in Spain and a review of the literature. *Medicine* 76:256-265.

Bibashi E, Kokolina E, Sigler L, Sofianou D, Memmos D. 2001. Uncommon causes of fungal peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis: a report of four cases during a ten-year period. *Mycoses* 44(Suppl 1):8.

Bosma F, Voss A, Van Hamersvelt HW, De Sevaux RG, Biert J, Kullberg BJ, Melchers WG, Verweij PE. 2003. Two cases of subcutaneous *Scedosporium apiospermum* infection treated with voriconazole. *Clinical Microbiology and Infection* 9:750-753.

Boswell GW, Buell D, Bekersky I. 1998. AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review. *Journal of Clinical Pharmacology* 38:583-592.

Boutati EI, Anaissie EJ. 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 90:999-1008.

Bouza E, Muñoz P, Vega L, Rodríguez-Creixems M, Berenguer J, Escudero A.. 1996. Clinical resolution of *Scedosporium prolificans* fungemia associated with reversal of neutropenia following administration of granulocyte colony-stimulating factor. *Clinical Infectious Diseases* 23:192-193.

Calhoun DL, Roberts GD, Galgiani JN, Bennett JE, Feingold DS, Jorgensen J, Kobayashi GS, Shadomy S. 1986. Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and the interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology* 23:298-231.

Cano J, Guarro J, Mayayo E, Fernández-Ballart J. 1992. Experimental infection with *Scedosporium inflatum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 30:413-420.

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

Capilla J, Yustes C, Mayayo E, Fernández B, Ortoneda M, Pastor FJ, Guarro J.

2003. Efficacy of albaconazole (UR-9825) in treatment of disseminated *Scedosporium prolificans* infection in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:1948-1951.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW.** 2001. *The fungi*. 2nd ed. Academic Press, London.
- Carrillo AJ, Guarro J.** 2001. In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2151-2153.
- Carrillo-Muñoz J, Pemán J, Gobernado M.** 1999. Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Revista Española de Quimioterapia* 12:181-204.
- Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Nelson KE.** 1996. Seasonal variation of disseminated *Penicillium marneffe* infections in the northern Thailand: a clue to the reservoir? *The Journal of Infectious Diseases* 173:1490-1493.
- Clancy CJ, Nguyen MH.** 1998. The combination of amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41:127-130.
- Clancy CJ, Yu YC, Lewin A, Nguyen MH.** 1998. Inhibition of RNA synthesis as a therapeutic strategy against *Aspergillus* and *Fusarium*: demonstration of in vitro synergy between rifabutin and amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:509-513.
- Clay K.** 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69:10-16.
- Clemons KV, Stevens DA.** 2000. Treatment of orogastrintestinal candidosis in SCID mice with fluconazole alone or in combination with recombinant granulocyte colony-stimulating factor or interferon γ . *Medical Mycology* 38:213-219
- Cofrancesco E, Boschetti C, Viviani MA, Bargiggia C, Tortorano AM, Cortellaro M, Zanussi C.** 1992. Efficacy of liposomal amphotericin B (AmBisome) in the eradication of *Fusarium* infection in a leukaemic patient. *Haematologica* 77:280-283.

- Como JA, Dismukes WE.** 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *The New England Journal of Medicine* 330:263-272.
- Consigny S, Dhedin N, Datry A, Choquet S, Leblond V, Chosidow C.** 2003. Successful voriconazole treatment of disseminated fusarium infection in an immunocompromised patient. *Clinical Infectious Diseases* 37:311-313.
- Cox NH, Irving B.** 1993. Cutaneous "ringworm" lesions of *Scopulariopsis brevicaulis*. *The British Journal of Dermatology* 129:726-728.
- Dale DC, Liles WC, Summer WR, Nelson S.** 1995. Review: granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)—role and relationships in infectious diseases. *The Journal of Infectious Diseases* 172:1061-1075.
- Dannaoui E, Mouton JW, Meis JF, Verweij PE; Eurofung Network.** 2002. Efficacy of antifungal therapy in a nonneutropenic murine model of zygomycosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1935-1939.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ.** 2000. *Atlas of Clinical Fung*, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.
- Debono M, Gordee RS.** 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annual Review of Microbiology* 48:471
- Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, and Warnock DW.** 1997a. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40:401–414.
- Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, Warnock DW, and Kelly SL.** 1997b. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:1364–1368.
- Denning DW, Warn P.** 1999. Dose range evaluation of liposomal nystatin and comparisons with amphotericin B and amphotericin B lipid complex in temporarily neutropenic mice infected with an isolate of *Aspergillus fumigatus* with reduced susceptibility to amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:2592-2599.

- Deray G.** 2002. Amphotericin B nephrotoxicity. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49(Suppl S1):37-41.
- Dignani MC, Kiwan EN, Anaissie EJ.** 2003. Hyalohyphomycoses. En: *Clinical Mycology*. Eds: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Elsevier Science, USA.
- Dixon DM, Polak A.** 1987. In vitro and in vivo drug studies with three agents of central nervous system phaeohyphomycosis. *Chemotherapy* 33:129–40.
- Doern GV, Tubert TA, Chopin K, Rinaldi MG.** 1986. Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 24:507-511.
- Drouhet E, Dupont B, Ravisse P.** 1991. Étude expérimentale d'une souche hautement virulente de *Scedosporium inflatum* isolée d'une arthrite du genou. *Journal de Mycologie Médicale* 118:16-20.
- Duong TA.** 1996. Infection due to *Penicillium marneffe*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:2062-2066.
- Edwards JE.** 1997. International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. *Clinical Infectious Diseases* 25:43-49.
- Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Hazen C, Martinez-Suarez JV, Scalise G.** 1998. Standardisation of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Medical Mycology* 36(Suppl 1):68-78.
- Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper Jr, Fothergill A, McGinnis MR, Menezes P, Messer SA, Nelson PW, Odds FC, Pasarell L, Peter J, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, Shankland GS, Walsh TJ, Weitzman I.** 1997. Multicenter evaluation of proposed standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 35:139-143.
- Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, Ghannoum M, Hazen KC, Pfaller MA, Rinaldi M, Walsh TJ.** 2001a. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp. NCCLS collaborative evaluation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:1828-1835.

- Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG.** 2002. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology* 40:3776-3781.
- Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Paetznick V, Peter J, Rinaldi M.** 1995. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39:314-319.
- Espinel-Ingroff A, Kerkering TM.** 1991. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 29:393-394.
- Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, Villareal K, Pfaller MA, Gerarden T, Rinaldi MG, Fothergill A.** 1992. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology* 30:3138-3145.
- Espinel-Ingroff A, Shadomy S.** 1989. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 8:352-361.
- Espinel-Ingroff A.** 1994. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Revista Española de Quimioterapia* 7:20-31
- Espinel-Ingroff A.** 2001b. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 39:954-958.
- Formiga Pérez F.** 1997. Infecciones micóticas en las enfermedades sistémicas. En: *Micosis sistémicas. Actualización*. Eds: Gil Aguado A, Lavilla Uriol P, Pintado García V. Grupo Aula Médica, S.A. Madrid.
- Fridkin SK, Jarvis WR.** 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 9:499-511.
- Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller A, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS,**

- Body BA, Frey C, Hall G, Roberts GD, Nolte FB, Odds FC, Rinaldi MG, Sugar AM, Villareal K.** 1993. Multicenter evaluation of a macrobroth antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37:39-45.
- Goa KL, Barradell LB.** 1995. Fluconazole- an update on its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients. *Drugs* 50:658-590.
- Gosbell IB, Morris ML, Gallo JH, Weeks KA, Neville SA, Rogers AH.** 1999. Clinical, pathologic and epidemiologic features in infection with *Scedosporium prolificans*: four cases and review. *Clinical Microbiology and Infection* 5:672-686.
- Graybill JR, Bocanegra R, Lambrosi C, Luther MF.** 1997. Granulocyte colony stimulating factor therapy of experimental cryptococcal meningitis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 35:243-247
- Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D, Luther MF.** 1998. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 2467-2473
- Graybill JR, Mitchell L.** 1978. Cyclophosphamide effects on murine cryptococcosis. *Infection and Immunity* 21:674-677.
- Graybill JR, Najvar LK, Gonzalez GM, Hernandez S, Bocanegra R.** 2003. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:1371-1376.
- Graybill JR.** 2000a. Systemic antifungal drugs. En: *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Eds: Kuswaha RKS and Guarro J. *Revista Iberoamericana de Micología*. Bilbao.
- Graybill JR.** 2000b. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resistance Updates* 3:364-383
- Guarro J, Gené J.** 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14:741-754.
- Guarro J, Pujol I, Mayayo E.** 1999. In vitro and in vivo activities of antifungal agents

- against *Fusarium solani*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43:1256-1257.
- Gueho E, de Hoog GS.** 1991. Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. Journal de Mycologie Médicale 118:329.
- Gueho E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B.** 1994. *Trichosporon* on humans: a practical account. Mycoses 37:3-10.
- Gueho E, Leclerc MC, de Hoog Gs, Dupont B.**1997. Molecular taxonomy of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. Mycoses 40:69-81.
- Guerrero A, Torres P, Duran MT, Ruiz-Díez B, Rosales M, Rodríguez-Tudela JL.** 2001. Airborne outbreak of nosocomial *Scedosporium prolificans* infection. Lancet 357:1267-1268.
- Gugnani HC.** 2000. Nondermatophytic filamentous keratophilic fungi and their role in human infection. En: Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Eds: Kuswaha RKS and Guarro J. Revista Iberoamericana de Micología. Bilbao.
- Hebrecht R, Letscher-Bru V, Fohrer C, Campos F, Natarajan-Ame S, Zamfir A, Waller J.** 2002. *Acremonium strictum* pulmonary infection in a leukemic patient successfully treated with posaconazole after failure of amphotericin B. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 21:814-817.
- Hennequin C, Bernailly N, Silly C, Sorin M, Scheinmann, Lenoir G, Gaillard JL, Berche P.** 1997. In vitro susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41:2064-2066.
- Ho KL, Allevato PA, King P, Chanson JL.** 1986. Cerebral *Paecilomyces javanicus* infection. An ultra-structural study. Acta Neuropathologica 72:134-141.
- Hosseini-Yeganeh M, McLachlan AJ.** 2002. Physiologically based pharmacokinetic model for terbinafine in rats and humans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46:2219-2228.
- Howden BP, Slavin MA, Schwarzer AP, Mijch AM.** 2003. Successful control of disseminated *Scedosporium prolificans* infection with a combination of voriconazole and terbinafine. European Journal of Clinical Microbiology and

Infectious Diseases 22:111-113.

- Idigoras P, Pérez-Trallero E, Piñeiro L, Larruskain J, López-Lopategui MC, Rodríguez N, González JM.** 2001. Disseminated infection and colonization by *Scedosporium prolificans* a review of 18 cases, 1990-1999. *Clinical Infectious Diseases* 32:E158-E165.
- Kalish SB, Goldschmidt R, Li C, Knop R, Wilner G, Victor A.** 1982. Infective endocarditis caused by *Paecilomyces varioti*. *American Journal of Clinical Pathology* 78:249-252.
- Kane J, Summerbell RC, Sigler L, Kradjen S, Land G.** 1997. *Laboratory handbook of Dermatophytes: a clinical guide and laboratory manual of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair and nails.* Belmont, CA. Star.
- Kelsey SM, Goldman JM, McCann S, Newland AC, Scarffe JH, Oppenheim BA, Mufti GJ.** 1999. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic patients: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Bone Marrow Transplantation* 23:163-168.
- Kerridge D, Vanden Bossche H.** 1990. Drug discovery: a biochemist approach. En: *Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases.* Ed: Ryley JF. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag.
- Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Rinaldi MG, Patterson TA.** 2000. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of disseminated invasive aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:2865-2868.
- Kobayashi G, Spitzer ED.** 1989. Testing of organisms for susceptibility to triazoles: It is justified?. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 8:387-389.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE.** 1992. *Medical Mycology.* Lea and Febiger, Philadelphia.
- Larone DH, Mitchel TG, Walsh TJ.** 1999. Histoplasma, Blastomyces, Coccidioides, and other dimorphic fungi causing systemic mycoses. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. Eds: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Washington DC, American Society for Microbiology.

- Lass-Flörl C, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Kreczy A, Dierich MP, and Niederwieser D.** 1998. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42:497–502.
- Legrand C, Anaissie E, Hasem R, Nelson P, Bodey GP, Ro J.** 1991. Experimental hyalohyphomycosis in a murine model. *The Journal of Infectious Diseases* 164:944-948.
- Lieschke GJ, Burgess AW.** 1992. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2). *New England Journal of Medicine* 327:99-106.
- Lord BI, Molineux G, Pojda Z, Souza LM, Mermoud JJ, Dexter TM.** 1991. Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo. *Blood* 77:2154-2159
- Lozano-Chiu M, Arikan S, Paetznick VL, Anaissie EJ, Loebenberg D, Rex JH.** 1999. Treatment of murine fusariosis with SCH 56592. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:589-591.
- Magee DM, Cox RA.** Cell-mediated immunity and endemic mycoses. En: *Fungal pathogenesis. Principles and clinical applications*. Eds: Calderone RA and Cilhar RL. New York, 2002.
- Martin CA, Roberts S, Greenberg RN.** 2002. Voriconazole treatment of disseminated paecilomycosis infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Infectious Diseases* 35:e78-81.
- Matsumoto M, Matsubara S, Matsuno T, Tamura M, Hattori K, Nomura H, Ono Y, Yokota T.** 1987. Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor on microbial infection in neutropenic mice. *Infection and Immunity* 55:2715-2720.
- Mayayo E, Pujol I, Guarro J.** 1999. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *Journal of Medical Microbiology* 48:363-366.
- McGinnis MR, Rinaldi MG.** 1991. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. En:

Antibiotic in Laboratory Medicine. 3rd ed. Eds: Lorian V. Baltimore, Williams and Wilkins Co.

- Meletiadiis J, Mouton JW, Meis JFGM, Verweij PE.** 2003. In vitro interaction modelling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrobial Agents and Chamotherapy* 47:106-117.
- Moore CB, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, and Denning DW.** 2000. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *The Journal of Infection* 41:203–220.
- Mosquera J, Sharp A, Moore CB, Denning DW.** 2002. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole, fluconazole, amphotericin B and 5-flucytosine against *Aspergillus* spp. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50:189-194.
- Muñoz P, Marin M, Tornero P, Martin Rabadan P, Rodríguez-Creixems, Bouza E.** 2000. Successful outcome of *Scedosporium apiospermum* disseminated infection treated with voriconazole in a patient receiving corticosteroid therapy. *Clinical Infectious Diseases* 31:1499-1501.
- Naidu J, Singh SM.** 1992. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces variotii*: a case report, animal pathogenicity and "in vitro" sensivity. *Antoine van Leeuwenhoek*. 62:225-230.
- National Committee for Clinical and Laboratory Standards.** 2002. M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS. Wayne, Pennsylvania, USA.
- National Committee for Clinical and Laboratory Standards.** 2002. M38-A. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. NCCLS. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Odds FC, van Gerven F, Espinel-Ingroff A, Bartlett MS, Ghannoum MA, Lancaster MV, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, and Walsh TJ.** 1998. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:282–288.
- Orth B, Frei R, Itin PH, Rinaldi MG, Speck B, Gratwohl A, Widmer AF.** 1996. Outbreak of invasive mycoses caused by *Paecilomyces lilacinus* from a contaminated skin lotion. *Annals of Internal Medicine* 125:799-806.

- Pacetti SA, Gelone SP.** 2003. Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. *The Annals of Pharmacotherapy* 37:90-98.
- Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, Fromtling RA, Hall GS, Huges CE, Odds FC, Sugar AM.** 1990. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34:1648-1654.
- Pfaller MA, Rinaldi MG.** 1992. In vitro testing of susceptibility of fluconazole. En: *The antifungal agents. Fluconazole*. Eds: Powderly WB, Vant Wout JW. Marius Press. Lancashire, UK.
- Polak A.** 1999. The past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycoses* 42:355-370.
- Pontón J, Rùchel R, Clemons KV, Coleman, DC, Grillot, Guarro J, Aldebert D, Ambroise-Thomas P, Cano J, Carrillo-Muñoz AJ, Gené J, Pinel C, Stevens DA, Sullivan DJ.** 2000. Emerging pathogens. *Medical Mycology* 38(Suppl 1):225-236
- Proffitt RT, Satorius A, Chiang S, Sullivan L, Adler-Moore JA.** 1991. Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 28(Suppl B):49-61.
- Pujol I, Guarro J, Gené J, Sala J.** 1997b. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *The Journal of Antibacterial Chemotherapy* 39:163-167.
- Pujol I, Guarro J, Sala J, Riba MD.** 1997a. Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against *Fusarium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:808-811.
- Revankar SG, Graybill JR.** 2003. Antifungal therapy. En: *Clinical Mycology*. Eds: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Elsevier Science, USA.
- Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, Pullen R, Rinaldi MG.** 2002. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. *Clinical Infectious Diseases* 34:467-476.

- Rex JH, Pappas PG.** 2003. Hematogenously disseminated fungal infections. En: Clinical Mycology. Eds: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Elsevier Science, USA.
- Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL.** 1997. Development of interpretative breakpoints for antifungals susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Clinical Infectious Diseases 24:235-247.
- Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN.** 1993. Antifungal susceptibility testing. Clinical Microbiology Reviews 6:367-381.
- Rex JR, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum M, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW.** 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clinical Microbiology Reviews 14:643-658.
- Richardson MD, Kokki M.** 2001. Therapeutic guidelines in systemic fungal infections, second edition. Curent Medical Literature, Ltd. UK.
- Richardson MD, Warnock DW.** 1997. Fungal infection. Diagnosis and management. 2nd edn. Blackwell Science Ltd. United Kingdom.
- Rinaldi MG.** 1996. Phaeohyphomycosis. Dermatologic Clinics 14:147
- Rippon JW.** 1988. Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 2nd edn, WB Saunders company, Philadelphia, USA.
- Rubin RH.** Fungal infections in the organ transplant recipient. En: Clinical Mycology. Eds: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Elsevier Science, USA.
- Ryder NS, Leitner I.** 2001. Synergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. Medical Mycology 39:91-95.
- Salkin IF, McGinnis MR, Dykstra MJ, Rinaldi MG.** 1988. *Scedosporium inflatum*, an emerging pathogen. Journal of Clinical Microbiology 26:498-503.

- Schell WA.** 1995. New aspects of emerging fungal pathogens. A multifaced challenge. Clinics in Laboratory Medicine 15:365-387.
- Schipper MAA and Stalpers JA.** 2003. Zygomycetes: The order mucorales. En: Pathogenic fungi in humans and animals. 2nd ed. Howard DH, ed. Mycology series. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Schmitt HJ, Andrade J, Edwards F, Niki Y, Bernard E, Armstrong D.** 1990. Inactivity of terbinafine in a rat model of pulmonary aspergillosis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 9:832-835.
- Schwartz S, Milatovic D, Thiel E.** 1997. Successful treatment of cerebral aspergillosis with a novel triazole (voriconazole) in a patient with acute leukaemia. British Journal of Haematology 97:663-665.
- Shadomy S, Espinel-Ingroff A, Cartwright RY.** 1991. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. En: Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. Eds: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Shadomy S, Shadomy HJ.** 1991. Comparative in vitro antifungal susceptibility studies with 30 serotype A and B isolates of *Candida albicans*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 14:21-22.
- Sherwood-Pyke MA, Gray J.** 1985. Silurian fungal remains: probable records of the class ascomycota. Lethaia 18:1-20
- Shumann GL.** 1991. Plant diseases: their biology and social impact. American Phytopathological Society, Sant Paul, MN.
- Sigler L.** 2003. Miscellaneous opportunistic fungi: microascaceae, and other ascomycetes, hyphomycetes, coelomycetes, and basidiomycetes. En: Pathogenic fungi in humans and animals. 2nd ed. Howard DH, ed. Mycology series. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Stevens DA.** Combination immunotherapy and antifungal chemotherapy. 1998. Clinical Infectious Diseases 26:1266-1269
- Stockstill MT, Kauffman CA.** 1983. Comparison of cryptococcal and tuberculous

meningitis. Archives of Neurology 40:81-85.

Summerbell R. 2003. Ascomycetes: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix*, *Piedraia*, and their relatives. En: Pathogenic fungi in humans and animals. 2nd ed. Howard DH, ed. Mycology series. Marcel Dekker, Inc. New York.

Tobón AM, Arango M, Fernández D, Restrepo A. 2003. Mucormycosis (zigomycosis) in heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. Clinical Infectious Diseases 36:1488-1491.

Valencia Ortega ME, Camacho Siles J, Pintado García V. 1997. Criptococosis meníngea. En: Micosis sistémicas. Actualización. Eds: Gil Aguado A, Lavilla Uriol P, Pintado García V. Grupo Aula Médica, S.A. Madrid.

van't Hek LG, Verweij PE, Weemaes CM, van Dalen R, Yntema JB, Meis JF. 1998. Successful treatment with voriconazole of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 157:1694-1696.

Verweij PE, Cox NJ, Meis JF. 1997. Oral terbinafine for treatment of pulmonary *Pseudallescheria boydii* infection refractory to itraconazole therapy. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 16:26-28.

Virgili A, Zampino MR, Mantovani L. 2002. Fungal skin infections in organ transplant patients. American Journal of Clinical Dermatology 3:19-35.

Viudes A, Pemán J, Cantón E, López-Ribot J, Gobernado M. 2001. Actividad de las asociaciones de antifúngicos sistémicos. Revista Española de Quimioterapia 14:30-39.

Walsh TJ, Goodman JL, Pappas P, Bekersky I, Buell, Barrett J, Anaissie EJ. 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. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45:3487-3496.

Walsh TJ, Peter J, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Pizzo PA. 1995. Activities of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudallescheria boydii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy

39:1362-1364.

- Walsh TJ, Yeldandi V, McEvoy M, Gonzalez C, Chanock S, Freifeld A, Seibel NI, Whitcomb PO, Jarosinski P, Boswell G, Bekersky I, Alak A, Buell D, Barret J, Wilson W.** 1998. Safety, tolerance and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:2391-2398.
- Warnock DW.** 1991. Introduction to the management of fungal infection in the compromised patient. En: *Fungal infection in the compromised patient*. 2nd ed. Eds: Warnock DW and Richardson MD. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Westenfeldt F, Alston WK, Winn WC.** 1996. Complicated soft tissue infection with prepatellar bursitis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host: case report and review. *Journal of Clinical Microbiology* 34:559-562.
- Williamson PR, Kwong-Chung KJ, Gallin JI.** 1992. Successful treatment of *Paecilomyces variotii* infection in a patient with chronic granulomatous disease and a review of *Paecilomyces* species infections. *Clinical Infectious Diseases* 14:1023-1026.
- Wilson CM, O'Rourke EJ, McGinnis MR, Salkin JF.** 1990. *Scedosporium inflatum*: clinical spectrum of a newly recognized pathogen. *The Journal of Infectious Diseases* 161:102-107.
- Wood GM, McCormack JG, Muir DB, Ellis DH, Ridley MF, Pritchard R, Harrison M.** 1992. Clinical features of human infection with *Scedosporium inflatum*. *Clinical Infectious Diseases* 14:1027-1033.