



EVALUACIÓN DE LA PATOGENIA EXPERIMENTAL Y SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS DE HONGOS FILAMENTOSOS

Enrique Calvo Manso

Dipòsit Legal: T. 723-2012

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

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

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

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

**Evaluación de la patogenicia
experimental y sensibilidad a los
antifúngicos de hongos filamentosos**

Enrique Calvo Manso

Tesis Doctoral

2012



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Josep Guarro Artigas, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili y Francisco Javier Pastor Molas, Profesor Titular de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili

HACEN CONSTAR QUE:

La Tesis Doctoral titulada **“EVALUACIÓN DE LA PATOGENIA EXPERIMENTAL Y SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS DE HONGOS FILAMENTOSOS”**, presentada por Enrique Calvo Manso, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos necesarios para optar por el título de Doctor.

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

Reus, 21 de febrero de 2012

Dr. Josep Guarro Artigas

Dr. Francisco Javier Pastor Molas

Antes de nada, es de justicia agradecer a todas las personas que, en mayor o menor medida, han colaborado en la elaboración de este trabajo.

En primer lugar, a mis directores de tesis, el Dr. Josep Guarro, por el respeto, atención y empuje recibido durante estos años, y al Dr. F. Javier Pastor, por sus minuciosas correcciones de los artículos y de la tesis.

A la Dra. María José Figueras y al Dr. Josep Cano, a quienes debo el haber entrado a formar parte del departamento.

A los Dres. Alberto Stchigel y Emilio Mayayo, grandes, enormes conversadores a los que agradezco su cercanía y sus buenos consejos. A los Dres. Josepa Gené, Javier Capilla, Carolina Silvera, Dania García, Kendra Rodríguez, Roxana Beaz, Isabel Pujol y Frederic Ballester por la ayuda prestada durante estos años, y a Mabel Inza por tener siempre una solución a cualquier tipo de problema.

Por ser buenos amigos antes que compañeros de trabajo, a los Dres. Mónica Azor, Félix Gilgado, Anabel Alperi, Rita Marimon y muy especialmente a mis valedores, los Dres. Mar Rodríguez, Carol Serena y Marçal Mariné por su gran paciencia a la hora de enseñarme todo lo necesario para moverme por el laboratorio.

A mis compañeras de fatigas Valentina y Fabiola por su constante disponibilidad para echar una mano y por el vital apoyo moral recibido estos últimos tiempos. A la peculiar Yasmina por su amistad y sus lecciones de biología molecular, y al Dr. Eduardo Alvarez, el verdadero informático del departamento, por las entrañables charlas sobre cerveza y fútbol.

Infinitas gracias a Cati, Núria y Carme, amigas, compañeras de desayuno y de las personas más competentes que conozco. Ha sido un lujo poder contar con su imprescindible colaboración estos años.

También quisiera agradecer a Amparo, Esperanza y Juan su ayuda con los animales, así como a Montse y a Imma, el facilitar tanto los trámites gracias

a su capacidad para arreglar grandes problemas con una simple llamada telefónica. A Phil, sus correcciones y sus entretenidas clases de inglés, y a Pilar el hacer tan fácil lo casi imposible, la estadística.

A mis amigos Dani y Pablo por sus terapéuticas visitas, y a Anna por su "ayudita" en el diseño de la portada.

A Gemma, la persona que con su cariño, comprensión y paciencia, me ayuda a tirar para delante todos los días.

A mi hermano Javi, por el impagable servicio técnico 24 horas, y porque, a su manera, también ha colaborado en esta tesis.

Por último, el agradecimiento más sentido es para José Luis y Maribel, mis padres. A ellos les debo mi educación y, gracias a enormes sacrificios en sus vidas, el privilegio que hemos tenido mi hermano y yo de poder elegir nuestros estudios. Por su honradez, honestidad, trabajo y muchas cosas más son mi mayor ejemplo del que, por muy "Doctor" que sea, todavía me queda mucho que aprender.

1. Introducción	
1.1. Generalidades.....	3
1.2. Micosis causadas por hongos filamentosos.....	5
1.2.1. Micosis superficiales.....	6
1.2.2. Micosis cutáneas.....	6
1.2.3. Micosis subcutáneas.....	7
1.2.3.1. Esporotricosis.....	7
1.2.3.2. Lacaciosis.....	8
1.2.3.3. Eumicetoma.....	9
1.2.3.4. Cromoblastomycosis.....	9
1.2.3.5. Feohifomicosis.....	11
1.2.4. Micosis sistémicas.....	11
1.2.4.1. Aspergilosis.....	12
1.2.4.2. Feohifomicosis.....	14
1.3. Antibióticos antifúngicos	15
1.3.1. Polienos.....	16
1.3.2. Azoles.....	18
1.3.3. Análogos de precursores de ácidos nucleicos.....	21
1.3.4. Equinocandinas.....	21
1.3.5. Alilaminas.....	22
1.3.6. Terapia antifúngica combinada.....	23
1.4. Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos	24
1.4.1. Métodos <i>in vitro</i> en hongos en hongos filamentosos.....	25
1.4.2. Métodos <i>in vivo</i> . Modelos experimentales.....	28
1.4.3. Correlación entre los métodos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	29
2. Interés y objetivos del estudio.....	33
3. Materiales y métodos	
3.1. Estudios <i>in vitro</i>.....	41
3.1.1. Cepas.....	41
3.1.2. Conservación de las cepas.....	42

3.1.3. Agentes antifúngicos.....	42
3.1.4. Metodología.....	42
3.1.4.1. Preparación de las microplacas de antifúngicos	43
3.1.4.2. Preparación de las microplacas de combinacione dobles de antifúngicos..	45
3.1.4.3. Preparación de los inóculos.....	46
3.1.4.4. Estudios de disco-difusión.....	47
3.1.4.5. Definiciones.....	48
3.2. Estudios <i>in vivo</i>	49
3.2.1. Cepas	49
3.2.2. Animales de experimentación	50
3.2.3. Inmunosupresión	51
3.2.4. Infección	51
3.2.5. Fármacos.....	52
3.2.6. Tratamientos, dosis y vias de administración.....	53
3.2.7. Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado.....	54
3.2.8. Análisis adicionales de la eficacia de los antifúngicos.....	55
3.2.9. Bioensayo.....	55
3.2.10. Detección y cuantificación de galactomanano en suero.....	57
3.2.11. Histopatología.....	58
3.2.12. Análisis estadístico.....	59
4. Resultados	
4.1. Antifungal therapy in an athymic murine model of chromoblastomycosis by <i>Fonsecaea pedrosoi</i>.	65
Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Hernández P, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011, 55:3709-3713.	
4.2. Histopathology and antifungal treatment of experimental murine chromoblastomycosis caused by <i>Cladophialophora carrionii</i>.	73
Calvo E, Pastor FJ, Salas V, Mayayo E, Capilla J, Guarro J. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011, 67:666-670	

4.3. Murine model of a disseminated infection by the novel fungus <i>Fonsecaea monophora</i> and successful treatment with posaconazole.	81
Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM, Mayayo E, Salas V, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010, 54:919-923.	
4.4. Comparative virulence of three species of <i>Exophiala</i> in mice.	89
Calvo E, Rodríguez MM, Mariné M, Mayayo E, Pastor FJ, Guarro J. Medical Mycology. 2010, 48:853-857.	
4.5. Antifungal therapies in murine disseminated phaeohyphomycoses caused by <i>Exophiala</i> species.	97
Calvo E, Pastor FJ, Guarro J. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010, 65:1455-1459.	
4.6. <i>In vitro</i> activity and <i>in vivo</i> efficacy of anidulafungin in murine infections by <i>Aspergillus flavus</i>.	105
Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011, 55:1290-1292.	
4.7. Combined therapy of voriconazole and anidulafungin in murine infections by <i>Aspergillus flavus</i>.	111
Calvo E, Pastor FJ, Salas V, Mayayo E, Guarro J. Mycopathologia. 2011, 173:251-257.	
4.8. Efficacy of anidulafungin against <i>Aspergillus niger</i> <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	121
Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. International Journal of Antimicrobial Agents. 2011, 38:360-363.	
4.9. Are epidemiological cut-off values predictors of the <i>in vivo</i> efficacy of azoles in experimental aspergillosis?	127
Calvo E, Pastor FJ, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi M, Salas V, Guarro J. Enviado a la revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Ref. No.: IJAA-D-12-00105.	

5. Discusión

5.1. Cromoblastomycosis.....	151
5.2.1. <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	151
5.2.2. <i>Cladophialophora carrionii</i>	153
5.2. Feohifomicosis sistémicas.....	155
5.1.1. <i>Fonsecaea monophora</i>	155
5.1.2. <i>Exophiala spp</i>	157
5.3. Aspergilosis invasora.....	159

5.3.1. <i>Aspergillus flavus</i>	160
5.3.2. <i>Aspergillus niger</i>	162
5.3.3. Correlación entre la actividad <i>in vitro</i> del voriconazol y del posaconazol y su eficacia <i>in vivo</i> frente a <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus niger</i>	163
6. Conclusiones.....	169
7. Bibliografía.....	175

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

El Reino *Fungi* está formado por organismos eucariotas, uni o pluricelulares y heterótrofos, cuyas estructuras somáticas están rodeadas de paredes celulares compuestas por quitina y β -glucano. Son organismos que digieren materia orgánica insoluble por medio de la secreción de enzimas y la posterior absorción de los nutrientes solubilizados. Los hongos comparten un ancestro más reciente con los animales, de los que divergieron hace aproximadamente 1.500 millones de años, que con ningún otro organismo eucariota (Madigan *et al.*, 2003). Se cree que los hongos pasaron de ser acuáticos a terrestres hace unos 400 millones de años, durante el período siluriano, justo después de la aparición de las primeras plantas terrestres (Berbee y Taylor, 1993).

A pesar de que el ser humano ha convivido durante toda su evolución con los hongos, y que conoce sus propiedades desde hace miles de años, el estudio de los hongos se remonta únicamente a 250 años. Durante el siglo XVIII, los botánicos realizaron muchos avances en el reconocimiento y clasificación de las setas o macrohongos, siendo por aquel entonces la época en la que los primeros microscopistas comenzaron el estudio de sus estructuras. A principios del siglo XIX se denominó hongos microscópicos o microhongos a aquellos diminutos organismos que causaban enfermedades que afectaban a plantas y que presentaban estructuras similares a los hongos ya conocidos (Carlile *et al.*, 2001). En el año 1969 Whittaker (Whittaker, 1969) propuso la creación de un reino nuevo al separar los hongos de las plantas, sentando así las bases de la micología como ciencia. Hasta la fecha, se han descrito aproximadamente unas 100.000 especies de hongos, aunque se estima que el número total pueda alcanzar el millón y medio (Hawksworth, 2001). La clasificación de los hongos ha variado mucho en los últimos años, especialmente desde el desarrollo y la aplicación en la micología de técnicas de biología molecular. Actualmente, los hongos se clasifican en cuatro filos: Ascomycetos, Basidiomycetos, Zigomicetos y Quitridiomycetos (Taylor *et al.* 2004). A su vez, según el tipo de relación con otros organismos, los hongos pueden ser saprobios, mutualistas o parásitos. La mayoría de los hongos son saprobios, ya que forman parte del medio externo y se desarrollan a partir de la materia orgánica en

descomposición. Los hongos mutualistas viven asociados con otros organismos en beneficio recíproco, como por ejemplo las especies de hongos asociadas a las raíces de las plantas formando micorrizas. Por último, los hongos parásitos crecen a expensas de otros organismos causándoles perjuicios. Se han descrito tres tipos de hongos parásitos: los fitopatógenos, los cuales se desarrollan sobre un huésped vegetal produciendo lesiones; los hongos micopatógenos, que parasitan otros hongos, y los hongos parásitos de animales, los cuales pueden causar enfermedades fundamentalmente por tres mecanismos: invasivo, alérgico y tóxico.

En base a su morfología, los hongos se dividen en levaduras, hongos filamentosos y hongos dimórficos. Las levaduras son hongos unicelulares de forma esférica o elipsoidal, con un tamaño comprendido entre 3 y 5 μm . Se dividen principalmente por gemación y en cultivo producen colonias de aspecto húmedo, cremoso y opaco. Dentro de este grupo encontramos géneros de hongos patógenos humanos tales como *Candida* o *Cryptococcus*, así como otros de gran importancia en la industria alimentaria como *Saccharomyces*. Sin embargo, la gran mayoría de hongos pertenece al grupo de los hongos filamentosos o mohos. Éstos presentan una estructura pluricelular denominada micelio que está formada por un conjunto de filamentos tubulares o hifas. Este crecimiento provoca que las colonias de estos organismos tengan un aspecto algodonoso. Los hongos filamentosos poseen un micelio adosado o inmerso en el sustrato y un micelio aéreo en el que desarrollan sus estructuras reproductivas. Por último, algunos hongos pueden presentar formas levaduriformes o filamentosas dependiendo de las características del ambiente (temperatura, pH, concentración de CO_2 ...). A este grupo de organismos se les denomina hongos dimórficos.

Desde el punto de vista económico, los hongos pueden ofrecer múltiples beneficios, ya que se utilizan como alimentos, fermentadores en la producción de vino y cerveza, en la maduración de quesos y en el control biológico de plagas agrícolas. Además, son utilizados como fuentes de sustancias de enorme utilidad en medicina y en la bioindustria como son los antibióticos y los agentes para estimular el desarrollo de las plantas (hongos formadores de micorriza). Sin embargo, también pueden causar

graves perjuicios al actuar como parásitos de plantas y animales, o como contaminantes de alimentos.

Aunque podemos encontrar cientos de miles de especies de hongos en el ambiente, solo unas 500 causan enfermedades en los seres humanos (Richardson y Warnock, 2003; de Hoog *et al.*, 2000). Las infecciones causadas por hongos reciben el nombre de micosis y suelen ser de curso clínico crónico (de larga duración) ya que los hongos crecen con lentitud. Como ya se ha comentado, los hongos y los animales son organismos eucariotas y por lo tanto poseen células similares, lo cual dificulta la obtención de fármacos antifúngicos con elevada toxicidad selectiva.

1.2. Micosis causadas por hongos filamentosos

Existen diferentes factores que dificultan el establecimiento de micosis en los humanos. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de hongos suele ser más baja que la del organismo humano. Por otro lado, la mayor parte de sus sistemas enzimáticos actúa más eficazmente con potenciales redox propios de sustratos muertos que en el estado relativamente más reducido de los tejidos vivos. Además, el organismo humano posee un eficaz sistema de defensas celulares para combatir el desarrollo de los hongos. Por todo ello, el establecimiento de una micosis depende, sobre todo, de su capacidad para adaptarse a los tejidos y resistir los mecanismos de defensa del huésped (Casadevall y Pirofski, 2001). Precisamente, el aumento de la población con alteraciones del sistema inmunitario debido a la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la utilización de fármacos inmunosupresores en la cirugía de trasplantes de órganos y de médula ósea, las nuevas terapias anticancerosas, etc., ha determinado un aumento en la incidencia de las micosis invasoras en las últimas décadas.

Las micosis se pueden clasificar según la vía de entrada del hongo o la localización de la infección. Según la vía de entrada, la infección puede ser endógena o exógena. Las infecciones exógenas pueden adquirirse por vía aérea (inhalación de esporas), cutánea o percutánea, tras la inoculación traumática del agente infeccioso. Una infección fúngica endógena es aquella producida por hongos presentes en la microbiota de la piel y las mucosas.

Los hongos causantes de micosis pueden clasificarse como patógenos primarios si infectan a huéspedes inmunocompetentes, o como patógenos oportunistas cuando infectan a huéspedes inmunocomprometidos.

Por último, el criterio de clasificación más comúnmente utilizado en las micosis hace referencia a su localización anatomoclínica, dividiéndose éstas en:

1.2.1. Micosis superficiales

Son micosis adquiridas por contacto cuya afectación se limita a las capas más externas de la piel y del pelo (capa córnea de la piel y la porción suprafolicular del pelo). Este tipo de micosis afecta a tejidos inertes, por lo que no tiene lugar una respuesta inmunitaria detectable en el huésped. Acostumbran a ser asintomáticas, presentando ocasionalmente un leve enrojecimiento y prurito. El diagnóstico de las micosis superficiales es relativamente sencillo y suelen responder bien a la terapia. Los agentes etiológicos más frecuentes de estas infecciones son *Piedraia hortae* y *Trichosporon* spp, causantes de las "piedras", afecciones de la porción extrafolicular del pelo que presentan nódulos duros e irregulares formados por agregados fúngicos; *Trichophyton mentagrophytes*, *Acremonium* spp., *Scopulariopsis* spp., y *Fusarium* spp. los cuales son causantes de onicomycosis, que afectan tanto a la placa como al lecho ungueal; *Malassezia* spp., una levadura causante de la pitiriasis versicolor, y *Hortaea werneckii*, agente causal de la tiña negra (Ameen, 2010).

1.2.2. Micosis cutáneas

Son micosis que afectan a las capas queratinizadas de la piel, pelo y uñas. Estas infecciones pueden provocar una respuesta inmunitaria detectable en el huésped produciendo a su vez síntomas tales como prurito, descamación, pelo quebradizo, eritemas anulares, y engrosamiento y decoloración de las uñas (Murray, 2002). Los hongos denominados dermatofitos son los principales causantes de este tipo de infecciones (dermatofitosis en estos casos) siendo *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum* los géneros más frecuentemente implicados (de Hoog *et al.*, 2000). Según la zona

anatómica a la que afectan, las dermatofitosis tienen diferentes denominaciones: *Tinea capitis* (cuero cabelludo), *Tinea barbae* (barba y bigote), *Tinea corporis* (tronco, abdomen, extremidades y cara), *Tinea cruris* (región inguinal), *Tinea manum* (palma de las manos, dedos y espacios interdigitales) *Tinea pedis* (planta y espacios interdigitales de los pies) y *Tinea unguium* (uñas). Aparte de las especies de dermatofitos ya citadas, especies de otros géneros como *Aspergillus* pueden también ser causantes de estas infecciones (López-Jodrá, 99).

1.2.3. Micosis subcutáneas

Son micosis que afectan a tejido subcutáneo y a estratos profundos de la dermis pudiendo incluso extenderse al tejido conjuntivo, músculo y hueso. El agente etiológico accede a estos tejidos a través de una inoculación traumática de material contaminado, produciendo una infección localizada con formación de abscesos y úlceras supurativas. En algunos casos, estas infecciones pueden diseminarse a través del sistema linfático y en menor medida, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, también causar micosis invasoras por vía hematógena. Este tipo de infecciones son frecuentes en zonas tropicales y subtropicales donde tienen un fuerte impacto sobre la salud pública ya que son difíciles de tratar y controlar. Las micosis subcutáneas más frecuentemente diagnosticadas son la esporotricosis y la lacaziosis, junto con micosis causadas por hongos dematiáceos, como son el eumicetoma, la feohifomicosis subcutánea y la cromoblastomicosis (Queiroz-Telles *et al.*, 2011).

1.2.3.1. Esporotricosis

La esporotricosis es una infección causada por especies del complejo *Sporothrix schenckii* (Marimon *et al.*, 2006), un hongo dimórfico que crece preferentemente en material vegetal en descomposición o en suelo. La esporotricosis presenta diferentes formas clínicas, siendo la linfocutánea la más frecuente (sobre el 80%). En estos casos la micosis se inicia con una lesión nodular o ulcerosa localizada en el punto de inoculación tras la que, después de un período de incubación de 15 a 30 días, aparecen lesiones

nodulares que ulceran, fistulizan y cicatrizan, siguiendo el trayecto linfático. Otras formas menos frecuentes son la forma cutánea fija y la cutánea diseminada, afectando esta última con mayor frecuencia a pacientes inmunocomprometidos.

1.2.3.2. Lacaciosis

Causada por *Lacazia loboi*, un hongo que afecta a humanos y a delfines, la lacaciosis es una infección también conocida como lobomycosis. La gran mayoría de casos se han descrito en habitantes de la selva amazónica, y se caracterizan por la presencia de pápulas o nódulos localizados en las extremidades, nalgas y orejas, que incrementan en número durante el transcurso de la infección (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2007).

Como se ha comentado anteriormente, los hongos dematiáceos son agentes causales de diversos tipos de infecciones subcutáneas. Estos organismos están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, encontrándose preferentemente en el suelo y en material vegetal en descomposición. La principal característica de este tipo de hongos es la presencia de melanina en la pared de las células vegetativas, de los conidios o en ambas, dando lugar en cultivo a colonias oscuras de color negro oliváceo. Debido a la estabilidad molecular de la melanina, ésta es resistente a una gran variedad de procesos fisicoquímicos como la desecación, la presencia de radicales libres, metales tóxicos, e incluso a las radiaciones ionizantes, proporcionando su presencia en las células fúngicas una mayor protección frente a agentes externos. A su vez, este pigmento actúa como un factor de virulencia, ya que impide la acción de los radicales libres y del hipoclorito producido por las células fagocíticas, y puede también unirse a las enzimas hidrolíticas y a ciertas moléculas antifúngicas previniendo así su acción sobre la membrana celular. Estas características explican el gran potencial patogénico de algunos hongos dematiáceos, que incluso pueden llegar a afectar a pacientes inmunocompetentes (Queiroz-Telles *et al.*, 2011). En la actualidad se han descrito unas 150 especies de unos 70 géneros de hongos dematiáceos causantes de infecciones en humanos y otros animales

(Revankar y Sutton, 2010). El hecho de que cada vez sean más reconocidos como patógenos emergentes, ha favorecido el desarrollo de un mayor número de estudios referentes a ellos durante los últimos años. Según los hallazgos histopatológicos, los síndromes clínicos que producen estas infecciones por hongos dematiáceos pueden clasificarse en eumicetoma, cromoblastomicosis y feohifomicosis.

1.2.3.3. Eumicetoma

El eumicetoma es una infección granulomatosa crónica supurativa que afecta principalmente al tejido subcutáneo de los pies. A pesar de que se han descrito diversos géneros causantes de eumicetoma, aproximadamente el 70% de los casos se deben a la infección por *Madurella mycetomatis*. El resto de agentes etiológicos relacionados con eumicetomas son especies de los géneros *Acremonium*, *Cylindrocarpon*, *Exophiala*, *Phialophora*, o *Aspergillus* entre otros (Garnica *et al.*, 2009).

1.2.3.4. Cromoblastomicosis

La cromoblastomicosis o cromomicosis es una infección crónica causada por hongos dematiáceos, descrita por primera vez en 1920 en Brasil por Pedroso y Gomes (Pedroso *et al.*, 1920). Aunque los agentes causantes de la infección son cosmopolitas, ésta es más frecuente en zonas tropicales y subtropicales de Sudamérica, siendo también descritas con regularidad en el Caribe, Madagascar, México, India, Japón y Australia. Los principales agentes etiológicos son *Fonsecaea pedrosoi* y *Cladophialophora carrionii*. *F. pedrosoi* es la especie más común responsable de cromoblastomicosis en zonas húmedas tropicales, mientras que *C. carrionii* lo es en zonas más áridas como Australia o Sudáfrica. Otras especies como *Phialophora verrucosa*, *Rhinochadiella aquaspersa*, *Exophiala dermatitidis*, *E. jeanselmei*, *E. spinifera* o *Botryomyces caespitosus* también se han descrito como causantes de esta micosis (Ameen, 2009; Queiroz-Telles *et al.*, 2011; López-Martínez y Méndez, 2007). Como es habitual en las infecciones subcutáneas, la cromoblastomicosis se adquiere tras la inoculación traumática en la piel de material vegetal contaminado, por lo cual

acostumbra a producirse en agricultores o leñadores que carecen de calzado o ropas adecuadas para el desarrollo de su trabajo, siendo las extremidades (generalmente las inferiores) las zonas más afectadas. La cromoblastomycosis afecta con mayor frecuencia a pacientes del sexo masculino (alrededor del 80% de los casos) asociándose este hecho a un posible efecto inhibitor por parte de las hormonas sexuales femeninas sobre el desarrollo del hongo (Hernández-Hernández *et al.*, 1995). La presencia del antígeno de histocompatibilidad HLA-A29 también parece ser un factor que predispone a sufrir la enfermedad (Elgart, 1996). La clínica de la infección es muy diversa, describiéndose diferentes formas típicas de lesión según el grado de desarrollo en el que se encuentren o la gravedad de las mismas. Generalmente, la cromoblastomycosis se caracteriza por la aparición de nódulos en el lugar de inoculación, permaneciendo el agente infeccioso confinado en la grasa subcutánea sin invadir músculos o huesos. En ocasiones, la infección puede diseminarse por el tejido subcutáneo a través de los vasos linfáticos, y más comúnmente por autoinoculación por medio del rascado debido al prurito que ésta produce (Queiroz-Telles *et al.*, 2009). Dependiendo de la gravedad del proceso, las lesiones pueden extenderse y progresar lentamente durante años dando lugar a formas tumorales, verrugosas e hiperqueratósicas, ulcerosas o cicatrizales y descamativas (López-Martínez y Méndez, 2007).

Histológicamente, la cromoblastomycosis se caracteriza por la presencia de células pigmentadas de pared gruesa y morfología esférica de unos 10-14 μm de diámetro denominadas cuerpos escleróticos o cuerpos de Medlar. Estas células desarrollan septos paralelos o perpendiculares a través los cuales se fragmentan dando lugar a nuevas células. Los cuerpos escleróticos se observan al microscopio óptico tras el rascado de la lesión y la observación directa de una preparación utilizando hidróxido de potasio como medio de montaje. La hiperqueratosis y la hiperplasia pseudoepiteliomatosa son las respuestas más frecuentes en el estrato córneo y en la epidermis, mientras que en dermis e hipodermis se observan más comúnmente microabscesos e infiltrados granulomatosos con presencia de células gigantes (López-Martínez y Méndez, 2009).

El tratamiento de la cromoblastomycosis es complejo y generalmente muy prolongado, ya que puede extenderse durante varios años. Las terapias

actuales incluyen cirugía, termoterapia, quimioterapia y combinaciones de estas técnicas (Ameen, 2009). En la actualidad no existe un tratamiento de elección para la cromoblastomycosis, aunque está recomendado el uso del itraconazol y de la terbinafina, ya sea en monoterapia o en combinación de ambos antifúngicos. A pesar de estas opciones terapéuticas, los tratamientos no siempre son satisfactorios y la recidiva de la infección es común (Bonifaz *et al.*, 2004, Esterre *et al.*, 2006). Por esta razón, se está estudiando si la administración de nuevos antifúngicos del grupo de los triazoles tales como el posaconazol y el voriconazol podría mejorar los resultados de la terapia existente.

1.2.3.5. Feohifomicosis

El término feohifomicosis fue utilizado por primera vez el año 1974 con el objetivo de distinguir las infecciones que producen abscesos micóticos con hifas pigmentadas, de las cromoblastomycosis, las cuales presentan cuerpos escleróticos (Ajello *et al.*, 1974). La forma más frecuente de feohifomicosis se describe como una infección crónica localizada en la dermis profunda y tejidos subcutáneos, cuyo agente causal presenta una morfología miceliar en tejido. En pacientes inmunocompetentes la clínica se caracteriza por la presencia de un único quiste inflamatorio localizado en las extremidades, que puede evolucionar a formas difusas y con diferentes grados de pigmentación. En pacientes inmunocomprometidos, la clínica es más variable, pudiéndose presentar lesiones en forma de escaras, pápulas, úlceras o pústulas. En este tipo de pacientes, la afectación de otros órganos debido a la diseminación hematogena de la infección es relativamente habitual (Garnica *et al.*, 2009). Los agentes responsables típicos de la feohifomicosis son especies de los géneros *Exophiala*, *Phialophora*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, y *Exserohilum* (Ajello *et al.*, 1997).

1.2.4. Micosis sistémicas

Se considera micosis sistémica la que afecta a dos o más órganos no adyacentes, o a un órgano y al torrente sanguíneo. Si bien pueden

producirse en huéspedes inmunocompetentes, en cuyo caso suelen ser los hongos dimórficos los agentes causales, son mucho más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos, siendo en este caso ocasionadas por hongos oportunistas que rara vez causan infección en el huésped sano (Greig *et al.*, 2001; Karim *et al.*, 1997). Estas infecciones generalmente son adquiridas por la inhalación o inoculación traumática de esporas de especies ubicuas de distribución mundial, colonizadoras de diferentes tipos de sustratos vegetales y frecuentes en el medio ambiente. A partir de las últimas décadas del siglo XX en los países desarrollados se ha producido un envejecimiento de la población y un aumento de población susceptible (pacientes con SIDA, oncológicos, transplantados, con enfermedades autoinmunes...), cuyo estado de inmunodepresión severa predispone al establecimiento de este tipo de infecciones. Generalmente, las micosis sistémicas son difíciles de diagnosticar y producen una elevada mortalidad a pesar de la terapia antifúngica.

Los hongos filamentosos oportunistas más habituales son especies del género *Aspergillus*, los hongos Mucorales, y especies de otros géneros como *Fusarium* y *Scedosporium* (Shao *et al.*, 2007).

Por otro lado, la elevada tasa de mortalidad de infecciones poco frecuentes como las feohifomicosis sistémicas hace necesario el estudio de alternativas que mejoren las terapias actuales.

1.2.4.1. Aspergilosis

El género *Aspergillus* incluye a más de 180 especies ampliamente distribuidas a nivel mundial, de las cuales una quinta parte son frecuentemente aisladas en humanos y otros animales (Guarro *et al.*, 2009). Estas especies pueden ser la causa de diferentes tipos de infecciones que incluyen desde micosis cutáneas localizadas hasta procesos diseminados fatales. La aspergilosis invasora es una de las infecciones fúngicas más comunes en pacientes inmunocomprometidos, siendo factores de riesgo para sufrir esta infección las neoplasias hematológicas, la quimioterapia antineoplásica, la neutropenia profunda y persistente, la administración de corticoides a altas dosis en trasplantes de progenitores hematopoyéticos o en trasplantes de órganos sólidos (Quindós y Eraso,

2008). En un estudio retrospectivo, Pagano *et al.* demostraron que el 90% de las infecciones fúngicas causadas por hongos filamentosos en pacientes con neoplasias hematológicas estaban causadas por especies del género *Aspergillus* (Pagano *et al.*, 2006). Además de su cada vez mayor incidencia, las aspergilosis invasoras están asociadas a tasas de mortalidad muy elevadas que varían en función de la enfermedad de base del paciente. Estas tasas comprenden valores aproximados del 38% en pacientes con leucemia mieloblástica aguda, 50-60% en pacientes trasplantados de órganos, y de 70-85% en otros pacientes con inmunodepresión severa (Mayr, 2011).

Esta elevada mortalidad de la aspergilosis invasora también está asociada a la dificultad de establecer un diagnóstico precoz, hecho que impide en muchos casos un tratamiento temprano. En este sentido, se han realizado importantes avances como la utilización de la tomografía axial computarizada, o la determinación en suero de niveles de galactomanano, un antígeno de la pared fúngica, siendo esta técnica útil en el diagnóstico y seguimiento de la infección (Sionov *et al.*, 2006).

Aspergillus fumigatus es el agente causal más común de aspergilosis invasora en pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, en los últimos años otras especies del género como *Aspergillus flavus* o *Aspergillus niger*, han incrementado significativamente su incidencia, e incluso se han descrito zonas áridas o semiáridas en las que *A. flavus* es la especie más común debido a su gran resistencia a las altas temperaturas (Krishnan *et al.*, 2008). *A. flavus* es también uno de los principales agentes causales de la aspergilosis broncopulmonar alérgica humana, y de infecciones pulmonares en pacientes inmunocomprometidos, viéndose estas patologías agravadas en muchos casos debido a la producción de micotoxinas por parte de esta especie (Guarro *et al.*, 2009). El espectro clínico de las infecciones causadas por *A. flavus* es muy similar al de las producidas por *A. fumigatus*, aunque las primeras parecen ser más virulentas y más resistentes a los agentes antifúngicos que las provocadas por otras especies del género, incluyendo a *A. fumigatus* (Hedayati *et al.*, 2007). Por su parte, *A. niger* es una especie principalmente asociada a otomicosis. A pesar de estar descrita como un patógeno relativamente poco virulento, en pacientes inmunocomprometidos

se han registrado casos de infecciones diseminadas graves que pueden llegar a ser mortales (Xavier *et al.*, 2008).

El tratamiento de elección para la aspergilosis invasora es el voriconazol, mientras que la micafungina, y otros azoles como el posaconazol y el itraconazol son considerados tratamientos alternativos (Walsh *et al.*, 2008).

1.2.4.2. Feohifomicosis

La feohifomicosis sistémica es una infección poco común cuya incidencia ha aumentado en los últimos años. Es una micosis que afecta generalmente a pacientes inmunocomprometidos, aunque también se describen casos en pacientes sin factores de riesgo o inmunodeficiencias conocidas (Revankar, 2002). Se trata de una infección muy grave especialmente en casos diseminados y en los que presentan afectación del sistema nervioso central ya que, a pesar de la terapia antifúngica, la tasa de mortalidad oscila entre el 70% y el 100% (Revankar y Sutton, 2010). Las feohifomicosis sistémicas pueden tener su origen en una infección pulmonar adquirida por vía respiratoria con posterior diseminación hematógica a otros órganos. Se han identificado numerosas especies capaces de causar feohifomicosis sistémicas, principalmente especies pertenecientes al orden Chaetothyriales, de las cuales *Cladophialophora bantiana*, *Exophiala dermatitidis*, *Ramichloridium mackenziei* y *Ochroconis gallopava* han sido tradicionalmente descritas como agentes neurotrópicos causantes de graves abscesos cerebrales (Horre *et al.*, 1999; Kantarcioglu *et al.*, 2004). En este sentido y basándose en varios casos clínicos, (Surash *et al.*, 2005; Koo *et al.*, 2010) se ha sugerido que *Fonsecaea monophora*, una especie recientemente segregada de *Fonsecaea pedrosoi* (de Hoog *et al.*, 2004), podría también tratarse de un hongo neurotrópico.

Por su parte, especies del género *Exophiala* se asocian frecuentemente a casos de feohifomicosis de diferentes tipos. En un estudio reciente, Zeng *et al.* identificaron a *Exophiala dermatitidis* y a dos nuevas especies segregadas de *Exophiala jeanselmei*, como son *Exophiala oligosperma* y *Exophiala xenobiotica*, como los principales agentes causantes de feohifomicosis invasoras en los Estados Unidos (Zeng *et al.*, 2007).

El tratamiento de las feohifomicosis es complicado y en la mayoría de ocasiones adquiere más importancia la cirugía que la terapia con antifúngicos. La baja frecuencia de casos clínicos de feohifomicosis sistémica impide llevar a cabo estudios apoyados estadísticamente sobre la actividad de los antifúngicos. Por otro lado, la eficacia de los fármacos actuales no es la óptima, e incluso los largos periodos de administración que requieren los tratamientos provoca que algunos presenten efectos tóxicos. Todos estos factores impiden que, pese a su gravedad, en la actualidad se haya establecido un tratamiento de elección para este tipo de infecciones.

1.3. Antibióticos antifúngicos

Se denominan antibióticos antifúngicos o antimicóticos a sustancias capaces de alterar las estructuras de la célula fúngica impidiendo su crecimiento o alterando su viabilidad produciendo mínimas alteraciones en las células del huésped (Odds *et al.*, 2003). La gran dificultad a la hora de desarrollar fármacos antifúngicos radica en que las células del hongo y las infectadas son eucariotas y por lo tanto presentan características bioquímicas similares, lo que puede provocar una mayor frecuencia en la aparición de efectos adversos. Otra dificultad añadida es la habitual falta de correlación entre la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* en los pacientes (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999).

Durante la historia se han desarrollado muchos agentes antifúngicos pero solo unos pocos presentan actividad *in vitro* e *in vivo* y llegan a comercializarse. En algunos casos, no se pueden usar en humanos porque no difunden correctamente por los tejidos, son inactivados por enzimas inducidas o son demasiado tóxicos para el huésped. La evolución en el tratamiento farmacológico de las micosis comprende desde el uso de los antifúngicos considerados de "primera generación", derivados de productos o de la actividad metabólica de determinados microorganismos, hasta los de "segunda generación", derivados de síntesis química.

Las primeras sustancias utilizadas con actividad antifúngica fueron metales pesados, como el yoduro potásico, metaloides, derivados azufrados y sulfonamidas. La aparición de los primeros fármacos antifúngicos como la groseofulvina, la nistatina, la anfotericina B y la flucitosina tuvo lugar en la

década de los 50. Durante la década siguiente se desarrollaron los primeros antifúngicos azólicos: el clotrimazol, el miconazol y el econazol, a los que siguieron otros como el ketoconazol, el fluconazol y el itraconazol. Ya en los últimos años han aparecido otros fármacos pertenecientes a este grupo como son el voriconazol, el posaconazol, y otros que todavía están en fase de ensayos clínicos como el albaconazol y el ravuconazol. Otro grupo de antifúngicos desarrollado entre los años 80 y 90 son las alilaminas, cuyos representantes son la naftifina y la terbinafina. Por último, durante la primera década del siglo XXI se han introducido nuevos fármacos del grupo de las equinocandinas, siendo la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina sus principales representantes.

1.3.1. Polienos

Los polienos fueron los primeros antifúngicos que se desarrollaron. El grupo lo comprenden más de 100 compuestos sintetizados a partir de sustancias obtenidas de bacterias actinomicetales del género *Streptomyces*. La anfotericina B, sintetizada a partir de *Streptomyces nodosus*, fue comercializada para su uso clínico el año 1958 y es el antifúngico más importante perteneciente a este grupo. La anfotericina B es insoluble en agua a pH neutro por lo que debe prepararse como suspensión coloidal usando desoxicolato de sodio para su administración intravenosa (Tiphine *et al.*, 1999). Su capacidad antifúngica puede verse reducida al oxidarse su molécula por efecto de la luz, la temperatura elevada y la presencia de oxígeno. La anfotericina B presenta una mayor afinidad por el ergosterol, el principal esteroles de las membranas fúngicas, que por el colesterol, el principal esteroles de las membranas celulares de los mamíferos (Bolard, 1986). Esta característica permite que la anfotericina B forme agregados con el esteroles de las membranas fúngicas creando poros que modifican la permeabilidad de la membrana. Estas alteraciones en la estructura de la membrana generan un desequilibrio osmótico que desembocará en la muerte celular. Otro mecanismo de acción de la anfotericina B está relacionado con el daño oxidativo que ocurre en la célula producido por la cascada de reacciones oxidativas vinculadas a la lipoperoxidación que sufre la membrana celular tras exponerse al fármaco. A pesar de ser el

compuesto de referencia para el tratamiento de las micosis sistémicas, su nefrotoxicidad limita su dosificación y administración (Hsieh *et al.*, 1998). Por esta razón en la actualidad se utilizan nuevas formulaciones que permiten administrar dosis más elevadas de anfotericina B y, que a su vez, presentan menos problemas de toxicidad. Estas nuevas formulaciones son la anfotericina B liposomal (AmBisome), el complejo lipídico de la anfotericina B (Abelcet) y la anfotericina B en dispersión coloidal (Amphocil o Amphotec), que a pesar de sus ventajas, no evitan que la formulación tradicional sea la más utilizada debido a la gran diferencia de coste existente.

El hecho de que la aparición de resistencias a este fármaco sea muy poco frecuente pese a llevar más de medio siglo utilizándose, hace que se continúe investigando en el desarrollo de nuevas formulaciones de anfotericina B que permitan su administración de una manera más segura y económica. La presentación convencional está indicada en el tratamiento de infecciones causadas por especies sensibles de los géneros *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Conidiobolus*, *Basidiobolus*, y *Sporothrix*, en mucormicosis producidas por agentes sensibles tales como *Absidia*, *Mucor* y *Rhizopus*, y como profilaxis en pacientes inmunocomprometidos con fiebre persistente cuando el tratamiento con antibióticos antibacterianos fracasa. Las formulaciones lipídicas están indicadas en candidiasis invasivas graves, micosis sistémicas graves (aspergilosis, criptococosis, fusariosis, zigomicosis, blastomicosis y coccidioidomicosis) en pacientes que no responden al tratamiento con anfotericina B convencional ni con otros agentes antifúngicos. También está indicada en casos de pacientes con micosis graves e insuficiencia renal u otras contraindicaciones al uso de anfotericina B convencional, o en casos de nefrotoxicidad causada por ésta. Las nuevas formulaciones también presentan actividad contra la leishmaniasis visceral y su profilaxis. Pese a su buena actividad, se han descrito algunas especies resistentes como; *Scedosporium spp.*, *Paecilomyces lilacinus*, *Trichosporon asahii* y algunas cepas de *Aspergillus terreus* y *Fusarium spp.* (Cuenca-Estrella *et al.*, 2006; Ruíz- Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

Otro fármaco perteneciente al grupo de los polienos es la nistatina. Tradicionalmente su uso ha sido exclusivamente tópico debido a sus graves

efectos tóxicos, aunque en los últimos años se han desarrollado formulaciones liposomales para su administración sistémica que parecen ser más eficaces y menos tóxicas que la formulación convencional (Ng *et al.*, 2003; El-Ridy *et al.*, 2011).

1.3.2. Azoles

El desarrollo de los fármacos del grupo de los azoles ha supuesto un importante avance en el tratamiento de las infecciones fúngicas. Estructuralmente, un azol está compuesto por un anillo azólico de cinco átomos, de los cuales dos (imidazoles) o tres (triazoles) son átomos de nitrógeno, unido a otros anillos aromáticos. Su mecanismo de acción se basa en interferir en la síntesis del ergosterol, un compuesto esencial de la membrana celular fúngica que regula su fluidez y permeabilidad, por medio de la inhibición de la enzima C14-alfa-desmetilasa. Esta enzima está acoplada al citocromo P-450 y es la responsable de la transformación del lanosterol en ergosterol. La falta de ergosterol provoca una alteración en la permeabilidad de la membrana celular, que dependiendo de la dosis del fármaco, puede producir la muerte o la inhibición del crecimiento y multiplicación celular. El hecho de que este mismo sistema enzimático esté presente en mamíferos, ocasiona que la administración de azoles provoque interacciones farmacológicas relacionadas con la disminución del metabolismo, por parte de isoenzimas del grupo de los citocromos P-450, de numerosas sustancias activas, tales como los antihistamínicos H1, los corticoides, los hipoglucemiantes orales, los inhibidores de la HMG-CoA y la warfarina, entre otros (Viudes *et al.*, 1999).

En la actualidad, debido a que su toxicidad es superior a la de los triazoles, el uso de los imidazoles se limita al tratamiento de las micosis superficiales, siendo los más utilizados el ketoconazol, el clotrimazol, el miconazol y el sertaconazol. Los triazoles son fármacos con un amplio espectro de acción, con menor toxicidad y mayor estabilidad metabólica, vida media y distribución en tejidos que los imidazoles. Están indicados en el tratamiento de las micosis tanto superficiales como sistémicas. Los representantes principales de este grupo son el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol y el posaconazol.

El fluconazol es un fármaco usado desde finales de los años 80, disponible en formulación intravenosa y oral, siendo esta última la más utilizada debido a la su rápida absorción y buena biodisponibilidad. Su dosis de administración en clínica es de 200-800 mg/día para ambas formulaciones (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). El fluconazol presenta una baja unión a las proteínas y una excelente penetración en líquido cefalorraquídeo. Es eliminado principalmente por vía renal y excretado por la orina (Debruyne, 1997). Aunque su uso genera resistencias en tratamientos prolongados, el fluconazol sigue siendo el tratamiento de primera elección frente a las infecciones por *Candida*, estando también indicado en profilaxis en pacientes con enfermedades hematológicas, así como en el tratamiento de mantenimiento o refuerzo en el caso de la criptococosis (Gavaldà y Ruiz, 2003; Gómez-López *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2008; Böhme *et al.*, 2009). Es un fármaco inactivo frente a los hongos filamentosos.

El itraconazol es un fármaco disponible en cápsulas, solución oral e intravenosa. La absorción de la presentación capsular puede ser muy baja en ayunas, viéndose aumentada con un pH gástrico bajo y con lípidos en la dieta. Esta absorción tan irregular conlleva que la presentación en cápsulas no sea la recomendable en infecciones graves. El itraconazol se metaboliza principalmente en el hígado y se excreta en la bilis y en la orina. La posología más habitual comprende dosis de 400 mg/día (cápsulas), de 2.5 mg/kg dos veces al día (oral) y de 200 mg dos veces al día durante dos días seguida de 200 mg/día (intravenosa) durante un máximo de 12 días (Walsh *et al.*, 2008). Su uso está indicado en pitiriasis versicolor, dermatofitosis, queratitis fúngica, onicomycosis por dermatofitos y *Candida*, candidiasis oral, esofágica, vulvovaginal y sistémica, aspergillosis y criptococosis sistémica, histoplasmosis, esporotricosis, paracoccidiomycosis, blastomycosis, feohifomycosis y cromoblastomycosis (Negroni y Arechavala 1993, Gupta *et al.*, 2004). Las cepas de *Candida* resistentes al fluconazol suelen desarrollar resistencia cruzada al itraconazol (Cuenca-Estrella, 2010).

El voriconazol es un derivado sintético del fluconazol que está aprobado para su uso clínico desde el año 2002. Se presenta en comprimidos, en solución oral o en solución de sulfobutiléter ciclodextrina para la administración intravenosa. La metabolización de este fármaco se realiza en hígado, excretándose solo un 5% de fármaco por la orina. El voriconazol generalmente se administra a dosis de 200-400 mg/12 h (4-6 mg/kg) (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). Es un antifúngico de amplio espectro cuyas indicaciones incluyen la aspergilosis invasiva, la candidemia en pacientes no neutropénicos y las infecciones graves por *Scedosporium* spp. y *Fusarium* spp. Aunque ha demostrado eficacia en el tratamiento de infecciones causadas por *Candida* spp., el voriconazol no se usa como tratamiento de primera línea en las infecciones profundas causadas por este género, ya que no ha demostrado poseer ventajas sobre el fluconazol (Kullberg *et al.*, 2005). Los hongos Mucorales presentan resistencia intrínseca a este fármaco. Debido a su buena penetración a través de la barrera hematoencefálica, el voriconazol es utilizado en infecciones del sistema nervioso central.

El posaconazol es el último triazol comercializado hasta la fecha. Este antifúngico se encuentra disponible como solución oral la cual presenta una absorción gástrica variable que mejora al administrarse junto a comidas ricas en grasas. Por este motivo, en la actualidad se está desarrollando una presentación parenteral de este fármaco. Su metabolización se realiza en el hígado y es excretado en su gran mayoría por las heces. En clínica se utiliza a dosis de 200 mg/8 h. Su espectro de acción es el más amplio de todos los azoles e incluye aspergilosis invasiva, fusariosis, infecciones por hongos dematiáceos, coccidioidomicosis e infecciones por levaduras de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*, mostrando una buena actividad frente a cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2005). A diferencia del voriconazol, el posaconazol también es activo frente a los Mucorales (Roden *et al.*, 2005; Rogers, 2008). El posaconazol ha demostrado una mayor eficacia en la prevención de la infección fúngica que el fluconazol y el itraconazol, lo que le ha convertido en un fármaco de primera elección en la profilaxis antifúngica.

1.3.3. Análogos de precursores de ácidos nucleicos

La 5-fluorocitosina o flucitosina, una pirimidina fluorada, es el compuesto más representativo de este grupo de antifúngicos los cuales presentan una estructura similar a la citosina. La penetración de este fármaco en la célula fúngica se realiza a través de una permeasa, y una vez en el citoplasma el ácido 5-fluorouridílico, molécula que resulta de la alteración enzimática de la flucitosina, se incorpora al ARN interrumpiendo así la síntesis proteica. La 5-fluorocitosina puede también ser convertida en 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, un inhibidor de la síntesis de ADN y de la división nuclear. A pesar de haber demostrado eficacia contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y hongos dematiáceos, su uso limita a la administración en combinación con anfotericina B o itraconazol en casos de meningitis por *Cryptococcus* spp. (Dismukes *et al.*, 1987; Mayanja-Kizza *et al.*, 1998), ya que los hongos son capaces de crear rápidamente resistencias a la flucitosina si ésta se emplea como monofármaco. Esta resistencia se debe a la inactivación de la permeasa que transporta la flucitosina, o a una disminución de las enzimas que la metabolizan.

1.3.4. Equinocandinas

Los últimos fármacos antifúngicos aprobados para el uso en humanos han sido las equinocandinas. Se componen de una serie de lipopéptidos semisintéticos cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición del enzima que sintetiza el β -1,3-D-glucano, el principal componente de la pared fúngica. Este enzima no se encuentra en las células animales, hecho que reduce considerablemente la toxicidad de este grupo de fármacos en humanos. A su vez, su diferente mecanismo de acción facilita el uso de las equinocandinas en terapias combinadas con otros antifúngicos (Wierderhold y Lewis, 2003).

Las equinocandinas no se absorben por vía oral, por lo que solo existe una presentación parenteral. Tienen una buena distribución por los tejidos, exceptuando el sistema nervioso central y los ojos (Chen *et al.*, 2011) En general presentan buena actividad frente a *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis jirovecii* y los hongos dimórficos (De Wet *et al.*, 2004; De

Wet *et al.*, 2005; Krause *et al.*, 2004). Son inactivas frente a aquellas especies fúngicas que no tienen β -1,3-D-glucano en su pared como *Cryptococcus* spp., otros Basidiomicetos y los Mucorales. También son inactivas frente a *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp. (Ruíz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

En la actualidad existen tres equinocandinas aprobadas para su uso clínico: la caspofungina que fue introducida en 2001, seguida de la micafungina en 2005 y por último la anidulafungina en 2006. Los tres agentes están indicados para el tratamiento de la candidiasis esofágica, candidemia y otras formas de candidiasis invasiva (Chen *et al.*, 2011). La caspofungina está además indicada como una alternativa al voriconazol en el tratamiento de las infecciones invasivas causadas por *Aspergillus* spp. (Walsh *et al.*, 2008). El uso de la micafungina se aprobó en Europa el año 2008, y por su parte está también indicada como profilaxis de infecciones causadas por *Candida* spp. en pacientes transplantados de médula ósea y como alternativa al voriconazol en el tratamiento de la aspergilosis invasora (Walsh *et al.*, 2008). La anidulafungina se elimina a través de una lenta degradación química en la sangre en vez del metabolismo hepático que sufren los otros dos fármacos de este grupo. Este hecho confiere a la anidulafungina ciertas ventajas frente a las otras equinocandinas, como por ejemplo la falta de interacciones con otros fármacos como los inmunosupresores (Sucher *et al.*, 2009).

1.3.5. Alilaminas

Las alilaminas son antifúngicos sintéticos que actúan inhibiendo de forma no competitiva el enzima escualeno epoxidasa. Esta inhibición impide la formación del lanosterol y provoca una acumulación intracelular de escualeno que ocasiona la muerte celular (Sánchez-Carazo *et al.*, 1999).

La naftifina es una alilamina únicamente utilizada por vía tópica, que ha mostrado, además de un potente efecto antiinflamatorio, gran eficacia frente a dermatofitos e incluso en infecciones causadas por levaduras (Gupta *et al.*, 2008).

La terbinafina es el representante más importante de este grupo de antifúngicos. Se trata de una molécula altamente lipofílica, hecho que

facilita su distribución y acumulación en tejidos tales como la piel, uñas y tejido adiposo (Elewski, 1988). Esta característica permite que la terbinafina sea un buen tratamiento de las dermatomicosis. Su administración se realiza tanto por vía tópica como oral, siendo metabolizada en hígado y eliminada fundamentalmente por orina en forma de metabolitos sin actividad antimicótica. Es un antifúngico de amplio espectro, aunque menor que el de los azoles. Ha mostrado una buena actividad *in vitro* frente a hongos dermatofitos, dimórficos y dematiáceos, mientras que su actividad contra levaduras es menor (Krishnan-Natesan, 2009).

1.3.6. Terapia antifúngica combinada

A pesar de que en la actualidad existen nuevos fármacos y nuevos métodos de diagnóstico temprano en la terapia antifúngica, la mortalidad de las infecciones fúngicas invasoras continúa siendo muy elevada. Por ello, en los últimos años se ha potenciado el interés en el estudio de nuevas estrategias terapéuticas, entre las cuales destaca la terapia antifúngica combinada.

La administración combinada de antifúngicos presenta varias ventajas teóricas ya que puede mejorar la eficacia del tratamiento, ampliar el espectro de acción, prevenir la aparición de resistencias, aumentar la actividad sinérgica al actuar sobre dianas diferentes en la célula fúngica o reducir la toxicidad al poder disminuir las dosis administradas (Enoch *et al.*, 2006; Ruíz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). Conseguir un efecto sinérgico asociando antifúngicos es la mayor justificación para emplear la terapia combinada. Los fármacos pueden interactuar entre sí de forma sinérgica, indiferente o antagónica. Se define como interacción indiferente aquella en que el efecto de la asociación de dos fármacos es igual al efecto del componente más activo de dicha asociación o a la suma aritmética de los efectos de los dos fármacos. El antagonismo aparece cuando la combinación de agentes antimicrobianos posee un efecto menor que el producido por el componente menos efectivo de la asociación cuando actúa solo. Finalmente, se considera sinergismo cuando el efecto de la asociación de los fármacos es mayor que el de la suma de sus efectos por separado. A partir de estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* con animales podemos conocer el efecto de los fármacos administrados en monoterapia o en combinación.

Las combinaciones de dos antifúngicos son cada vez más utilizadas con éxito en clínica, por ejemplo, en terapias combinando anfotericina B y fluconazol en enfermos con candidiasis, tratamientos con azoles más 5-fluorocitosina en criptococosis, el uso de terbinafina más voriconazol asociada a cirugía en infecciones profundas causadas por *Scedosporium prolificans*, la combinación de caspofungina y voriconazol en aspergilosis invasiva, etc. (Safdar, 2007; Enoch *et al.*, 2006; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

1.4. Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos

El diseño y los métodos y técnicas de estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos a los agentes antifúngicos son similares a las de los antibacterianos (Espinel-Ingroff y Shadomy, 1989; Shadomy y Shadomy, 1991). La técnica más utilizada para el estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos es la de dilución en medio líquido (micrométodo). Mediante esta técnica se puede cuantificar la actividad del antifúngico, expresada como la CMI o mínima concentración de antifúngico capaz de inhibir el crecimiento del hongo. De esta manera se puede evaluar la sensibilidad *in vitro* de un hongo a uno o más antifúngicos y correlacionar los resultados con la actividad de los fármacos en estudios *in vivo* para tener una orientación sobre su posible eficacia en clínica. Es útil también para detectar la aparición de cepas resistentes y determinar el potencial valor terapéutico de un nuevo agente antifúngico (Espinel-Ingroff, 1994). Por desgracia, el proceso requerido para la estandarización de las pruebas de estudio de los antifúngicos ha sido lento, debido al gran número de variables que pueden influir en los resultados, como son: el medio de cultivo, el pH del medio, la densidad del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación (Doern *et al.*, 1986; Espinel-Ingroff y Shadomy, 1989; McGinnis y Rinaldi, 1996; Pfaller y Rinaldi, 1992; Pujol *et al.*, 1997; Rex *et al.*, 1993; Shadomy y Shadomy, 1991). También ha influido que las infecciones por hongos son menos frecuentes que las infecciones bacterianas, y esto implica que haya un número inferior de datos para establecer posibles correlaciones entre la eficacia *in vitro* e *in vivo*. Aún así, estos escasos datos han favorecido el estudio y desarrollo de los antifúngicos ya conocidos y de los de nueva

generación. Los métodos para determinar la sensibilidad de los hongos *in vitro* no tuvieron relevancia alguna hasta los años 70, cuando se inició el uso de los primeros azoles. Teniendo en cuenta que el primer antifúngico se descubrió 30 años después del primer antibacteriano, y que pasaron casi 20 años antes de la introducción de la 5-fluorocitosina y de los primeros azoles, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos llevan unos 50 años de retraso respecto a las pruebas de sensibilidad a los antibióticos antibacterianos (Revankar y Graybill, 2003). Es por este motivo que los métodos para evaluar la sensibilidad *in vitro* a los diferentes antifúngicos no fueron estandarizados en el caso de las levaduras hasta el año 1997 (CLSI M27-A) y en el caso de los hongos filamentosos hasta el año 2002 (CLSI M38-A).

1.4.1. Métodos *in vitro* en hongos filamentosos

Existen varios métodos de referencia para realizar estas pruebas con hongos. Los más difundidos son los del Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI) estadounidense (antiguo NCCLS), aunque otras sociedades e instituciones también han desarrollado métodos de referencia, como el *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*, EUCAST, perteneciente a la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID).

El año 1982 el CLSI, creó un subcomité para estandarizar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Su objetivo fue unificar los criterios metodológicos, primero para las levaduras y más tarde para los hongos filamentosos, con el fin de establecer las correlaciones entre los resultados obtenidos en el laboratorio y la eficacia clínica.

Tomando como partida las condiciones básicas acordadas en el documento para levaduras M27-A, el subcomité del CLSI formó un grupo para recoger datos, y poner a punto la metodología para poder realizar los estudios de sensibilidad con los hongos filamentosos. Espinel-Ingroff y Kerkering en un estudio publicado el año 1991 evaluaron el método espectrofotométrico para la preparación de las suspensiones de conidios que constituían el inóculo en el caso de los hongos filamentosos (Espinel-Ingroff y Kerkering, 1991). Se ensayaron 25 cepas de hongos filamentosos incluyendo *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Pseudallescheria boydii* y

Sporothrix schenckii. Se establecieron los rangos de porcentaje de transmitancia a los cuales se tenían que ajustar las suspensiones de conidios de cada género teniendo en cuenta la medida de los conidios de los diferentes hongos filamentosos. El medio de cultivo que el subcomité evaluó como medio de referencia potencial para realizar los estudios de sensibilidad fue el RPMI 1640, porque había dado buenos resultados en los estudios realizados con levaduras. El subcomité evaluó también otros medios, pero fue el RPMI el que permitió identificar la posible resistencia de cepas de *Aspergillus* al itraconazol (Denning *et al.*, 1997). Para preparar el inóculo se utilizaron los procedimientos previamente aprobados para las levaduras en el documento M27-A. Posteriormente el subcomité del CLSI propuso un estudio multicéntrico para evaluar por un lado el método para la preparación de suspensiones de conidios recomendado por Espinel-Ingroff y Kerkering (Espinel-Ingroff y Kerkering, 1991), y por otro lado, para comparar los métodos de macro y microdilución en la determinación de la actividad *in vitro* de los antifúngicos frente a los hongos filamentosos (Espinel-Ingroff *et al.*, 1995). Participaron seis laboratorios y se utilizaron 25 cepas pertenecientes a las especies *A. flavus* y *A. fumigatus*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix schenckii*. La concentración de los inóculos formados por suspensiones de conidios se ajustó, con la ayuda de un espectrofotómetro, a un valor de transmitancia diferente para cada especie estudiada, y que en general oscilaba entre el 68 y el 82%. Se utilizó el medio RPMI 1640, la temperatura de incubación fue de 35°C y la concentración del inóculo utilizado en ambos métodos fue de aproximadamente 10^4 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, en lugar del recomendado para levaduras que es de 10^3 ufc/ml. Los valores de CMI para la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el miconazol y el ketoconazol, en ambos métodos, fueron determinados a las 24 horas de incubación en el caso de *Aspergillus* spp. y *Rhizopus arrhizus* y de 72 horas para los demás. La reproducibilidad (± 2 diluciones) de los resultados que se obtuvieron para los métodos de macro y microdilución fue alta tanto intra como entre los laboratorios participantes y para todos los antifúngicos ensayados, con la excepción del itraconazol. En estudios posteriores se evaluó el efecto del inóculo, para saber si habría una mayor concordancia entre laboratorios utilizando un inóculo final de concentración elevada (10^4

ufc/ml) o de menor concentración (10^3 ufc/ml). Como resultado de los dos estudios realizados en colaboración con diversos laboratorios se llegó al acuerdo en cuanto a las condiciones de preparación del inóculo, el tiempo y la temperatura de incubación, la formulación del medio, y los criterios para la lectura de la CMI. Un estudio adicional demostró un cierto grado de correlación entre los resultados de las pruebas *in vitro* y la respuesta a los tratamientos en estudios con modelos animales (Espinel-Ingroff *et al.*, 1997; Odds *et al.*, 1998). Con esta información se redactó el documento M38-P, una propuesta del método de referencia que, con ligeras variaciones, dio lugar al documento definitivo M38-A en el año 1998. El método descrito en el documento M38-A hace referencia a un número muy limitado de géneros de hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria* y la forma filamentosa del hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, no incluyendo a los hongos dermatofitos, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, ni a *Scedosporium*, entre otros. Posteriormente a la publicación del documento aprobado, se realizaron más estudios colaborativos para encontrar las condiciones más idóneas para determinar la sensibilidad de hongos poco comunes a los antifúngicos clásicos y también a los de reciente introducción (Espinel-Ingroff *et al.*, 2001; Espinel-Ingroff *et al.*, 2002). Actualmente, disponemos del documento M38-A2 (CLSI M38-A2), aprobado en 2008, con material suplementario al documento previamente aprobado en 2002. En este nuevo documento se han incorporado cepas de control de calidad para asegurar la validez de los resultados y las guías para evaluar la actividad de las equinocandinas, ya que anteriormente no habían sido descritas. Además también se incluyen métodos para ensayar la actividad de los antifúngicos contra dermatofitos. Atendiendo a la dificultad para hacer determinaciones de la CMI utilizando técnicas de dilución en caldo, especialmente en laboratorios clínicos que deben realizar estudios de sensibilidad a diario aportando información rápida para que tenga utilidad terapéutica, en el año 2010 el CLSI publicó un documento (CLSI M51-P) que describe técnicas de disco difusión en agar. De esta manera, dicho documento ofrece una alternativa rápida, práctica y barata para realizar estudios de sensibilidad de hongos filamentosos a los antifúngicos más utilizados en clínica.

1.4.2. Métodos *in vivo*. Modelos experimentales

Las pruebas realizadas con animales de experimentación son cruciales para el desarrollo de nuevos fármacos. En las primeras fases de desarrollo de un antifúngico (fase preclínica), los estudios *in vitro* son útiles para determinar su eficacia en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. Estos estudios determinarán el potencial valor terapéutico del antifúngico. Posteriormente los ensayos en cultivos celulares permitirán evaluar su potencial carcinogénico así como otros efectos tóxicos. Antes de llevar a cabo los estudios clínicos es imprescindible realizar estudios preclínicos con modelos animales.

Para demostrar la eficacia terapéutica del antifúngico, previamente es necesario desarrollar un modelo animal que emule el proceso de la enfermedad infecciosa observada en clínica humana. La eficacia de la terapia se puede evaluar mediante la prolongación de la supervivencia de los animales infectados, la reducción de la carga fúngica detectable en los órganos, la reducción del tamaño de las heridas en infecciones cutáneas, estudios histopatológicos, así como la cuantificación en suero de determinados antígenos tales como el galactomanano. Los modelos animales también sirven para empezar a establecer las propiedades farmacocinéticas del compuesto. El animal más utilizado en el ensayo de nuevos compuestos antifúngicos es el ratón, debido a la facilidad de su manejo, adquisición y mantenimiento, y a la similitud, en muchos casos, de la evolución de la infección con las observaciones realizadas en humanos (Graybill, 2000). El cerebro y telencéfalo poco desarrollados también hacen recomendable el uso del ratón, ya que determinan que su nivel de sensibilidad neurovegetativa sea bajo, disminuyendo así la probabilidad de sufrimiento durante el experimento. La rata, el conejo o el cobaya son los animales de elección en las ocasiones en las que el ratón no se puede utilizar para la experimentación, dada la farmacocinética del antifúngico, o bien cuando es necesario contrastar los resultados con los obtenidos en otros animales de experimentación.

Los modelos animales sirven también para el estudio de las propiedades farmacocinéticas del compuesto, tales como la vía de administración, la distribución en los tejidos, su eliminación, y las posibles interacciones con

otros fármacos. Finalmente, los modelos animales se utilizan para determinar la tolerancia y toxicidad del producto. Medir la eficacia *in vivo* es el objetivo más importante, y el primero que se debe investigar una vez los antifúngicos han superado las pruebas *in vitro*. La demostración de la eficacia depende mucho de las condiciones experimentales, y está influenciada por la absorción, la distribución, y la eliminación del antifúngico, la concentración y vía de administración del inóculo, el estado inmunológico del huésped y la duración del tratamiento.

1.4.3. Correlación entre los métodos *in vitro* e *in vivo*

Los estudios realizados hasta la fecha no siempre muestran una relación entre los resultados obtenidos *in vitro* con la respuesta terapéutica *in vivo*. Se acepta, sin embargo, que el hecho de que una cepa sea sensible *in vitro* no es suficiente para prever el éxito terapéutico, pero un valor elevado de concentración mínima inhibitoria de un determinado antifúngico puede predecir con mayor exactitud un posible fallo terapéutico. La falta de un establecimiento en los puntos de corte en base a criterios clínicos, es decir, valores de CMI que permitan catalogar a una cepa como sensible, resistente o de sensibilidad intermedia a un determinado antifúngico, dificulta el poder vaticinar con acierto el resultado en clínica a partir de estudios experimentales. Por esta razón, con el objetivo de dar un enfoque práctico a las pruebas de sensibilidad *in vitro*, en los últimos años se han recopilado los valores de las CMIs de los fármacos para un determinado organismo. Estos estudios pretenden identificar los puntos de corte epidemiológicos, definidos como la concentración de un determinado antifúngico que inhibe el crecimiento de al menos el 95% de los aislados clínicos de una especie (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008), los cuales permitirían detectar los organismos que han adquirido mecanismos de resistencia hacia un antifúngico en concreto. Aunque la relevancia clínica de los puntos de corte epidemiológicos sigue siendo incierta, su utilización podría ser trascendente para la detección y el estudio en el laboratorio de las resistencias a determinados antifúngicos.

2. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

En las últimas décadas se ha producido un importante aumento de la incidencia de las micosis invasoras producidas por hongos filamentosos que, a pesar del tratamiento quirúrgico agresivo y de la terapia antifúngica, continúan causando una alta mortalidad y morbilidad, especialmente en pacientes inmunodeficientes. Aunque la mayoría de estas micosis están causadas por especies del género *Aspergillus*, otras infecciones menos habituales como las feohifomicosis invasoras, causadas por hongos dematiáceos, han incrementado también su incidencia. Este tipo de hongos, a su vez, también son causantes de infecciones subcutáneas como la cromoblastomicosis, que pueden producir deformidades graves e incapacidad funcional de los miembros afectados.

Las terapias utilizadas actualmente para el tratamiento de las infecciones fúngicas están lejos de ser las óptimas, siendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En base a ello, el objetivo principal de esta tesis ha sido contribuir al desarrollo experimental de nuevos tratamientos frente a infecciones subcutáneas e invasoras causadas por hongos filamentosos oportunistas emergentes.

La aparición en los últimos años de nuevos antifúngicos y el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas permiten ensayar nuevos tratamientos más seguros y eficaces para las infecciones fúngicas. Dentro de este contexto, en la presente tesis se ha ensayado la actividad *in vitro* e *in vivo* de algunos de estos nuevos antifúngicos tales como el voriconazol, el posaconazol o la anidulafungina, así como algunas combinaciones de los mismos, frente a especies emergentes del género *Aspergillus*, y hongos dematiáceos causantes de cromoblastomicosis y feohifomicosis invasoras.

La cromoblastomicosis es una infección subcutánea causada principalmente por las especies *Fonsecaea pedrosoi* y *Cladophialophora carrionii*. Esta infección constituye un importante problema de salud pública especialmente en zonas rurales tropicales y subtropicales de América. Todavía no se ha establecido el tratamiento idóneo para esta micosis ya que la eficacia de los tratamientos estándar no es óptima y su uso durante un tiempo prolongado puede producir efectos tóxicos. Por lo tanto, otro de los objetivos de la presente tesis ha sido evaluar la eficacia de los nuevos azoles frente al

tratamiento de la cromoblastomycosis experimental en el ratón atímico, la neutropenia del cual facilitó el establecimiento de la infección.

Con dicho objetivo se pretende:

- Determinar la actividad *in vitro* del posaconazol, el voriconazol, el itraconazol y la terbinafina frente a cepas de origen clínico de *F. pedrosoi* y *C. carrionii*.
- Desarrollar un modelo de cromoblastomycosis, causados por *F. pedrosoi* o *C. carrionii*, en el ratón atímico, para poder evaluar la eficacia del posaconazol y el voriconazol, comparándola a su vez, con la del itraconazol y la terbinafina, los fármacos más utilizados en la actualidad frente a esta infección.

Los hongos dematiáceos también son la causa de feohifomicosis invasoras graves. *Fonsecaea monophora* es una especie recientemente descrita que parece ser un patógeno oportunista con un espectro clínico más amplio que otras especies de su género. Debido a los pocos casos clínicos descritos de micosis causadas por esta nueva especie, todavía no existe un consenso sobre el tratamiento antifúngico más adecuado, ni sobre la posibilidad propuesta por algunos autores de que *F. monophora* presente tropismo hacia el sistema nervioso central. Por ello, hemos considerado interesante evaluar la eficacia del posaconazol, la anfotericina B y el itraconazol frente a *F. monophora* en un modelo animal de infección diseminada en el ratón neutropénico.

Con este objetivo se pretende:

- Evaluar la actividad *in vitro* del posaconazol, el itraconazol y la anfotericina B frente a dos cepas clínicas de *F. monophora*.
- Desarrollar un modelo de infección diseminada en ratones inmunocomprometidos que permita determinar la virulencia de dos

aislados clínicos de *F. monophora*, y evaluar la eficacia de los citados antifúngicos.

Las feohifomicosis sistémicas también pueden invadir el sistema nervioso central, siendo en este caso *Exophiala* el género más frecuentemente relacionado con este tipo de infecciones. La correcta identificación de las especies de este género, cuya taxonomía se encuentra en constante revisión, es especialmente importante ya que estudios recientes han sugerido la posibilidad de que tanto la virulencia, como la sensibilidad a los antifúngicos sean características específicas de cada especie. La incidencia de las infecciones invasoras causadas por especies de este género ha aumentado en los últimos años, y a pesar de su escasa frecuencia, su elevada tasa de mortalidad hace necesario el estudio de tratamientos alternativos que mejoren las terapias actuales. Un objetivo de esta tesis ha sido desarrollar un modelo de infección diseminada en el ratón neutropénico para comparar la virulencia de dos especies del género *Exophiala* descritas recientemente, como son *E. oligosperma* y *E. xenobiotica*, con la especie más patógena del género, *E. dermatitidis*. A su vez, el mismo modelo ha sido utilizado para evaluar la eficacia de nuevos tratamientos contra este tipo de micosis.

Los objetivos concretos de este estudio han sido:

- Determinar la actividad *in vitro* del posaconazol, el itraconazol y la anfotericina B frente a cepas clínicas de *E. oligosperma*, *E. xenobiotica* y *E. dermatitidis*.
- Desarrollar un modelo experimental de infección diseminada para cada una de las citadas especies en el ratón neutropénico que permita evaluar y comparar la virulencia de dichas especies.
- Utilizar los modelos experimentales de infección diseminada previamente desarrollados para evaluar la eficacia *in vivo* del posaconazol, el itraconazol y la anfotericina B.

El tratamiento empírico en la mayoría de las aspergilosis invasoras se basa en el uso del voriconazol. Sin embargo, recientemente se ha observado una mayor incidencia de aislamientos de *Aspergillus* spp. resistentes a los azoles. A su vez, la emergencia de infecciones causadas por especies de *Aspergillus no-fumigatus*, como *Aspergillus flavus* o *Aspergillus niger*, que presentan una mayor resistencia a los agentes antifúngicos, hace necesario el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. Uno de los objetivos de la presente tesis ha sido el estudio del uso de nuevos antifúngicos frente a especies emergentes del género *Aspergillus*.

Más concretamente:

- Evaluar la actividad *in vitro* de la anidulafungina frente a *A. flavus* y *A. niger*, comparando los resultados obtenidos con el método de microdilución y con el método de disco difusión.
- Determinar la actividad *in vitro* de la anidulafungina en combinación con el voriconazol frente a *A. flavus*.
- Desarrollar un modelo experimental de infección diseminada por *A. flavus* en el ratón inmunocomprometido que permita evaluar la eficacia de la anidulafungina, el voriconazol y el posaconazol, y la anidulafungina en combinación con el voriconazol.
- Desarrollar un modelo experimental de infección sistémica por *A. niger* en el ratón neutropénico para poder evaluar la eficacia de la anidulafungina, el posaconazol y el voriconazol.
- Evaluar el valor pronóstico de la actividad *in vitro* de la anidulafungina, comparando los valores de CMIs obtenidos, con el grado de la eficacia *in vivo* de dicho antifúngico en el tratamiento de infecciones diseminadas en el ratón neutropénico causadas por cepas de *A. flavus* y de *A. niger* con diferentes grados de sensibilidad a la anidulafungina.

- Aportar nuevos datos para intentar establecer los puntos de corte del posaconazol y del voriconazol para *A. flavus* y *A. niger*. Se evaluará la correlación existente entre los valores obtenidos *in vitro* y el grado de eficacia *in vivo* de dichos fármacos en el tratamiento de infecciones diseminadas en el ratón neutropénico producidas por diferentes cepas de dichas especies. A su vez, se pretende analizar el valor indicativo de eficacia de los correspondientes puntos de corte epidemiológicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estudios *in vitro*

3.1.1. Cepas

Para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, se ensayaron un total de 64 cepas correspondientes a 8 especies de hongos filamentosos oportunistas de interés clínico (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de cepas de hongos ensayadas en los diferentes estudios *in vitro* y su procedencia

Espece	Procedencia	Nº de cepas
<i>Aspergillus flavus</i>	FMR	28
	UTHSC	8
<i>Aspergillus niger</i>	FMR	10
	UTHSC	8
<i>Exophiala dermatitidis</i>	FMR	1
	CBS	1
<i>Exophiala xenobiotica</i>	CBS	2
<i>Exophiala oligosperma</i>	CBS	2
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	FMR	1
<i>Fonsecaea monopora</i>	CBS	2
<i>Cladophialophora carrionii</i>	FMR	1

FMR, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

UTHSC, University of Texas Health Science Center, San Antonio, EUA

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda

3.1.2. Conservación de las cepas

Las cepas se conservaron a 4°C en tubos de agar inclinado, en tubos de agar inclinado cubierto de vaselina, y también fueron liofilizadas. Para la obtención del inóculo, las cepas se subcultivaron en placas de agar patata y dextrosa (PDA) y se incubaron a 30°C durante 7 días hasta observar una correcta esporulación. En el caso de los hongos dematiáceos, *Exophiala* spp., *F. monophora*, *F. pedrosoi* y *C. carrionii*, las cepas se incubaron a 30°C durante 10-14 días, debido a su lenta esporulación.

3.1.3. Agentes antifúngicos

Los antifúngicos ensayados en las pruebas *in vitro* fueron:

Tabla 2. Antifúngicos ensayados *in vitro* en los diferentes estudios

Antifúngicos	Procedencia	Pureza	Disolvente
Anidulafungina	Pfizer Inc., Madrid, España	82.4% ^c	DMSO
Anfotericina B	Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA	80% ⁿ	DMSO
Itraconazol	Janssen Pharmaceutical, Madrid, España	100% ^a	DMSO
Posaconazol	Schering-Plough Res. Inst., Kenilworth, EUA	98% ^a	DMSO
Terbinafina	Novartis Farmacéutica, Barcelona, España	100% ⁿ	DMSO
Voriconazol	Pfizer Inc., Madrid, España	100% ^a	DMSO

DMSO, Dimetil sulfóxido

^a Conservación a temperatura ambiente

ⁿ Conservación a 4°C

^c Conservación a -20°C

3.1.4. Metodología

El método empleado para el estudio *in vitro* de la sensibilidad antifúngica ha sido el descrito en el protocolo recomendado por el CLSI, documento M38-A2 del año 2008.

3.1.2. Conservación de las cepas

Las cepas se conservaron a 4°C en tubos de agar inclinado, en tubos de agar inclinado cubierto de vaselina, y también fueron liofilizadas. Para la obtención del inóculo, las cepas se subcultivaron en placas de agar patata y dextrosa (PDA) y se incubaron a 30°C durante 7 días hasta observar una correcta esporulación. En el caso de los hongos dematiáceos, *Exophiala* spp., *F. monophora*, *F. pedrosoi* y *C. carrionii*, las cepas se incubaron a 30°C durante 10-14 días, debido a su lenta esporulación.

3.1.3. Agentes antifúngicos

Los antifúngicos ensayados en las pruebas *in vitro* fueron:

Tabla 2. Antifúngicos ensayados <i>in vitro</i> en los diferentes estudios			
Antifúngicos	Procedencia	Pureza	Disolvente
Anidulafungina	Pfizer Inc., Madrid, España	82.4% ^c	DMSO
Anfotericina B	Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA	80% ⁿ	DMSO
Itraconazol	Janssen Pharmaceutical, Madrid, España	100% ^a	DMSO
Posaconazol	Schering-Plough Res. Inst., Kenilworth, EUA	98% ^a	DMSO
Terbinafina	Novartis Farmacéutica, Barcelona, España	100% ⁿ	DMSO
Voriconazol	Pfizer Inc., Madrid, España	100% ^a	DMSO

DMSO, Dimetil sulfóxido

^a Conservación a temperatura ambiente

ⁿ Conservación a 4°C

^c Conservación a -20°C

3.1.4. Metodología

El método empleado para el estudio *in vitro* de la sensibilidad antifúngica ha sido el descrito en el protocolo recomendado por el CLSI, documento M38-A2 del año 2008.

3.1.4.1. Preparación de las microplacas de antifúngicos

Los antifúngicos ensayados con sus respectivos disolventes se describen en la Tabla 2. El método utilizado se basa en el uso de la técnica de microdilución que se detalla a continuación.

Preparación de la solución madre del antifúngico

Se pesó la cantidad suficiente de antifúngico en polvo para obtener una concentración 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar, y se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO).

Preparación del gradiente de concentraciones

A partir de la solución madre (1600 $\mu\text{g/ml}$ en el ejemplo de la Figura 2) se preparó un banco de diluciones dobles progresivas siguiendo el esquema de la Figura 1. Posteriormente se diluyó el contenido de cada tubo en medio RPMI en la proporción 1:50 y se dispensaron 100 μl de cada dilución en cada uno de los pocillos de una columna empezando por la columna 1, en orden de mayor a menor concentración. Las dos últimas columnas se rellenaron con RPMI + 2% de DMSO. Estas dos columnas se utilizarán como control negativo (control de esterilidad del medio) y como control positivo (control de crecimiento del hongo).

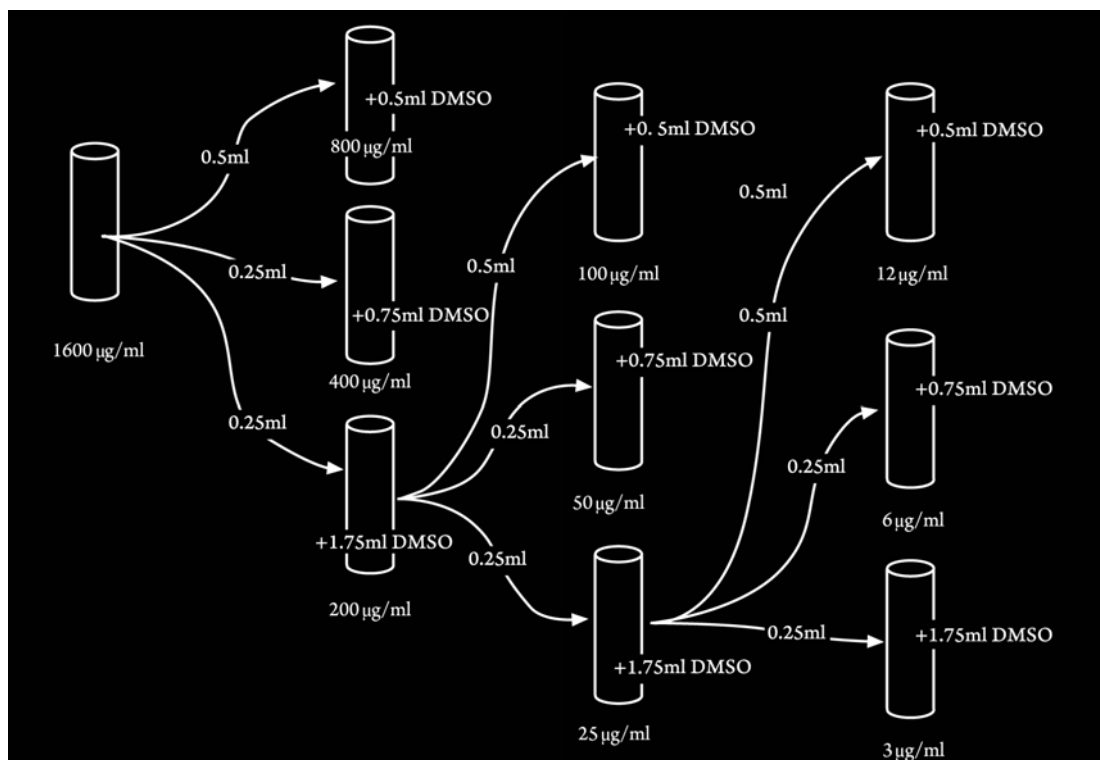


Figura 1. Esquema del banco de diluciones utilizado para realizar los ensayos *in vitro*.

Los rangos de concentraciones de antifúngico ensayados fueron: de 0.03 a 16 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de la anfotericina B, el voriconazol, el posaconazol el itraconazol y la terbinafina. En el caso de la anidulafungina el rango de concentraciones fue de 0.06 a 32 $\mu\text{g/ml}$.

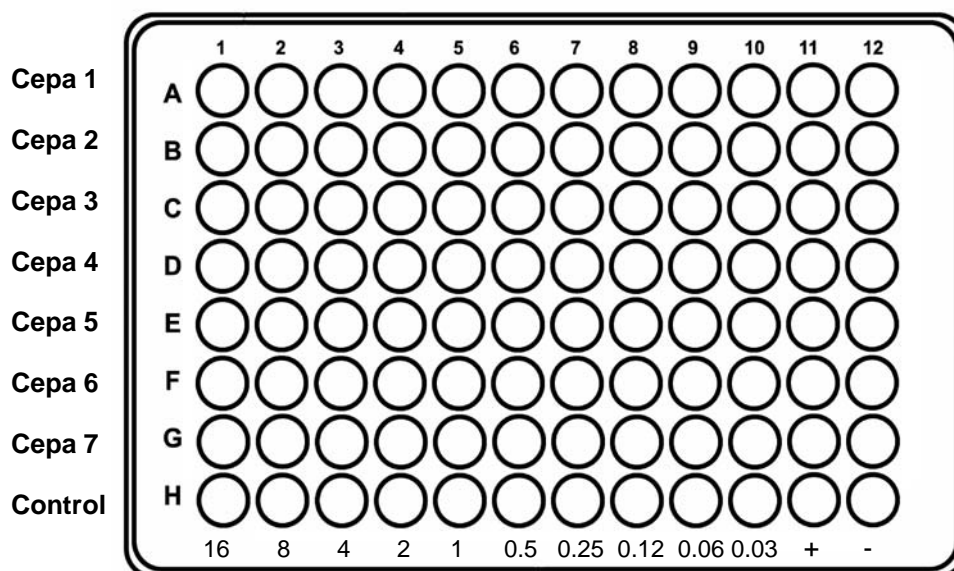


Figura 2. Esquema ejemplo de la distribución de las diferentes concentraciones estudiadas para el rango de 0.03 a 16 $\mu\text{g/ml}$ y de las cepas a estudiar en la microplaca.

Una vez preparadas, las microplacas se cubrieron con una lámina adhesiva para evitar la evaporación del líquido y se almacenaron en el congelador a -20°C un máximo de seis meses. El día del ensayo, las microplacas se descongelaron a temperatura ambiente y se dispensaron 100 μl de inóculo en cada pocillo, con excepción del correspondiente al control de esterilidad del medio. Siguiendo las directrices del documento CLSI M38-A2 las microplacas se incubaron a 35°C durante 24-72 horas dependiendo del género estudiado.

3.1.4.2. Preparación de las microplacas de combinaciones dobles de antifúngicos

Se preparó un gradiente de concentraciones para cada uno de los antifúngicos utilizados siguiendo el método descrito por el CLSI. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo cóncavo. El volumen final fue de 100 μ l en todos los pocillos de las microplacas debido a que se dispensaron 50 μ l de cada antifúngico en la zona B de la microplaca (Figura 3).

La combinación estudiada se dispuso en filas o en columnas en las microplacas para acabar formando un gradiente doble de concentraciones en forma de tablero de ajedrez (Dannaoui *et al.*, 2004).

Anidulafungina. Se utilizaron gradientes de concentraciones de 0.0004 a 0.25 μ g/ml y de 0.0015 a 1 μ g/ml dispensándose 50 μ l en los pocillos de las columnas 2-11 de la microplaca para todas las combinaciones.

Voriconazol. Se utilizaron gradientes de concentraciones de 0.06 a 32 μ g/ml y de 0.03 a 16 μ g/ml dispensándose 50 μ l en los pocillos de las filas de la "A" a la "G".

En la columna 1 (A-G) de cada microplaca, se dispensaron 100 μ l de un único antifúngico para establecer la CMI del antifúngico solo.

En la fila H (2-11) de cada microplaca, se dispensaron 100 μ l del segundo antifúngico para establecer la CMI del antifúngico solo.

Los pocillos de la última columna (A12-G12) se destinaron al control positivo (crecimiento del hongo en ausencia de antifúngicos). Los pocillos H1 y H12 se destinaron al control negativo (control de esterilidad del medio de cultivo)

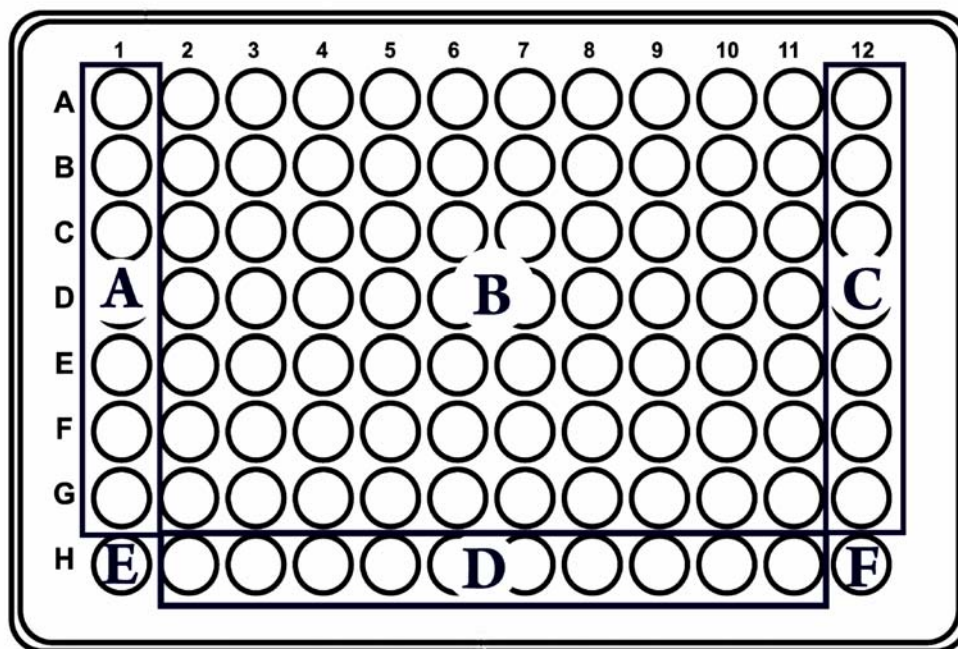


Figura 3. Esquema de la distribución de las diferentes concentraciones de antifúngicos en una microplaca de doble combinación. Se definen 6 zonas: A) zona donde se encuentra un solo antifúngico que se ha dispensado en las filas en un rango de concentración determinado, B) zona de combinaciones de los dos antifúngicos en forma de tablero de ajedrez, C) zona con medio RPMI sin antifúngico utilizada como control positivo (control de crecimiento del hongo), D) zona donde se encuentra el segundo antifúngico que se ha dispensado en las columnas en un rango determinado, E y F) control de esterilidad del medio.

3.1.4.3. Preparación de los inóculos para los estudios *in vitro*

Los aislados a estudiar se sembraron en placas de PDA y se incubaron a 30°C durante 7-14 días hasta observar una correcta esporulación. Con la ayuda de un asa de siembra se procedió a rascar la superficie de la placa, arrastrando parte de la colonia del hongo en crecimiento. La masa obtenida, que contenía hifas, conidios y fragmentos del medio, se traspasó a un tubo con 10 ml de agua destilada estéril. Después de homogeneizar, la solución se filtró a través de una gasa estéril, para obtener una suspensión final constituida únicamente por conidios. La suspensión se ajustó con la cámara de Neubauer a 4×10^3 - 5×10^4 UFC/ml, según indica el documento M38-A2. La concentración y la viabilidad del inóculo se verificaron sembrando 100 μ l de las diluciones 1:1000 y 1:10000 del mismo en placas de PDA.

Posteriormente se realizó una dilución 1:50 en medio RPMI en los estudios de un solo antifúngico y en los de combinaciones. En el caso de los estudios de un solo antifúngico y en los de combinaciones se inocularon las microplacas con 100 µl de su correspondiente dilución. En cada ensayo se incluyó la cepa control: *Paecilomyces variotii* ATCC MYA-3630 o *Candida albicans* ATCC 90028.

3.1.4.4. Estudios de disco-difusión

Paralelamente a los ensayos *in vitro* con microplacas, en los estudios que incluían especies del género *Aspergillus*, se analizó también la sensibilidad mediante el método de disco-difusión. Para ello, se preparó una solución madre de una concentración determinada para cada antifúngico a partir de la cual se dispensaron 20 µl en discos de papel estériles de 6 mm de diámetro. Siguiendo las indicaciones descritas por el CLSI en su documento M51-P, la carga final de antifúngico en los discos fue de 1 µg para el voriconazol y de 5 µg para la anidulafungina y el posaconazol. Se prepararon inóculos de las cepas a estudiar de entre 4×10^5 UFC/ml a 4×10^6 UFC/ml. A partir de estas soluciones se inocularon placas de agar Mueller Hinton no suplementado por el método de siembra por agotamiento, utilizando un hisopo estéril. Posteriormente se depositaron los discos impregnados de antifúngico sobre la superficie del agar y se incubaron las placas a 30°C durante 24-48 horas. Transcurrido este tiempo se efectuó la medición de los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento. En la actualidad no se han establecido puntos de corte para hongos filamentosos utilizando este método, sin embargo, Espinel-Ingroff y cols. (Espinel-Ingroff *et al.*, 2007) realizaron un estudio con 483 aislados en los que relacionaban resultados obtenidos con el método de microdilución con los de disco-difusión, sugiriendo los siguientes puntos de corte para el posaconazol, el voriconazol, y la caspofungina:

sensible ≥ 17 mm; sensibilidad intermedia 14-16 mm; resistente ≤ 13 mm

3.1.4.5. Definiciones

CMI (concentración mínima inhibitoria):

Para todos los antifúngicos ensayados *in vitro*, la CMI se definió como la menor concentración de antifúngico que provocaba un 100% de inhibición del crecimiento fúngico después de 24, 48 o 72 horas de incubación, dependiendo del género de hongo filamentoso estudiado. En el caso de la combinación de voriconazol y anidulafungina, para el primer fármaco también se utilizó la CMI-2, definida como la menor concentración de antifúngico que provoca el 50% de inhibición del crecimiento, ya que este parámetro ha demostrado tener una buena correlación con la CME.

CME (concentración mínima efectiva):

Se define como la menor concentración de antifúngico que produce un crecimiento aberrante del hongo con formaciones redondeadas y compactas en comparación con el crecimiento algodonoso observado en el control. Este punto de corte se determina en los ensayos realizados con equinocandinas y hongos filamentosos, en nuestro caso anidulafungina en ensayos con *Aspergillus* spp.

FICI (índice de concentración inhibitoria fraccionaria):

Para el estudio de las interacciones entre antifúngicos, se utilizó el índice de concentración inhibitoria fraccionaria (FICI) que nos permitió clasificar las interacciones en sinérgicas, indiferentes o antagonistas.

El FICI corresponde a la suma de los FIC de cada antifúngico. El FIC se define como la CMI de cada antifúngico cuando actúa en combinación dividido por la CMI del antifúngico cuando actúa solo.

El FICI se calculó:

$$\text{FICI} = (\text{CMI A comb.}/\text{CMI A solo}) + (\text{CMI B en comb.}/\text{CMI B solo})$$

Se definió la interacción como sinérgica si el FICI era ≤ 0.5 , indiferente si $0.5 < \text{FICI} \leq 4$, y antagonista si $\text{FICI} > 4$.

3.2. Estudios *in vivo*

3.2.1. Cepas

Las cepas utilizadas en los estudios *in vivo* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Relación de las cepas utilizadas en estudios <i>in vivo</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	
FMR 8756	Espuito. España
FMR 9960	Exudado ótico. India
FMR 9965	Espuito. Pakistán
FMR 9966	Úlcera corneal equina. Bélgica
FMR 9962	Clínica. Bélgica.
FMR 10065	Ambiental. Canarias, España.
FMR 10084	Espuito. Francia
FMR 10200	Espuito. Reus, España
FMR 10205	Espuito. Reus, España
FMR 10221	Ambiental. India
FMR 11893	Espuito. Reus, España
UTHSC 06-305	Clínica. Texas, EUA
UTHSC 10-516	Clínica. Texas, EUA
UTHSC 10-1094	Clínica. Texas, EUA
UTHSC 10-2099	Clínica. Texas, EUA
<i>Aspergillus niger</i>	
FMR 7156	Ambiental. Ampurias, España
FMR 11248	Perionixis. Barcelona, España
FMR 11249	Clínica. Barcelona, España
FMR 11250	Espuito (leucemia). Barcelona, España
FMR 11251	Aspergilosis cutánea. Barcelona, España
FMR 11252	Ambiental
FMR 11254	Espuito (VIH). Barcelona, España
UTHSC 04-3468	Clínica. Texas, EUA
UTHSC 06-3966	Clínica. Texas, EUA
UTHSC 08-2492	Clínica. Texas, EUA
UTHSC 09-828	Clínica. Texas, EUA
UTHSC 10-2050	Clínica. Texas, EUA
<i>Cladophialophora carrionii</i>	
FMR 10804	Cromoblastomycosis. Brasil

<i>Exophiala dermatitidis</i>	
CBS 748.88	Espuito (Fibrosis quística) Noruega
FMR 10037	Paciente onco-hematológico. Argentina
<i>Exophiala oligosperma</i>	
CBS 725.88	Tumor en el seno esfenoidal. Alemania
CBS 109807	Fungemia. Brasil
<i>Exophiala xenobiotica</i>	
CBS 117650	Absceso en brazo. EUA
CBS 102455	Queratitis. Brasil
<i>Fonsecaea monophora</i>	
CBS 269.37	Cromoblastomycosis. América del Sur
CBS 117236	Absceso cerebral. EUA
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	
FMR 6630	Cromoblastomycosis. Venezuela

3.2.2. Animales de experimentación

Para el desarrollo de los modelos experimentales de infección diseminada causada por hongos filamentosos oportunistas y su posterior tratamiento, se utilizaron ratones machos OF-1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) de 30 gramos de peso. Por su parte, para el desarrollo de modelos experimentales de cromoblastomycosis y su posterior tratamiento, se utilizaron ratones machos CD-1 desnudos y atímicos (del mismo peso y casa comercial) ya que la reducción de células T facilita el establecimiento de la infección en estos ratones, a la vez que la falta de pelo favorece una mejor visualización de las lesiones.

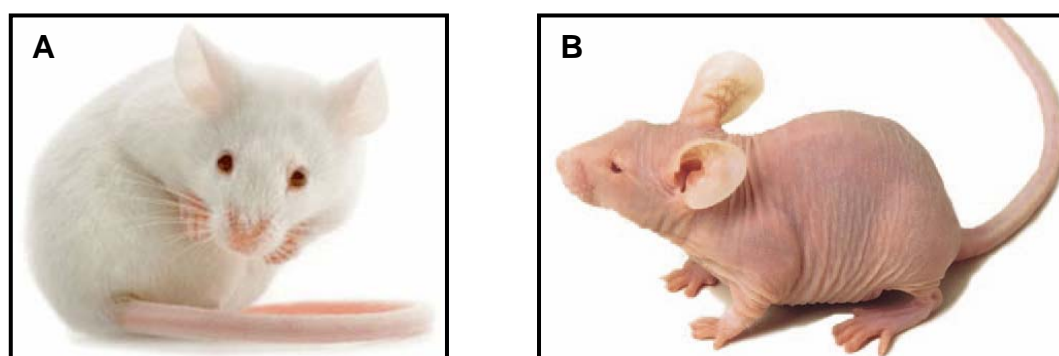


Figura 4. Ratón OF-1 (A); Ratón CD-1 atímico y desnudo (B)

Todos los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rovira i Virgili. Los animales se estabularon en condiciones estándar con acceso libre a la comida y a la bebida, y fueron supervisados diariamente atendiendo especialmente los siguientes aspectos:

- Apariencia del animal (piel/pelo liso y brillante o piloerección).
- Peso (la pérdida acentuada de peso corporal es señal de sufrimiento)
- Postura (normal o encorvada).
- Secreciones (nasal, diarrea...).
- Convulsiones.
- Locomoción (movimientos repentinos y rápidos, ataxia...)
- Comportamiento no provocado (vocalizaciones, auto-mutilaciones...)
- Comportamiento en respuesta a estímulos (agresividad, estado comatoso).

La eutanasia debida al sufrimiento de los animales se realizó por inhalación de CO₂. Este mismo procedimiento fue el utilizado al final del estudio para sacrificar a los animales supervivientes.

3.2.3. Inmunosupresión

Se utilizó la siguiente pauta de inmunosupresión:

Ciclofosfamida administrada en dosis única de 200 mg/kg intraperitonealmente junto con 5-fluorouracilo en dosis única de 150 mg/kg por vía intravenosa el día previo a la infección (día -1). Este tratamiento se utilizó únicamente en los estudios de infecciones sistémicas.

3.2.4. Infección

En la preparación de los inóculos para los estudios *in vivo* se siguió el mismo procedimiento explicado anteriormente para los estudios *in vitro* en el apartado 3.1.4.3 pero ajustando su concentración al inóculo deseado para cada estudio con ayuda de la cámara de Neubauer. La concentración y la viabilidad del inóculo se verificaron siempre sembrando las diluciones adecuadas en placas de PDA. En los casos de infección sistémica, los inóculos se administraron intravenosamente a través de la vena lateral de la

cola; mientras que en los estudios de cromoblastomycosis, los inóculos se administraron subcutáneamente en la zona antero-superior del muslo.

3.2.5. Fármacos

Los fármacos antifúngicos empleados en los tratamientos experimentales se muestran en la Tabla 4. Los tratamientos se iniciaron 24 horas después de la infección (día +1) y se administraron diariamente durante 7 días en los casos de infecciones sistémicas y durante 16 semanas en los casos de cromoblastomycosis. Para evitar infecciones bacterianas debido al estado de inmunosupresión de los animales, durante la primera semana después de la infección se les administró ceftazidima. En la tabla 5 se muestran las vías de administración y las dosis empleadas para cada uno de los fármacos utilizados.

Tabla 4. Fármacos ensayados *in vivo* en los diferentes estudios

Antifúngicos	Procedencia	Disolvente
Anfotericina B	Fungizona® Squibb Ind. Farm. Madrid, España	Sol. glucosada al 5%
Itraconazol	Canadiol® Lab. Esteve, Barcelona, España	Sol. salina fisiológica
Posaconazol	Noxafil® Schering-Plough, Madrid, España	Sol. salina fisiológica
Voriconazol	Vfend® Pfizer, Ltd., Sandwich, R. Unido	Sol. salina fisiológica
Anidulafungina	Ecalta® Pfizer, Ltd., Sandwich, R. Unido	Sol. salina fisiológica
Terbinafina	Novartis Farmacéutica, Barcelona, España	Polietilenglicol
Otros fármacos	Procedencia	Disolvente
Ciclofosfamida	Genoxal® Baxter S. L., Valencia, España	Agua bidestilada
5-fluorouracilo	Ferrer Farma, S. A., Barcelona, España	-
Ceftazidima	Combino Pharm S. L., S. Joan Despí, España	Sol. salina fisiológica
Sevoflurano	Sevorane® Abbott Lab., Madrid, España	-

3.2.6. Tratamientos, dosis y vías de administración

Vía intravenosa: usada para la administración del 5-fluorouracilo en las pautas de inmunosupresión en el ratón. Se utilizaron agujas del calibre 30 G x ½. La inyección se realizó a través de una de las venas laterales de la cola.

Vía intraperitoneal: usada para la administración de la anfotericina B, la anidulafungina y la ciclofosfamida. Se utilizaron agujas del calibre 26 G x ½. La punción se realizó en la zona inferior y lateral del abdomen del animal inmovilizado en posición de Trendelenburg.

Vía subcutánea: usada para la administración de la ceftazidima. Se usaron agujas del calibre 30 G x ½, inyectando perpendicularmente a través de un pellizco de la piel en la zona de la nuca.

Vía oral: usada para la administración del voriconazol, el posaconazol, el itraconazol y la terbinafina a través de una cánula esofágica.

Vía inhalatoria: usada para la administración del anestésico sevoflurano. Se introdujo al animal en un recipiente cerrado que contenía bolas de algodón humedecidas con el fármaco. Una vez el animal ya no mostraba reflejo al pinzamiento digital, se procedía a la punción cardíaca para la obtención de muestras de suero. Finalmente se sacrificaba al animal por dislocación cervical.

Tabla 5. Relación de las vías de administración de fármacos, dosis y volúmenes administrados según el modelo animal desarrollado

Sustancia activa	Dosis. Vía de administración	Volumen
Anfotericina B	1.5 mg/kg/día. Intraperitoneal	0.1 ml
Posaconazol	10, 20, 40 mg/kg/día. Oral. 12.5 mg/kg b.i.d. Oral	0.1 ml
Voriconazol	10, 20, 25 mg/kg/día. Oral	0.1 ml
Anidulafungina	1, 5, 10 mg/kg/día. Intraperitoneal	0.1 ml
Itraconazol	25 mg/kg/día. Oral 50 mg/kg/día. Oral 25 mg/kg b.i.d. Oral	0.2 ml
Terbinafina	150, 250 mg/kg/día. Oral	0.1 ml
Ciclofosfamida	200 mg/kg. Intraperitoneal	0.3 ml
5-Fluorouracilo	150 mg/kg. Intravenosa	0.1 ml
Ceftazidima	5 mg/día. Subcutánea	0.05 ml
Sevoflurano	Inhalatoria	-

3.2.7. Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado

Para cada estudio se estableció previamente el día apropiado de sacrificio. El método de sacrificio utilizado fue la inhalación de CO₂. Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los órganos diana adecuados para cada estudio (riñón, bazo, hígado, pulmón y/o cerebro) utilizando material quirúrgico estéril. Se dispuso solución salina estéril en tubos de 10 ml de capacidad, a razón de 1 ml por tubo, procediendo al tarado de los mismos. Posteriormente se introdujeron los órganos o porciones de éstos en su tubo correspondiente, se pesaron los tubos y se homogenizaron los órganos con la ayuda de varillas de vidrio estériles con un extremo cortante. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de los homogenizados y se sembraron

en placas de PDA que se incubaron entre 30-35°C dependiendo de la especie de hongo filamentoso estudiado, procediéndose después al recuento de UFC entre las 48-96 horas de incubación, dependiendo de la especie. La carga fúngica en los órganos se expresó en UFC/g según la siguiente fórmula:

$$UFC/g = \frac{UFC/ml \times (\text{peso del órgano} + 1ml \text{ utilizado para homogeneizar})^*}{\text{Peso del órgano}}$$

* Considerando que 1 g de tejido ocupa un volumen de 1 ml.

3.2.8. Análisis adicionales de la eficacia de los antifúngicos

- En los estudios experimentales de cromoblastomicosis, a fin de evaluar el progreso y los resultados de las diferentes terapias, cada 3 semanas se realizaron mediciones de las heridas originadas en la piel mediante la utilización de un pie de rey. Aplicando la fórmula matemática del área de la elipse se obtuvo el valor de la superficie de piel lesionada (Siebenhaar *et al.*, 2007).
- Adicionalmente, al final del estudio se extrajo el tejido afectado, el cual fue cortado en cuatro o cinco fragmentos que fueron posteriormente sembrados en placas de PDA suplementado con cloranfenicol. De esta manera, se analizó la capacidad de los fármacos de eliminar de los tejidos el hongo inoculado tras cuatro meses de terapia.

3.2.9. Bioensayo

En algunos de los estudios realizados se determinó la concentración de antifúngico en suero y en tejidos mediante bioensayo.

Realización de una recta patrón

El primer paso fue confeccionar una recta patrón para cada antifúngico (en nuestro caso posaconazol, voriconazol, itraconazol y anidulafungina) a partir de diluciones con concentraciones conocidas de los fármacos y los respectivos halos de inhibición que éstas produjeron en el crecimiento de un organismo control. Para ello, utilizamos un rango de diluciones de posaconazol e itraconazol de entre 0.125 y 10 µg/ml, mientras que el rango utilizado para el voriconazol y la anidulafungina comprendió concentraciones a partir de 0.625 hasta 10 µg/ml. Paralelamente, 24 horas antes del ensayo se sembró el organismo control, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 o, en el caso de realizar un bioensayo con anidulafungina, *C. albicans* ATCC 90028 en placas de Sabouraud que fueron posteriormente incubadas a 35°C. A partir de estas placas se preparó un inóculo con una concentración final de 2×10^6 células/ml, que se dispensó en tubos Falcon estériles que contenían 20 ml de medio esterilizado y atemperado a aproximadamente 49°C. La composición de dicho medio fue la siguiente:

- 3.45 g de base nitrogenada de levadura
- 5 g de triptosa peptona
- 2.5 g de dextrosa
- 7.5 g de agar
- 500 ml agua destilada estéril

Después de homogeneizar la mezcla, ésta se dispensó en placas petri de 100 x 15 mm. Una vez el medio se solidificó se practicaron en él pocillos de 4 mm de diámetro mediante un sacabocados estéril y se dispensaron 20 µl de cada concentración de antifúngico en cada uno de ellos. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas, transcurridas las cuales se efectuaron las mediciones de los diámetros de inhibición de crecimiento del hongo.

Determinación de la concentración de antifúngico en suero

Para calcular la concentración de fármaco en el suero de los animales se utilizaron grupos de cinco ratones tratados con el antifúngico a estudiar. Se extrajo el suero de los ratones anestesiados con sevoflurano mediante

punción cardiaca y se siguió la misma metodología anteriormente descrita para el cálculo de la recta patrón a partir de los rangos de concentraciones de los antifúngicos. La muestra de suero se obtuvo el quinto día de tratamiento, 4 horas después de la última administración del antifúngico. Una vez medidos los diámetros, éstos fueron extrapolados en la recta patrón con la finalidad de conocer la concentración del antifúngico en suero.

Determinación de niveles de fármaco en órganos

Se extrajeron asépticamente los órganos a analizar (cerebro) de los ratones tratados, se pesaron y se homogeneizaron, mediante el método anteriormente descrito, en 1 ml de etanol. Tras incubar durante toda la noche a temperatura ambiente, el homogeneizado se centrifugó y se recogió el sobrenadante. Utilizando un termobloque, se evaporó dicho sobrenadante, y el precipitado obtenido fue reconstituido con un volumen de suero de ratones sanos igual al del sobrenadante previamente evaporado. Las muestras obtenidas fueron procesadas de la misma manera que las de suero anteriormente mencionadas, obteniendo así la concentración de antifúngico por gramo de tejido.

La metodología utilizada para realizar el bioensayo se obtuvo mediante la modificación de diferentes métodos ya establecidos por otros autores (Bodet *et al.*, 1985; Kan *et al.*, 1986).

3.2.10. Detección y cuantificación de galactomanano en suero

La determinación de los niveles de galactomanano en suero se utilizó como un marcador adicional de eficacia del tratamiento en las infecciones experimentales por *A. flavus* y *A. niger*. Para ello se empleó un ELISA de doble sándwich (Platelia-Aspergillus®, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) que contiene un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus*. El suero se obtuvo a partir de la centrifugación de muestras de sangre extraídas de ratones anestesiados. Siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante, se añadieron 100 µl de EDTA 4% (ácido etilendiaminotetraacético) a 300 µl de la muestra de suero. Esta mezcla se incubó en un termobloque a 120°C durante 6 minutos, y a continuación se centrifugó. Se extrajeron 50 µl del

sobrenadante de la muestra a los cuales se agregaron 50 µl de conjugado (anticuerpos monoclonales antigalactomano marcados con peroxidada). Las placas se cubrieron con una lámina adhesiva y se incubaron a 37°C durante 90 minutos, transcurridos los cuales se procedió al lavado de la microplaca con una solución de tampón tris NaCl, Tween[®] 20 al 1% y timerosal al 0,01%. Se añadieron 200 µl de cromógeno (DMSO al 90% y tetrametilbenzidina al 0,6%) a cada pocillo y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se paró la reacción agregando 100 µl de una solución ácido sulfúrico 1,5 N. Finalmente se procedió a la lectura de la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm.

3.2.11. Histopatología

Para realizar los estudios histopatológicos, una vez realizada una primera observación macroscópica se fijó una porción de los órganos en formaldehído al 10%.

Deshidratación de las muestras. La deshidratación de las muestras se realizó sumergiendo las piezas en concentraciones crecientes de alcohol etílico; inicialmente en alcohol al 70% durante cuatro horas, seguido de dos horas en alcohol al 96% y al 100% durante tres horas. Una vez deshidratadas, las muestras se sumergieron en xilol durante 2-3 horas con el fin de eliminar el alcohol residual de las mismas.

Parafinado. Una vez eliminado el alcohol de los tejidos, se procedió a la inclusión de las muestras en una mezcla de parafina blanda y xilol a partes iguales durante una hora y posteriormente en xilol saturado de parafina. Para obtener un parafinado óptimo, las muestras se dejaron 8 horas en parafina blanda a 50-55°C. Seguidamente se introdujeron las piezas en parafina de punto de fusión de 56-58°C durante 4 horas a 60°C hasta conseguir la total impregnación de los tejidos. El colado de los bloques de parafina se realizó en cubetas de plástico.

Realización de cortes histológicos. Se realizaron cortes seriados de las piezas parafinadas de 3 µm de grosor mediante un microtomo.

Desparafinado y rehidratación de las muestras. Antes de teñir, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas para obtener preparaciones histológicas de calidad. Las muestras se cubrieron con xilol durante 10 minutos. Seguidamente éstas se introdujeron en concentraciones decrecientes de alcohol isopropílico, en alcohol puro y en alcohol al 80%, respectivamente, por un espacio de tiempo de 5 minutos en ambos casos.

Tinción de las muestras. Las técnicas de tinción empleadas fueron:

- Hematoxilina-eosina (H-E). En las muestras teñidas con dicha tinción, el citoplasma celular, las sustancias hialinas, amiloides y el colágeno presentaron un color rosado. Las estructuras fúngicas, los núcleos celulares y las sustancias mucoides se tiñeron de color morado oscuro.
- Ácido peryódico de Schiff (PAS). Los núcleos celulares se tiñeron de color morado, mientras que los mucopolisacáridos y las estructuras fúngicas presentaron un color rojo.
- Nitrato de metenamina argéntica de Grocott (GMS). Los tejidos adoptaron una coloración verde mientras que las células fúngicas se tiñeron de color negro.

3.2.12. Análisis estadístico

Para la realización de los diferentes estudios estadísticos se utilizó el paquete de programas estadísticos para Windows SPSS en las versiones 14.0 y 15.0 y Graph Pad Prism versión 4.0

Método de Kaplan Meier. Este método permite calcular el Tiempo Medio de Supervivencia (TMS) para un grupo de ratones. Tiene en cuenta los animales que quedan vivos al final del estudio y también qué día han muerto los animales que no sobreviven hasta el final del período de observación. Una vez calculados los TMS para cada grupo, se utiliza el Log-rank test para comparar los TMS de los diferentes grupos entre sí o respecto al grupo control, y establecer qué grupos son estadísticamente diferentes y cuáles se han de considerar iguales.

Análisis de la Variancia. Este es un método paramétrico de análisis que se aplica a los estudios en los que se realiza la cuantificación del hongo en

Materiales y métodos

diversos órganos. Permite comparar la media de recuperación para cada órgano entre los diferentes grupos del estudio. Como es un método paramétrico, los datos tienen que seguir una distribución normal, y para ello se suele trabajar con logaritmos en base 10 de los recuentos de colonias obtenidos. Este método no es válido en grupos de datos muy pequeños, siendo en este caso recomendable utilizar un test no paramétrico como el test U de Mann-Whitney.

Test U de Mann-Whitney. Esta prueba no paramétrica permite comparar los datos obtenidos en los recuentos de colonias por gramo de órgano y los tamaños de las lesiones en los estudios de cromoblastomycosis. No compara las medias sino que ordena los datos de los dos grupos que se comparan y determina unos rangos. En este test, por lo tanto, no hace falta que los datos sigan una distribución normal y podemos trabajar con los datos originales o con los logaritmos, ya que con ambos obtendremos los mismos resultados.

Test de Kruskal-Wallis. Es un test no paramétrico equivalente al anterior para múltiples grupos.

Test t de Student. Esta prueba evalúa si las medianas de dos grupos son estadísticamente diferentes entre sí. Se ha utilizado para detectar diferencias en los niveles de galactomanano en suero en ratones que han recibido diferente tratamiento. Este análisis es adecuado cuando el tamaño de la muestra es demasiado pequeño por seguir una distribución normal. Se utiliza una estimación de la desviación típica en lugar del valor real, hecho que permite utilizar los datos originales.

4. RESULTADOS

4.1. Terapia antifúngica en un modelo de cromoblastomycosis por *Fonsecaea pedrosoi* en el ratón atímico.

Antifungal therapy in an athymic murine model of chromoblastomycosis by *Fonsecaea pedrosoi*.

Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Hernández P, Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011, 55:3709-3713.

Antifungal Therapy in an Athymic Murine Model of Chromoblastomycosis by *Fonsecaea pedrosoi*[∇]

Enrique Calvo,¹ F. Javier Pastor,¹ Emilio Mayayo,² Pilar Hernández,³ and Josep Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia,¹ Unitat d'Anatomia Patològica,² and Unitat d'Estadística i Epidemiologia,³ Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

Received 30 November 2010/Returned for modification 9 March 2011/Accepted 10 May 2011

We have compared the efficacy of terbinafine (TRB) and itraconazole (ITZ), the recommended drugs for the treatment of chromoblastomycosis, with that of posaconazole (PSC) and voriconazole (VRC) in athymic mice infected with the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. Three weeks after challenge, mice were treated for 4 months with PSC at 10 or 20 mg/kg of body weight/day, with VRC at 10 or 20 mg/kg/day, with ITZ at 25 or 50 mg/kg/day, or with TRB at 150 or 250 mg/kg/day. The progress of the infection was evaluated by measuring the size of the lesions, by histopathological studies, and by cultures of the excised tissue. The two doses of PSC followed by the highest doses of ITZ and TRB showed the best results while VRC did not show efficacy. PSC could be an alternative in the treatment of chromoblastomycosis.

Chromoblastomycosis is a chronic fungal infection common to tropical and subtropical areas; it affects cutaneous and subcutaneous tissues and is acquired by direct inoculation of the fungus through the skin (27). The disease is caused by several species but mainly by *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophiala carrionii* and less frequently by *Fonsecaea monophora*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*, and *Exophiala spinifera* (21, 27). The clinical characteristics of the disease include the development of nodular lesions at the site of the inoculation, which can progress slowly over the years to irregular verrucose hyperkeratotic forms, scaly plaques, or scarring atrophic skin lesions. Histopathologically, this disease is characterized by the presence of sclerotic bodies (muriform cells) although occasionally pigmented hyphae can be also present (27).

Depending on the stage of the disease, different therapeutic options have been recommended to treat chromoblastomycosis; these include surgery, thermotherapy, and chemotherapy (27). Itraconazole (ITZ) and terbinafine (TRB) are the most commonly used drugs in the treatment of chromoblastomycosis (27), and combinations of them are especially indicated in refractory infections (11). Although new azoles like posaconazole (PSC) and voriconazole (VRC) have shown good efficacy against cerebral and disseminated phaeohyphomycosis (2, 16, 18, 22, 31), little is known about their role in the treatment of chromoblastomycosis.

We have compared the efficacies of VRC and PSC with those of traditionally used drugs in a murine model of chromoblastomycosis.

MATERIALS AND METHODS

Establishing the model. Three clinical isolates, two of *F. pedrosoi* (FMR 6630 and FMR 5211) and one of *P. verrucosa* (FMR 5210), were tested for the

development of a reproducible murine chromoblastomycosis. On the day of infection, 2-week cultures on potato dextrose agar (PDA) of each strain were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells or hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on hemocytometer counts. Dilutions of the original suspensions were cultured on PDA plates to test viability. Three different inocula for each fungal isolated were tested, i.e., 1×10^5 CFU, 7×10^5 CFU, and 3×10^6 CFU. To try to reproduce previous studies of other authors who developed murine models of chromoblastomycosis (1, 6), two different mouse strains and two routes of inoculation were tested. Athymic CD-1 and OF-1 male mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used to develop such models. Animals were anesthetized by isoflurane inhalation. One day before challenge and every 9 days, half of the OF-1 mice were immunosuppressed with 200 mg/kg of body weight of cyclophosphamide and 150 mg/kg of 5-fluorouracil (24) while the remaining half remained immunocompetent. Athymic CD-1 mice were challenged subcutaneously over the left thigh with 0.1 ml of each inoculum (1). Immunocompetent or immunosuppressed OF-1 mice were similarly challenged but also infected intraperitoneally with 1 ml of the same inocula in different abdominal sites (6). Groups of 5 mice were randomly established and housed in standard boxes with corncob bedding and had free access to food and water.

All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee.

Therapy study. Once the fungal strain and the most suitable testing conditions to produce a reproducible chromoblastomycosis model were chosen, groups of eight CD-1 athymic mice were randomly established for each treatment, and one group served as a control. Mice were subcutaneously infected with 3×10^6 CFU of the strain *F. pedrosoi* FMR 6630, which was the only inoculum tested able to produce chronic infections, in 0.1 ml of sterile saline solution over the left thigh. The *in vitro* susceptibilities of the strain *F. pedrosoi* FMR 6630 to PSC, VRC, TRB, and ITZ were tested using a broth microdilution method according to the CLSI guidelines for filamentous fungi (7).

The drugs tested were PSC (Noxafil; Schering-Plough, Ltd., Hertfordshire, United Kingdom), ITZ (Canadiol; Laboratorios Dr. Esteve S. A., Barcelona, Spain), TRB (Novartis Farmacèutica S. A., Barcelona, Spain), and VRC (Vfend; Pfizer S. A., Madrid, Spain). All drugs were administered orally once daily, with testing the following doses: PSC at 10 or 20 mg/kg, ITZ at 25 or 50 mg/kg, TRB at 150 or 250 mg/kg, and VRC at 10 or 20 mg/kg. These doses were selected on the basis of previous experimental studies that demonstrated that these doses delivered plasma levels in mice similar to those in humans (13, 15, 17, 19, 30, 32, 34). Drug treatment did not begin until 3 weeks after challenge to ensure that all animals developed the infection, and the treatment lasted for 4 months. Control groups received no treatment. Mice treated with VRC received 0.25 ml of grapefruit juice by gavage twice daily, 30 min before and approximately 6 h after the VRC administration (29, 30, 33). In order to prevent bacterial infections, all mice received 5 mg/day of ceftazidime subcutaneously from days 1 to 7 after challenge.

The efficacies of the different drugs were evaluated by measuring the skin

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone: 34 977759359. Fax: 34 977759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

[∇] Published ahead of print on 16 May 2011.

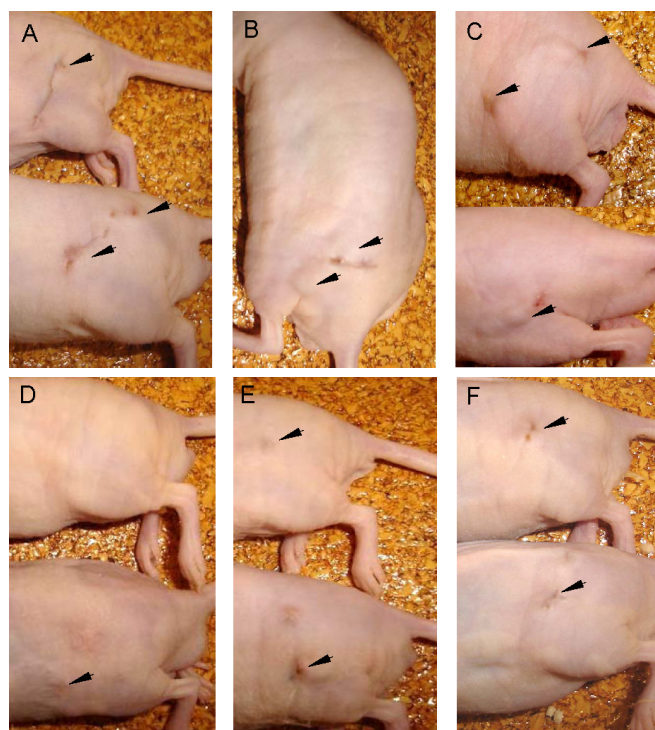


FIG. 1. Macroscopic lesions in athymic mice 4 months after challenge with 3×10^6 CFU of the strain *F. pedrosoi* FMR 6630. Control mice (A and B) and mice treated with VRC at 20 mg/kg (C) show nodular disseminated lesions in the left thigh. (D) Lesions of mice treated with PSC at 20 mg/kg are almost unapparent. Mice treated with ITZ at 50 mg/kg (E) and mice treated with TRB at 250 mg/kg (F) show small nodules.

lesions in 3-week intervals using a caliper. The areas of the lesions were assessed using the mathematical formula of the ellipse (28). At the end of the experiment, histopathological studies and qualitative skin cultures were also performed. The compiled data of the lesion areas were analyzed by a Kruskal-Wallis test. When this test was significant, we used a Mann-Whitney U test to compare treatments with the control group. Statistical significance of the tissue cultures studied was estimated by Fisher's exact test. When P was <0.05 , the differences were considered statistically significant.

For the histopathological study, approximately half of the tissue of each lesion was excised and fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin embedded, and sliced into 2- μ m sections, which were stained with hematoxylin and eosin (H&E), periodic acid-Schiff (PAS), Grocott methenamine silver, or Giemsa and examined blind by light microscopy. Fine-needle aspiration cytologies of the nodules were also performed. For the skin culture study, the remaining half of the excised tissue was cultured on PDA supplemented with chloramphenicol, incubated at 30°C, and examined daily for 7 days.

RESULTS

Establishing the model. We did not observe signs of disease after 4 months of the intraperitoneal inoculation of the fungus in immunocompetent mice. The subcutaneous inoculation of the fungus in immunocompetent mice produced lesions of chromoblastomycosis; however, they cured spontaneously after a few weeks. Similarly, subcutaneous inoculation of the fungus in immunocompromised OF-1 mice showed disappointing results, too. Finally, the chosen model was the subcutaneous inoculation in CD-1 athymic mice of the strain FMR 6630 since this method was able to produce a chronic infection in the animals, with the presence of typical lesions of chromoblasto-

mycosis in the area of inoculation. Such lesions persisted at least 1 year after challenge.

Therapy study. For strain FMR 6630, the MIC of TRB, PSC, and VRC was 0.12 μ g/ml, and the MIC of ITZ was 0.5 μ g/ml.

The lesions of the control animals were macroscopically characterized by the presence of dark subcutaneous soft nodules that in some cases ulcerated and disseminated throughout the thigh (Fig. 1). With the exception of animals treated with VRC at 10 mg/kg, the sizes of the lesions tended to decrease during the treatment, with a substantial reduction in the degree of ulceration and dissemination. Table 1 and Fig. 2 show the changes in the sizes of the lesions and the percentage of positive cultures at the end of the therapy. After 4 months of therapy, mice treated with TRB at 250 mg/kg, ITZ at 50 mg/kg, or PSC at 20 mg/kg showed lesions significantly smaller than those of the control group. PSC at 20 mg/kg was the most effective treatment, being able to reduce the sizes of the lesions by 75% in comparison to the start of therapy. PSC at 10 mg/kg achieved an important reduction (30.4%) in the lesion area although this was not significant with respect to the control group (P value of 0.076) due to the high dispersion of the values. ITZ at 50 mg/kg and TRB at 250 mg/kg reduced the areas of the lesions by 20% and 1%, respectively. The other therapies were not able to reduce the sizes of the lesions.

The histological study of control mice showed well-delimited subcutaneous nodules with a central zone of necrosis and an important inflammatory response with presence of polymorphonuclear neutrophils, histiocytes, and a few multinucleated giant cells. The sizes of the nodules and the inflammatory responses were higher in control animals and in those treated with VRC than in mice treated with the other therapies (Fig. 3). Nodule sections showed fungal pigmented hyphae and abundant brown pigmented globose sclerotic bodies, mainly around the necrosis areas (Fig. 4).

TABLE 1. Changes in the sizes of the lesions of murine chromoblastomycosis by *F. pedrosoi* and percentage of positive cultures after 16 weeks of therapy

Drug and dose (mg/kg of body wt)	% Change in lesion size ^a	% of positive cultures
Control	92.0 (368.3)	100
ITZ		
25	14.7 (220.9)	100
50	-20.0 (89.9) ** ^b	75
PSC		
10	-30.4 (107.6)	75
20	-75.0 (31.4) **	50**
TRB		
150	19.3 (163.3)	100
250	-0.6 (110.3) **	100
VRC		
10	90.8 (67.3)	100
20	35.9 (138.3)	100

^a Lesions changes are expressed as median values (interquartile range).

^b **, Mann-Whitney test P value of <0.05 in comparison with the control group.

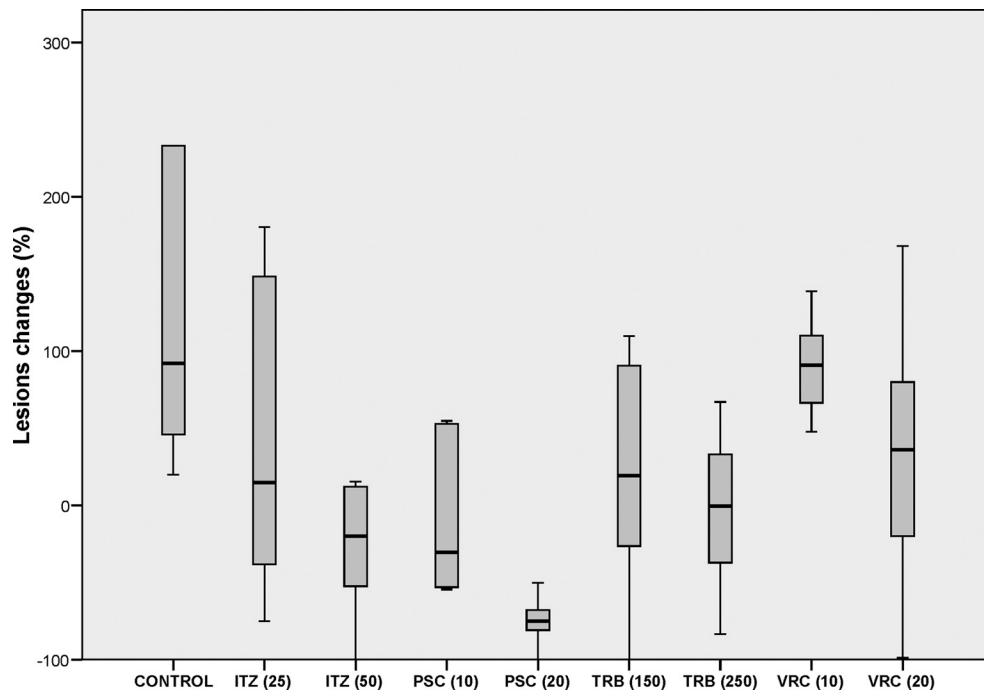


FIG. 2. Box plot of changes in the sizes of the lesions of murine chromoblastomycosis caused by *F. pedrosoi*. Horizontal lines indicate median values.

DISCUSSION

The aim of the current study was to evaluate the use of newer azoles as potential antifungal alternatives for the treatment of chromoblastomycosis in a murine model. First, we tried to reproduce the murine chromoblastomycosis described

in the literature, and although we repeated the same experimental conditions reported by other authors, we were not successful in developing a chronic infection. This could be explained by the different levels of virulence of the strains of a given species, as has been demonstrated in our preliminary

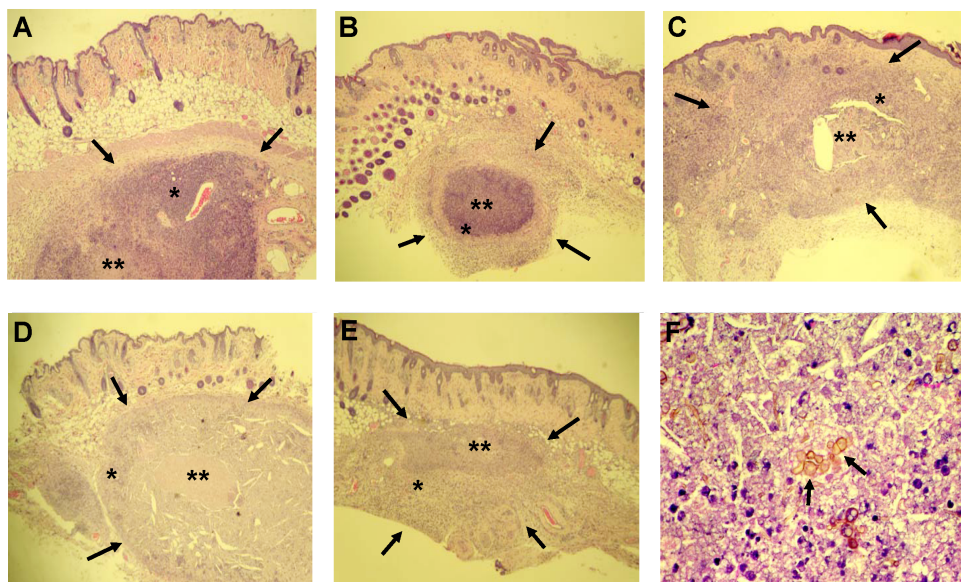


FIG. 3. Histological sections of the nodular lesions in athymic mice 4 months after challenge with 3×10^6 CFU of *F. pedrosoi* FMR 6630. Control mice (A) and mice treated with VRC at 20 mg/kg (B) show subcutaneous nodules (delimited by arrows) with important inflammatory responses (*) and central zones of necrosis (**). Mice treated with TRB at 250 mg/kg (C), mice treated with ITZ at 50 mg/kg (D), and mice treated with PSC at 20 mg/kg (E) show smaller subcutaneous nodules with central necrosis but with a less intense inflammatory response (H&E staining; magnification, $\times 25$). (F) Histological nodule section showing fungal elements with sclerotic bodies (PAS stain; magnification, $\times 200$).

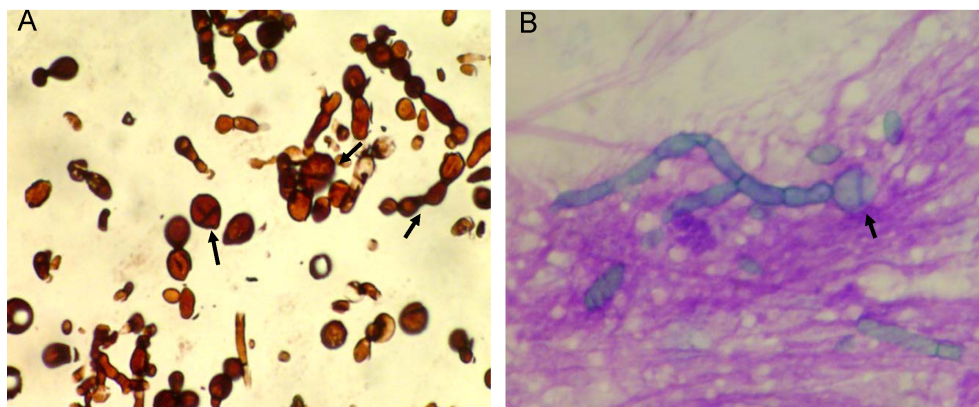


FIG. 4. Fine-needle aspiration cytology of a nodule of an athymic mouse 4 months after challenge with 3×10^6 CFU of the strain *F. pedrosoi* FMR 6630 showing septate hyphae and sclerotic bodies (arrows). (A) Grocott stain (magnification, $\times 400$). (B) Giemsa stain (magnification, $\times 400$).

study, and by the low rate of cutaneous signs of infection in the intraperitoneal infection model (6). We were able to obtain mice with chronic chromoblastomycosis only after subcutaneous inoculation in athymic mice. The T cell depletion of these mice facilitated the establishment of the infection since these cells appear to have a critical role in the host mechanism of defense against *F. pedrosoi* (1). In addition, the lack of hair on these mice allowed a better visualization of the lesions. This model proved to be reproducible and was chosen for the present study.

In our study, PSC was more effective than the other therapies in reducing the size of the lesions and the percentages of positive cultures from affected tissue. Previous experimental studies demonstrated that this drug was active in infections caused by dematiaceous fungi (5, 10, 20), including chromoblastomycosis (8). In the clinical setting, PSC has been successfully used in cases of cerebral and disseminated phaeohyphomycosis (2, 22). Such good efficacy against dematiaceous fungi, together with the drug's good tolerance in long-term therapies, make PSC a promising drug for the treatment of chromoblastomycosis (14, 23).

ITZ is currently the most commonly used drug in the treatment of chromoblastomycoses (4); nevertheless, infections by *F. pedrosoi* strains resistant to that drug have also been reported (3, 25, 26). In our study ITZ, especially at high doses, also showed efficacy in the treatment of the experimental infection.

VRC has shown good *in vitro* activity against dematiaceous fungi (9) and has been effective in cases of cerebral phaeohyphomycosis (16, 18, 31). However, its efficacy in chromoblastomycosis has been poorly studied (12), and further studies are necessary to evaluate the potential use of VRC in such infections. Under our experimental conditions, the increase in the size of the lesions despite the use of VRC, together with a high inflammatory response and null reduction of positive cultures, showed the lack of efficacy of this drug.

Due to its high degree of effectiveness and tolerability, TRB is considered one of the best options in the treatment of chromoblastomycosis (27). In our study, while TRB, especially at the highest dose, was able to reduce the inflammatory response to the infection at similar levels to PSC and ITZ, it showed less

efficacy in reducing the sizes of the lesions and the number of positive cultures than PSC at both doses and ITZ at 50 mg/kg.

In conclusion, our study suggests that PSC could be a potential alternative to ITZ and TRB in the treatment of chromoblastomycosis.

REFERENCES

1. Ahrens, J., J. R. Graybill, A. Abishawl, F. O. Tio, and M. G. Rinaldi. 1989. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**:651-658.
2. Al-Abdely, H. M., et al. 2005. Successful therapy of cerebral phaeohyphomycosis due to *Ramichloridium mackenziei* with the new triazole posaconazole. *Med. Mycol.* **43**:91-95.
3. Andrade, T. S., L. G. Castro, R. S. Nunes, V. M. Gimenes, and A. E. Cury. 2004. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* **47**:216-221.
4. Bonifaz, A., E. Carrasco-Gerard, and A. Saúl. 2001. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* **44**:1-7.
5. Calvo, E., et al. 2010. Murine model of a disseminated infection by the novel fungus *Fonsecaea monophora* and successful treatment with posaconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:919-923.
6. Cardona-Castro, N., and P. Agudelo-Flórez. 1999. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Med. Mycol.* **37**:81-83.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, 2nd ed. Approved standard M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
8. Defaveri, J., and J. R. Graybill. 1990. Treatment of chronic murine chromoblastomycosis with the triazole SCH39304. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**:601-606.
9. Espinel-Ingroff, A., K. Boyle, and D. J. Sheehan. 2001. *In vitro* antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. *Mycopathologia* **150**:101-105.
10. Graybill, J. R., L. K. Najvar, E. Johnson, R. Bocanegra, and D. Loebenberg. 2004. Posaconazole therapy of disseminated phaeohyphomycosis in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2288-2291.
11. Gupta, A. K., P. R. Taborca, and A. D. Sanzovo. 2002. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med. Mycol.* **40**:529-534.
12. Hamza, S. H., P. J. Mercado, H. G. Skelton, and K. J. Smith. 2003. An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. *J. Cutan. Pathol.* **30**:340-343.
13. Kan, V. L., and J. E. Bennett. 1988. Efficacies of four antifungal agents in experimental sporotrichosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1619-1623.
14. Keating, G. M. Posaconazole. 2005. *Drugs* **65**:1553-1567.
15. Krishna, G., A. Sansone-Parsons, M. Martinho, B. Kantesaria, and L. Pedicone. 2007. Posaconazole plasma concentrations in juvenile patients with invasive fungal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:812-816.
16. Koo, S., M. Klompas, and F. M. Marty. 2010. *Fonsecaea monophora* cerebral phaeohyphomycosis: case report of successful surgical excision and voriconazole treatment and review. *Med. Mycol.* **48**:769-774.

17. **Leyden, J.** 1988. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. *J. Am. Acad. Dermatol.* **38**:S42-47.
18. **Lyons, M. K., J. E. Blair, and K. O. Leslie.** 2005. Successful treatment with voriconazole of fungal cerebral abscess due to *Cladophialophora bantiana*. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **107**:532-534.
19. **MacCallum, D. M., and F. C. Odds.** 2002. Influence of grapefruit juice on itraconazole plasma levels in mice and guinea pigs. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:219-224.
20. **Mariné, M., F. J. Pastor, and J. Guarro.** 2009. Combined antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cladophialophora bantiana*. *Med. Mycol.* **47**:45-49.
21. **Najafzadeh, M. J., et al.** 2009. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med. Mycol.* **47**:17-25.
22. **Negróni, R., et al.** 2004. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeohyphomycosis due to *Exophiala spinifera*. *Clin. Infect. Dis.* **38**:e15-e20.
23. **Negróni, R., et al.** 2005. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **47**:339-346.
24. **Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, C. Serena, and J. Guarro.** 2004. Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**:247-251.
25. **Poirriez, J., et al.** 2000. A case of chromoblastomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine and oral amphotericin B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**:61-63.
26. **Pradinaud, R., and T. Bolzinger.** 1991. Treatment of chromoblastomycosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **25**:869-870.
27. **Queiroz-Telles, F., et al.** 2009. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med. Mycol.* **47**:3-15.
28. **Siebenhaar, F., et al.** 2007. Control of *Pseudomonas aeruginosa* skin infections in mice is mast cell-dependent. *Am. J. Pathol.* **170**:1910-1916.
29. **Sugar, A. M., and X. P. Liu.** 2000. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med. Mycol.* **38**:209-212.
30. **Sugar, A. M., and X. P. Liu.** 2001. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:601-604.
31. **Takei, H., J. C. Goodman, and S. Z. Powell.** 2007. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora bantiana* and *Fonsecaea pedrosoi*: report of three cases. *Clin. Neuropathol.* **26**:21-27.
32. **Trifilio, S., et al.** 2005. Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **35**:509-513.
33. **Warn, P. A., et al.** 2006. Comparative in vivo activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:1198-1207.
34. **Wiederhold, N. P., L. K. Najvar, R. Bocanegra, J. R. Graybill, and T. F. Patterson.** 2009. Efficacy of posaconazole as treatment and prophylaxis against *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:1055-1059.

4.5. Histopatología y tratamiento antifúngico de la cromoblastomycosis experimental en el ratón causada por *Cladophialophora carrionii*.

Histopathology and antifungal treatment of experimental murine chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii*.

Calvo E, Pastor FJ, Salas V, Mayayo E, Guarro J.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011, 67:666-670.

Histopathology and antifungal treatment of experimental murine chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii*

Enrique Calvo¹, F. Javier Pastor¹, Valentina Salas¹, Emilio Mayayo², Javier Capilla¹ and Josep Guarro^{1*}

¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; ²Unitat d'Anatomia Patològica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-977759359; Fax: +34-977759322; E-mail: josep.guarro@urv.cat

Received 18 July 2011; returned 21 September 2011; revised 8 November 2011; accepted 24 November 2011

Objectives: A murine model of chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii* was used to compare the efficacy of posaconazole and voriconazole with that of terbinafine and itraconazole, the currently used drugs in the management of chromoblastomycosis.

Methods: Athymic nude mice were infected with 2×10^7 cfu of a clinical isolate of *C. carrionii*. When typical lesions were established, treatments with posaconazole at 20 mg/kg/day, voriconazole at 20 mg/kg/day, itraconazole at 50 mg/kg/day or terbinafine at 250 mg/kg/day were initiated. Treatment efficacy was evaluated for 4 months by measuring the size of the lesions, observing any histopathological changes and culturing the excised tissue.

Results: Posaconazole was the only drug that reduced the initial lesion size, while voriconazole and terbinafine reduced growth relative to controls.

Conclusions: This study suggests that the newer triazoles have potential in the treatment of chromoblastomycosis caused by *C. carrionii*.

Keywords: *C. carrionii*, mice, cutaneous infections

Introduction

Chromoblastomycosis is a chronic cutaneous and subcutaneous infection caused by several dematiaceous fungi that inhabit soil and decayed wood. The disease has a worldwide distribution, with *Fonsecaea pedrosoi* being the most common aetiological agent in tropical areas and *Cladophialophora carrionii* the predominant agent in dry countries and desert zones.¹ The infection is caused by traumatic inoculation of the aetiological agent to the skin, generally by contaminated thorns or splinters, which, in the case of chromoblastomycosis caused by *C. carrionii*, are strongly associated with plants of the *Cactaceae* family.²

The lesions usually start as small skin-coloured papules, which gradually enlarge and develop several morphologies.³ The disease is generally localized, but it can disseminate by extension of the lesions through lymphatic vessels or by self-inoculation through scratching.¹ The diagnosis relies on clinical manifestations, fungal isolation in culture and microscopic detection of thick-walled, brown-pigmented, rounded cells called sclerotic bodies.^{1–3} Management of chromoblastomycosis is complicated and requires long-term therapy, which in most cases does not prevent relapse of the infection. Treatments include surgery, thermotherapy, chemotherapy or combinations

of these.¹ There is no drug of choice for chromoblastomycosis; however, terbinafine and itraconazole, alone or in combination, are the currently recommended treatments, and new triazoles like posaconazole and voriconazole could become alternatives for this infection.^{3–6}

Based on an experimental murine model of chromoblastomycosis previously used for testing *F. pedrosoi*,^{7,8} we have compared the efficacy of newer azoles and traditionally used drugs in the treatment of infections caused by *C. carrionii*.

Methods

Establishment of the model

We used two clinical isolates of *C. carrionii* (FMR 10804 and FMR 10805) to develop a murine chromoblastomycosis. On the day of infection, 2 week cultures of each strain on potato dextrose agar (PDA) were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells or hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on haemocytometer counts, viability being confirmed by serial dilution plating on PDA. We used athymic CD-1 male mice with a mean weight of 30 g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain). After being anaesthetized by isoflurane inhalation, mice were subcutaneously challenged over the left thigh.⁷ Inocula of

Antifungal therapy in mice infected with *C. carrionii*

5×10^5 , 3×10^6 or 2×10^7 cfu in 0.1 mL of sterile saline were tested for each fungal isolate.

Groups of eight mice were randomly established and housed in standard boxes with corncob bedding and free access to a 3.1% fat diet and water. All animal care procedures were supervised and approved by the Rovira i Virgili University Animal Welfare and Ethics Committee.

Therapy study

Groups of eight CD-1 athymic mice were established randomly for each treatment, plus one group as control. Mice were infected subcutaneously with 2×10^7 cfu of the strain *C. carrionii* FMR 10804 in 0.1 mL of sterile saline solution over the left thigh. This was the only strain and inoculum tested that was able to produce chronic infections. The *in vitro* susceptibility of the strain to posaconazole, voriconazole, terbinafine and itraconazole was tested by using a broth microdilution method.⁹ Due to the slow growth of the isolate, plates were incubated for 72 or 96 h at 35°C before the first MIC determination. The drugs tested were: posaconazole at 20 mg/kg, itraconazole at 50 mg/kg, terbinafine at 250 mg/kg and voriconazole at 20 mg/kg. All drugs were given orally once daily. Treatments began 3 weeks after challenge, which allowed the infection to become established, and the therapy lasted for 4 months. Control groups received no treatment. Mice treated with voriconazole received an additional 0.25 mL of grapefruit juice by gavage twice daily, 30 min before and approximately 6 h after voriconazole administration.^{10,11} From days 1 to 7 after challenge, mice received 5 mg/day of ceftazidime subcutaneously to prevent bacterial infections.

To assess the efficacy of the different drugs, we measured the areas of the skin lesions at the beginning and at the end of therapy, with histopathological studies and qualitative skin cultures also performed.

For the histopathological study, 4 months after challenge and 24 h after the last antifungal dose, approximately half of the tissue of each lesion was excised and fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin embedded and sliced into 2 μ m sections, which were stained with haematoxylin-eosin or Giemsa and examined blind by light microscopy. Fine-needle aspiration cytologies of the nodules of control mice were also carried out to assess the presence of sclerotic bodies, thus confirming establishment of the infection. The remaining half of the excised tissue was aseptically separated into four or five pieces using a sterile scalpel and placed on the surface of PDA plates supplemented with chloramphenicol. Plates were then incubated at 30°C and examined daily for 7 days.

The sizes of the lesion areas were analysed using the Kruskal–Wallis test and, when this test was significant, we used the Mann–Whitney *U*-test to compare treatments with the control group. Statistical significance of the tissue culture data was estimated by Fisher's exact test with a *P* value of ≤ 0.05 considered significant.

Results

The *in vitro* susceptibility test of the strain used showed MICs of 0.06 mg/L for posaconazole, 0.12 mg/L for terbinafine and voriconazole and 0.25 mg/L for itraconazole.

In the *in vivo* study, after 4 months of therapy the lesions were macroscopically characterized by the presence of dark, soft subcutaneous nodules, some of which were ulcerated. The changes in the sizes of the lesions at the end of the therapy are shown in Table 1 and Figure 1. The cultures of lesion biopsies were positive for *C. carrionii* in all cases. After 4 months of treatment, administering posaconazole was able to reduce the size of the initial lesions. In mice treated with terbinafine or voriconazole the lesions showed significantly lower growth than that of the

Table 1. Differences between lesion size areas in murine chromoblastomycosis caused by *C. carrionii*, at the beginning of the treatment and after 4 months of therapy

Drug and dose (mg/kg/day)	Differences in lesion size (mm ²)		
	median	IQR	<i>P</i> value ^a
Control	+5.27	3.43	—
ITC (50)	+0.82	5.44	0.065
POS (20)	-0.95	3.21	0.0002
TRB (250)	+0.90	2.95	0.0002
VRC (20)	+2.12	4.14	0.0019

ITC, itraconazole; POS, posaconazole; TRB, terbinafine; VRC, voriconazole. ^aIn comparison with the control group.

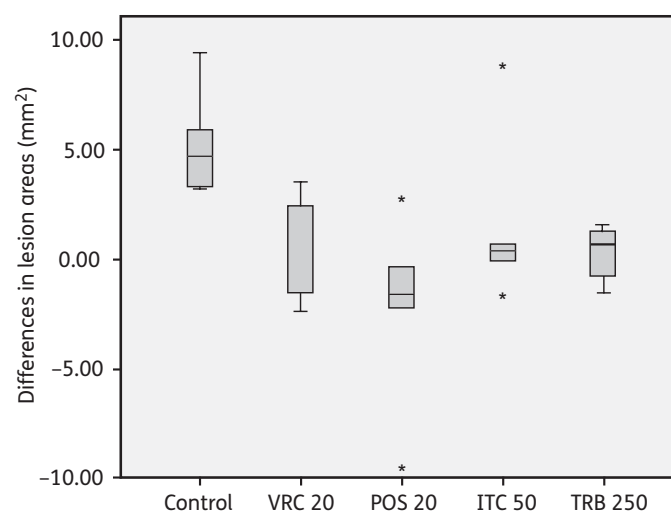


Figure 1. Box-plot of changes in the sizes of the lesions of murine chromoblastomycosis caused by *C. carrionii*. Horizontal lines indicate median values of eight mice. Asterisks represent the extreme outliers (values outside 3 IQRs measured from the 25th and 75th percentiles). VRC, voriconazole; POS, posaconazole; ITC, itraconazole; TRB, terbinafine; 20, 20 mg/kg/day; 50, 50 mg/kg/day; 250, 250 mg/kg/day.

control group. Itraconazole was the least active of the drugs tested. There were no significant differences among treatments.

The histological study of the control mice showed well-delimited subcutaneous nodules with central zones of necrosis, and a significant inflammatory response with the presence of polymorphonuclear neutrophils, histiocytes and a few giant multinucleated cells. The sizes of the nodules and the inflammatory responses were higher in control animals than in treated mice. Nodule sections showed pigmented hyphae and abundant brown-pigmented globose sclerotic bodies of different shapes and sizes, mainly around the necrosis areas (Figure 2). Fine-needle aspiration cytologies of control mice nodules 4 months after the inoculation showed a large number of hyphae and sclerotic bodies (Figure 3).

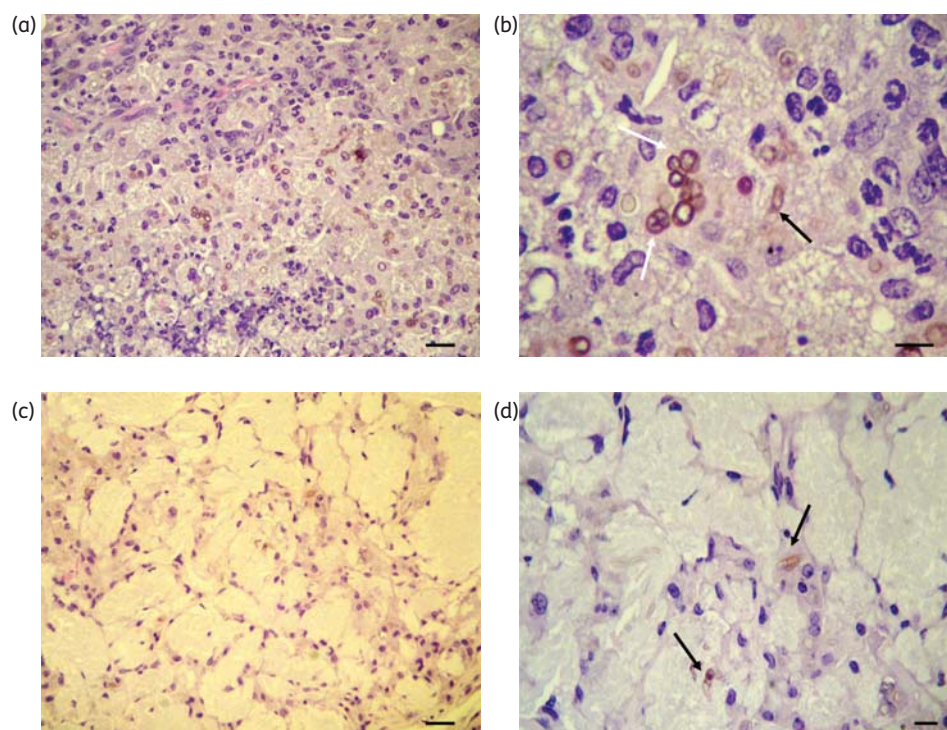


Figure 2. Histological sections of the nodular lesions in athymic mice 4 months after challenge with 2×10^7 cfu of *C. carrionii* FMR 10804. (a and b) Control mice showing an important inflammatory response with abundant melanized fungal hyphae (black arrows) and sclerotic bodies (white arrows). (c and d) Mice treated with 20 mg/kg/day posaconazole show few fungal elements. Haematoxylin-eosin stain. Bar = 60 μ m (a and c) or 20 μ m (b and d). This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

Discussion

The management of chromoblastomycosis is generally complicated and usually shows only modest success rates.^{4,5} The outcome for patients depends on several factors, such as the stage and severity of the infection, as well as the causal agent of the disease—species like *C. carrionii* and *Phialophora verrucosa* seem to be more susceptible to antifungal drugs than other species causing this type of infection, such as *F. pedrosoi*.⁴ In the current study, we mimicked the route of human infection by inoculating the fungus subcutaneously, causing chronic and progressive verrucous dark lesions that, despite developing quickly in comparison with those in humans, in some cases disseminated and ulcerated.

All the tested drugs showed good activity *in vitro* against the isolate of *C. carrionii* used in our study. These *in vitro* results agree with previous studies on this fungus.^{12,13} For the *in vivo* study, the doses were selected on the basis of the observed plasma levels in mice in previous studies,^{14–17} which in all cases were far above the respective MICs of the drugs tested. These levels are similar to those achieved in humans receiving the recommended doses for the treatment of chromoblastomycosis.^{18–20} The results showed that administration of terbinafine and voriconazole was only able to limit the growth of the lesions, posaconazole being the only drug that reduced the size of the lesions at the end of the therapy. None of the drugs was able to achieve tissue fungal clearance after 4 months of treatment. To our knowledge, there is no experimental data on the efficacy *in vivo* of different antifungal drugs against chromoblastomycosis

caused by *C. carrionii*. Nevertheless, our results with *C. carrionii* agree with previous studies carried out with *F. pedrosoi*, which also demonstrated the good efficacy of posaconazole,^{8,21} even higher than that of itraconazole, terbinafine or voriconazole.⁸ To obtain a similar degree of infection in this study, we had to use a higher inoculum load than was used in a previous study that tested *F. pedrosoi* in similar experimental conditions, which suggests that our *C. carrionii* strain had lesser virulence. However, in the treatment study we also noted a generally poorer response to the therapies in mice infected with *C. carrionii* than those infected with *F. pedrosoi*, with the exception of voriconazole, which was ineffective against the latter.

In the clinical setting, monotherapies with itraconazole or terbinafine have proven to be effective against chromoblastomycosis,¹ and the combination of these drugs has even shown a synergistic interaction.²² On the other hand, the use of itraconazole may be limited by its drug interactions and by the induction of the resistance that its long-term administration can produce.^{4,23} In addition, itraconazole therapy has also been associated with adverse cardiac effects.²⁴ Regarding tolerance and efficacy, terbinafine is one of the recommended drugs for the treatment of chromoblastomycosis, showing a low side effect rate (2%–10%) and a relatively high cure rate (45%–70%).^{4,25} In contrast, the failure rate and reported cases of severe side effects like hepatic dysfunction,²⁶ make it necessary to find effective alternatives.

Although the use of posaconazole against chromoblastomycosis is very limited, it is considered a good option for the

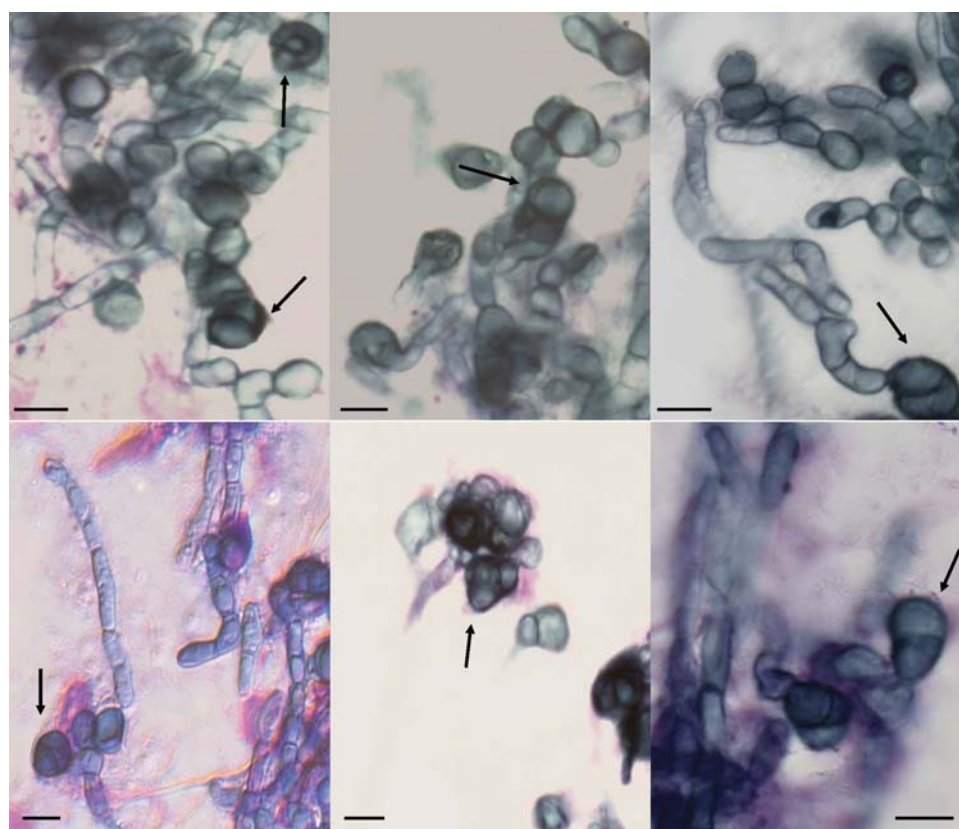


Figure 3. Fine-needle aspiration cytology of a nodule of athymic mice 4 months after challenge with 2×10^7 cfu of *C. carrionii* FMR 10804 showing septate hyphae and sclerotic bodies of different shapes and sizes (arrows). Giemsa stain. Bar = 5 μ m. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

treatment of infections caused by dematiaceous fungi,⁵ and is the drug that shows high efficacy against the widest spectrum of opportunistic fungi.²⁷ It was reported to be effective in a case of chromoblastomycosis caused by *C. carrionii* in a kidney and pancreas recipient,²⁸ and in chromoblastomycoses caused by *F. pedrosoi* refractory to conventional therapies such as itraconazole and terbinafine.^{29,30} Because of its good antifungal activity against this kind of fungus and its deeper skin penetration and tolerance in long-term therapies,^{18,31} posaconazole has become a promising drug in the management of chromoblastomycosis. Concerning voriconazole, despite having been reported to show slightly higher MICs than other azoles for dematiaceous fungi, its use against infections caused by these fungi is common.³² The drug has been successfully used in the treatment of cutaneous phaeohyphomycosis,⁶ and, due to its excellent cerebral penetration,³³ in cerebral phaeohyphomycosis, although with contradictory results in the latter.³⁴⁻³⁶ There are no data on the use of voriconazole in the management of chromoblastomycosis caused by *C. carrionii*. Nevertheless, four patients with infections by *F. pedrosoi*, with poor response to itraconazole and terbinafine, showed some improvement after voriconazole therapy.^{30,37}

In summary, in our experimental model of chromoblastomycosis, posaconazole showed good efficacy, while that of voriconazole was moderate. These results confirm the potential use of posaconazole against chromoblastomycosis caused by

C. carrionii, although, despite these encouraging results, the high cost of the newer azoles (voriconazole and posaconazole) strongly limits their use, particularly in those areas where this infection is endemic.¹

Funding

This study was supported by internal funding.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Ameen M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol* 2009; **34**: 849-54.
- 2 López Martínez R, Méndez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2007; **25**: 188-94.
- 3 Queiroz-Telles F, Esterre P, Pérez-Blanco M et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2009; **47**: 3-15.
- 4 Bonifaz A, Paredes-Solís V, Saúl A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother* 2004; **5**: 247-54.

- 5 Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis* 2006; **19**: 148–52.
- 6 Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL *et al.* Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2011; **49**: 225–36.
- 7 Ahrens J, Graybill JR, Abishawl A *et al.* Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989; **40**: 651–8.
- 8 Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E *et al.* Antifungal therapy in an athymic murine model of chromoblastomycosis by *Fonsecaea pedrosoi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3709–13.
- 9 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi—Second Edition: Approved Standard M38-A2*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 10 Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med Mycol* 2000; **38**: 209–12.
- 11 Warn PA, Sharp A, Mosquera J *et al.* Comparative *in vivo* activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 1198–207.
- 12 González GM, Fothergill AW, Sutton DA *et al.* *In vitro* activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med Mycol* 2005; **43**: 281–4.
- 13 Vitale RG, Perez-Blanco M, De Hoog GS. *In vitro* activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med Mycol* 2009; **47**: 35–40.
- 14 Sugar AM, Liu XP. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 601–4.
- 15 MacCallum DM, Odds FC. Influence of grapefruit juice on itraconazole plasma levels in mice and guinea pigs. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 219–24.
- 16 Kan VL, Bennett JE. Efficacies of four antifungal agents in experimental sporotrichosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**: 1619–23.
- 17 Andes D, Marchillo K, Conklin R *et al.* Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 137–42.
- 18 Krishna G, Beresford E, Ma L *et al.* Skin concentrations and pharmacokinetics of posaconazole after oral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1807–10.
- 19 Trifilio S, Ortiz R, Pennick G *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**: 509–13.
- 20 Leyden J. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. *J Am Acad Dermatol* 1998; **38**: S42–7.
- 21 Defaveri J, Graybill JR. Treatment of chronic murine chromoblastomycosis with the triazole SCH39304. *Am J Trop Med Hyg* 1990; **42**: 601–6.
- 22 Gupta AK, Taborca PR, Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol* 2002; **40**: 529–34.
- 23 Andrade TS, Castro LG, Nunes RS *et al.* Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* 2004; **47**: 216–21.
- 24 Fung SL, Chau CH, Yew WW. Cardiovascular adverse effects during itraconazole therapy. *Eur Respir J* 2008; **32**: 240.
- 25 Bonifaz A, Saúl A, Paredes-Solis V *et al.* Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. *J Dermatolog Treat* 2005; **16**: 47–51.
- 26 Ajit C, Suvannasankha A, Zaeri N *et al.* Terbinafine-associated hepatotoxicity. *Am J Med Sci* 2003; **325**: 292–5.
- 27 Guarro J. Lessons from animals studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1447–66.
- 28 Dupont C, Duong TA, Mallet S *et al.* Unusual presentation of chromoblastomycosis due to *Cladophialophora carrionii* in a renal and pancreas transplant recipient successfully treated with posaconazole and surgical excision. *Transpl Infect Dis* 2010; **12**: 180–3.
- 29 Negroni R, Tobón A, Bustamante B *et al.* Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. *Rev Inst Trop Sao Paulo* 2005; **47**: 339–46.
- 30 Criado PR, Careta MF, Valente NY *et al.* Extensive long-standing chromomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: three cases with relevant improvement under voriconazole therapy. *J Dermatolog* 2011; **22**: 167–74.
- 31 Raad II, Graybill JR, Bustamante AB *et al.* Safety of long-term oral posaconazole use in the treatment of refractory invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 2006; **15**: 1726–34.
- 32 Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; **23**: 884–928.
- 33 Johnson LB, Kauffman CA. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 630–7.
- 34 Fica A, Diaz MC, Luppi M *et al.* Unsuccessful treatment with voriconazole of a brain abscess due to *Cladophialophora bantiana*. *Scand J Infect Dis* 2003; **35**: 892–3.
- 35 Lyons MK, Blair JE, Leslie KO. Successful treatment with voriconazole of fungal cerebral abscess due to *Cladophialophora bantiana*. *Clin Neurol Neurosurg* 2005; **107**: 532–4.
- 36 Koo S, Klompas M, Marty FM. *Fonsecaea monophora* cerebral phaeohyphomycosis: case report of successful surgical excision and voriconazole treatment and review. *Med Mycol* 2010; **48**: 769–74.
- 37 Hamza SH, Mercado PJ, Skelton HG *et al.* An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. *J Cutan Pathol* 2003; **30**: 340–3.

4.3. Modelo murino de infección diseminada por *Fonsecaea monophora* y tratamiento con posaconazol

Murine model of a disseminated infection by the novel fungus *Fonsecaea monophora* and successful treatment with posaconazole.

Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM, Mayayo E, Salas V, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010, 54:919-923.

Murine Model of a Disseminated Infection by the Novel Fungus *Fonsecaea monophora* and Successful Treatment with Posaconazole[∇]

Enrique Calvo, F. Javier Pastor, M. Mar Rodríguez, Emilio Mayayo, Valentina Salas, and Josep Guarro*

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

Received 9 September 2009/Returned for modification 1 November 2009/Accepted 5 December 2009

We have evaluated the efficacy of posaconazole, amphotericin B, and itraconazole in a murine model of disseminated infection by *Fonsecaea monophora*. Of these three antifungal drugs tested, posaconazole prolonged survival significantly and reduced the fungal load in most of the organs tested. Bioassay studies demonstrated the relationship between posaconazole levels and dose escalation in serum and brain tissue. Posaconazole may have a clinical role in the treatment of disseminated infections by *F. monophora*.

The dematiaceous fungus *Fonsecaea monophora* is a causal agent of cerebral phaeohyphomycosis (10) and chromoblastomycosis (11–13). On the basis of molecular studies (3, 7), this fungus has recently been segregated from *Fonsecaea pedrosoi*, a traditionally well-known pathogen. Since very little is known about the pathogenicity and antifungal susceptibility of this novel fungus, the aim of this study was to develop a murine

model of disseminated infection by *F. monophora* to evaluate its virulence and compare the therapeutic efficacies of amphotericin B (AMB), itraconazole (ITZ), and posaconazole (PSC).

Two clinical strains of *Fonsecaea monophora* were used: CBS 269.37 and CBS 117236. Their *in vitro* antifungal susceptibility tests (8) showed MICs of 1 $\mu\text{g/ml}$ for AMB; 0.5 and 0.25

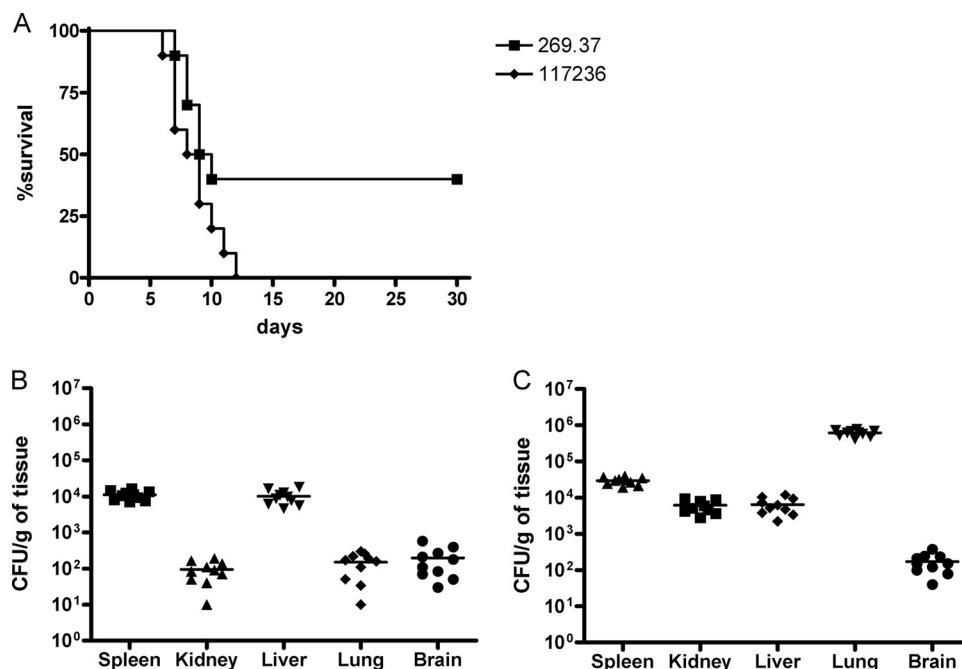


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with 2×10^5 CFU of *F. monophora* CBS 269.37 and CBS 117236 (A). Colony counts in spleen, kidney, liver, lung, and brain of mice infected with 2×10^5 CFU of *F. monophora* strain CBS 269.37 (B) and strain CBS 117236 (C). Horizontal lines indicate mean values.

* 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: josep.guarro@urv.cat.

[∇] Published ahead of print on 14 December 2009.

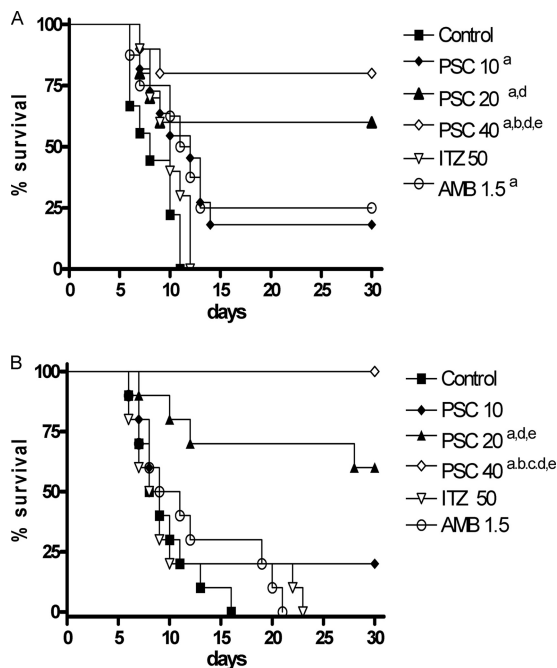


FIG. 2. Cumulative mortality of mice infected with 2×10^5 CFU of *F. monophora* strain CBS 269.37 (A) and 1×10^6 CFU of strain CBS 117236 (B). ^a, $P < 0.05$ versus control; ^b, $P < 0.05$ versus 10 mg/kg PSC; ^c, $P < 0.05$ versus 20 mg/kg PSC; ^d, $P < 0.05$ versus 50 mg/kg ITZ; ^e, $P < 0.05$ versus 1.5 mg/kg AMB.

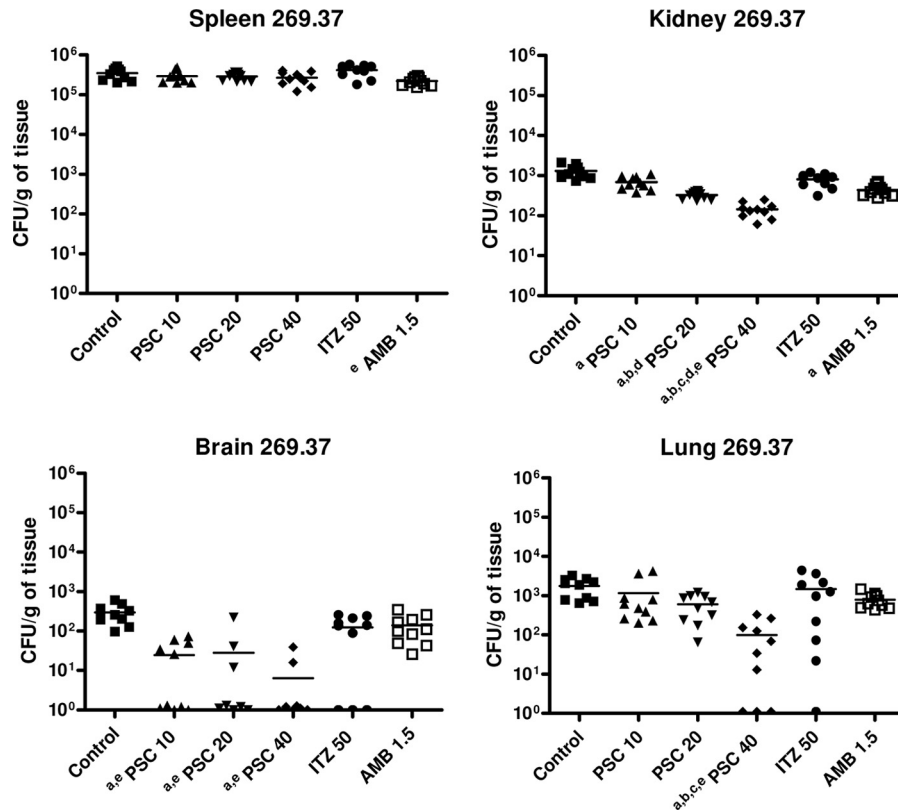


FIG. 3. Effects of antifungal treatments on CFU counts in mice infected by CBS 269.37 in spleen, kidney, brain, and lung. ^a, $P < 0.003$ versus control; ^b, $P < 0.003$ versus 10 mg/kg PSC; ^c, $P < 0.003$ versus 20 mg/kg PSC; ^d, $P < 0.003$ versus 50 mg/kg ITZ; ^e, $P < 0.003$ versus 1.5 mg/kg AMB. Horizontal lines indicate mean values.

$\mu\text{g/ml}$ for ITZ, respectively; and 0.25 and 0.12 $\mu\text{g/ml}$ for PSC, respectively.

Male OF1 mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of body weight of cyclophosphamide plus 5-fluorouracil at 150 mg/kg intravenously 1 day prior to the infection.

Development and characterization of an infection model.

For each strain, groups of 20 mice (10 for survival and 10 for tissue burden studies) were challenged with 2×10^5 CFU into the lateral tail vein. This was the lowest dose tested to produce an acute infection from which all the animals infected with strain CBS 117236 died within 15 days postinfection (data not shown). Animals were checked daily for 30 days. For the tissue burden study, mice were sacrificed on day 6 postinfection. Lungs, brain, spleen, liver, and kidneys were aseptically removed, and approximately half of each organ was weighed and homogenized in 1 ml of sterile normal saline. Dilutions of the homogenates were plated on potato dextrose agar (PDA), incubated at 30°C, and examined daily for 7 days. For the histopathology study, half of each organ was fixed, dehydrated, paraffin embedded, and sliced into 2- μm sections, which were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff, or Grocott methamine silver. The Kaplan-Meier method and the log rank test were used for survival studies. When necessary, tissue burden studies were analyzed using the Kruskal-Wallis test, the Mann-Whitney U-test, and the Bonferroni correction. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

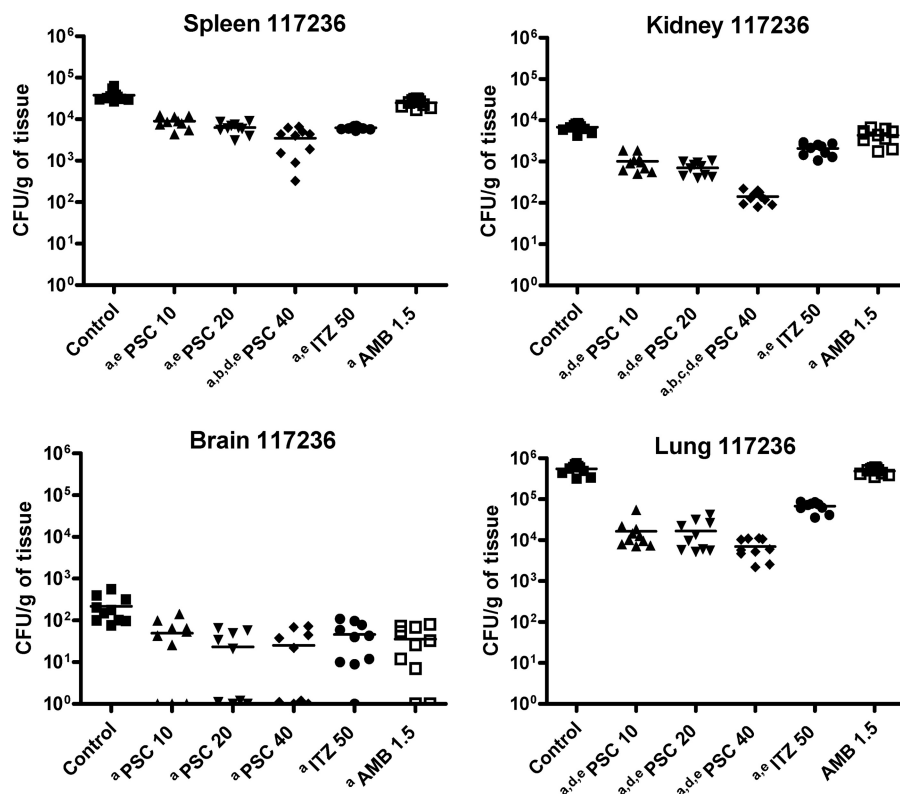


FIG. 4. Effects of the antifungal treatments on CFU counts in mice infected by CBS 117236 in spleen, kidney, brain, and lung. ^a, $P < 0.003$ versus control; ^b, $P < 0.003$ versus 10 mg/kg PSC; ^c, $P < 0.003$ versus 20 mg/kg PSC; ^d, $P < 0.003$ versus 50 mg/kg ITZ; ^e, $P < 0.003$ versus 1.5 mg/kg AMB. Horizontal lines indicate mean values.

Virulence studies (Fig. 1) did not reveal significant differences in mortality rates between the isolates ($P = 0.054$). Fungi were present in all organs tested, and important differences were shown in the fungal loads of the different organs within and between both strains.

Treatment studies. Mice were challenged with 2×10^5 CFU of strain CBS 117236 or 1×10^6 CFU of strain CBS 269.37. Both inocula were chosen from previous studies and were able to produce acute infections, with all animals dying within 15 days postinfection. The drugs assayed were AMB (Fungizone), PSC (Noxafil), and ITZ (Canadiol). Their efficacy was evaluated by prolongation of survival and reduction of fungal load in kidneys, lungs, spleens, and brains. The procedures were performed as indicated above. The different groups (20 mice) were treated as follows: AMB at 1.5 mg/kg i.p. once daily; PSC at 10, 20, or 40 mg/kg orally once daily; and ITZ at 25 mg/kg orally twice daily. Control animals received no treatment. All treatments began 1 day after challenge, and the therapy lasted for 7 days. An additional group of 5 mice were similarly infected with strain CBS 269.37 and treated with the same doses used in the treatment study. These mice were used to determine, by bioassay, the level of each drug in serum and brain (1, 2, 4), 4 h after the last dosing on day 6 of therapy.

PSC at 20 mg/kg and 40 mg/kg significantly prolonged survival with respect to the control group and to the other therapies, although the lower dose prolonged survival only in mice infected by strain CBS 117236 (Fig. 2).

PSC showed a dose response efficacy in fungal load reduc-

tion (Fig. 3 and 4). PSC at 40 mg/kg was the most effective drug in reducing the fungal recovery in kidney for both strains and in lung for strain CBS 269.37 with respect to the other therapies. For strain CBS 117236, PSC at 10 or 20 mg/kg of body weight also improved fungal load in kidney and lung with respect to ITZ and AMB. All doses of PSC reduced significantly the fungal load in brain in both strains.

AMB only prolonged the survival of mice infected with strain CBS 269.37, and ITZ was not able to prolong the survival of mice in any case. The ability of AMB and ITZ to reduce tissue burden was considerably lower than that of PSC.

At day 6 of treatment, for all treatments administered, antifungal levels in serum and brain were above the corresponding MICs. PSC levels increased with dose escalation (Table 1).

TABLE 1. Drug levels in serum and brain tissue measured by bioassay on day 6 of therapy and 4 h after last dosing

Drug	Mean \pm SD drug level in:	
	Serum ($\mu\text{g/ml}$)	Brain ($\mu\text{g/g}$)
PSC		
10 mg/kg	5.17 \pm 0.99	2.02 \pm 0.19
20 mg/kg	6.35 \pm 0.97	2.84 \pm 0.74
40 mg/kg	9.72 \pm 0.57	6.73 \pm 0.88
ITZ (50 mg/kg)	7.32 \pm 3.44	6.88 \pm 1.52
AMB (1.5 mg/kg)	6.45 \pm 0.54	5.71 \pm 0.43

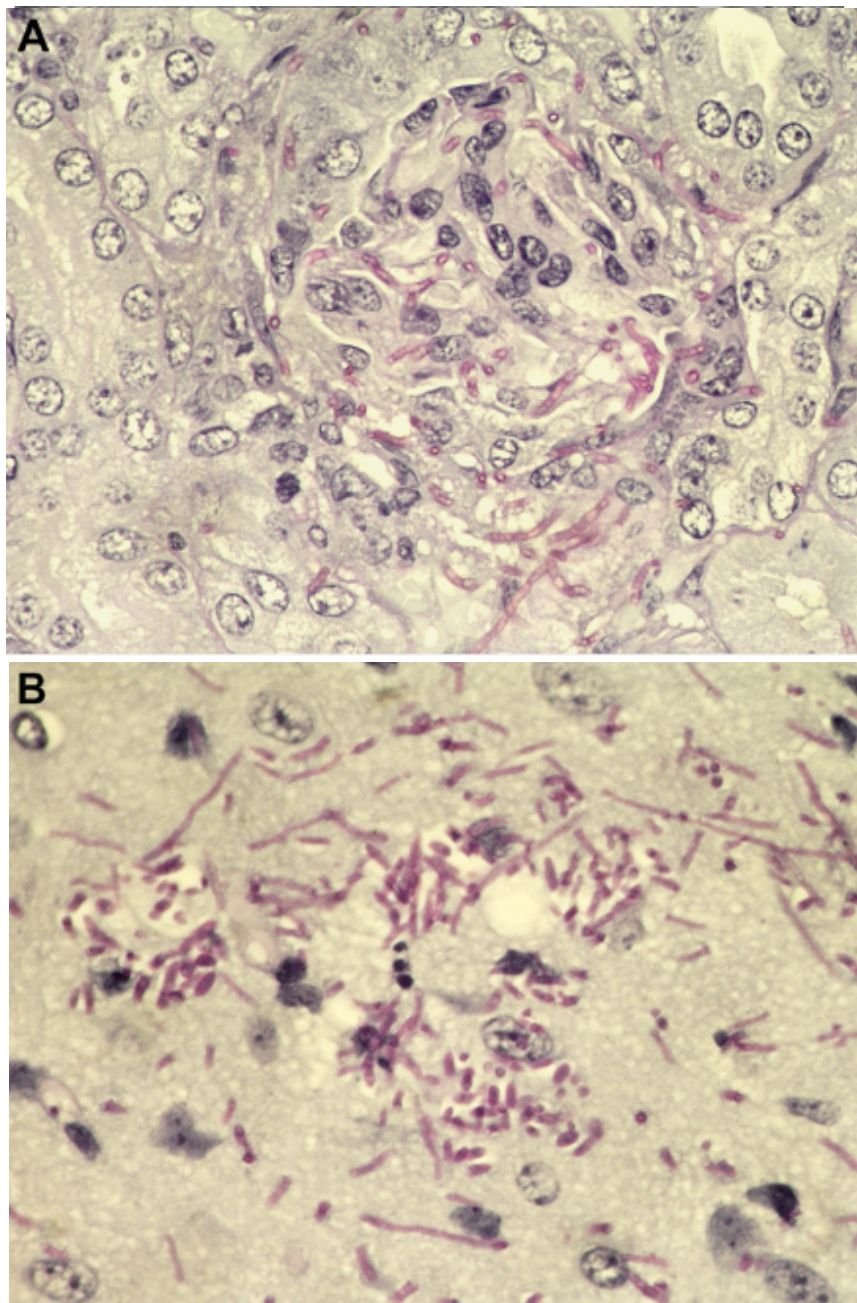


FIG. 5. (A) Kidney section showing hyphae and conidia of *F. monophora* CBS 117236 (periodic acid Schiff; $\times 400$). (B) Lung section with hyphal invasion of *F. monophora* CBS 117236 with focal interstitial infiltration (hematoxylin-eosin; $\times 400$).

Histological studies only showed evidence of kidney and lung invasion by strain CBS 117236 (Fig. 5). Kidney sections showed glomerular and tubular invasion by hyphae. In lung, this isolate caused focal interstitial infiltration. None of the organs showed any inflammatory response.

In this study, PSC was the most effective drug at prolonging mouse survival and showed a dose-dependent efficacy in reducing tissue burden. These results correlated with drug levels in serum and brain obtained by bioassay. Although there is little clinical data on the use of these drugs in the treatment of phaeohyphomycosis (9), PSC has also shown efficacy in murine studies of

disseminated infections by other dematiaceous fungi (5, 6). ITZ has also been recommended for the treatment of such infections (10). However, in our model the results obtained with this drug were very modest and clearly inferior to those of PSC.

F. monophora has been considered a neurotropic fungus (10). In our study, both strains, including an isolate from a brain abscess, were able to affect brain, although to a lesser degree than the other organs tested. Our data demonstrate a correlation between the *in vitro* activity of PSC, the brain concentration levels, and efficacy of this drug, even at low concentrations, in brain tissue burden.

In conclusion, this work confirms PSC as an alternative to ITZ for the treatment of phaeohyphomycoses.

REFERENCES

1. **Bodet, C. A., III, J. H. Jorgensen, and D. J. Drutz.** 1985. Simplified bioassay method for measurement of flucytosine or ketoconazole. *J. Clin. Microbiol.* **22**:157–160.
2. **Christiansen, K. J., E. M. Bernard, J. W. Gold, and D. Armstrong.** 1985. Distribution and activity of amphotericin B in humans. *J. Infect. Dis.* **152**: 1037–1043.
3. **De Hoog, G. S., D. Attili-Angelis, V. A. Vicente, A. H. G. Gerrits van den Enden, and F. Queiroz-Telles.** 2004. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med. Mycol.* **42**:405–416.
4. **Fittler, A., B. Kocsis, I. Gerlinger, and L. Botz.** 2009. Optimization of bioassay method for the quantitative microbiological determination of amphotericin B. *Mycoses* doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01660.x.
5. **Graybill, J. R., L. K. Najvar, E. Johnson, R. Bocanegra, and D. Loebenberg.** 2004. Posaconazole therapy of disseminated phaeohyphomycosis in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2288–2291.
6. **Mariné, M., F. J. Pastor, and J. Guarro.** 2009. Combined antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cladophialophora bantiana*. *Med. Mycol.* **47**:45–49.
7. **Najafzadeh, M. J., C. Gueidan, H. Badali, A. H. G. Gerrits van den Ende, and L. Xi.** 2009. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med. Mycol.* **47**:17–25.
8. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard, 2nd edition. Document M38-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
9. **Negróni, R., S. H. Helou, N. Petri, A. M. Robles, A. Arechavala, and M. H. Bianchi.** 2004. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeohyphomycosis due to *Exophiala spinifera*. *Clin. Infect. Dis.* **38**:15–20.
10. **Surash, S., A. Tyagi, G. S. de Hoog, J. S. Zeng, R. C. Barton, and R. P. Hobson.** 2005. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. *Med. Mycol.* **43**:465–472.
11. **Xi, L., C. Lu, J. Sun, X. Li, H. Liu, J. Zhang, Z. Xie, and G. S. de Hoog.** 2009. Chromoblastomycosis caused by a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora*. *Med. Mycol.* **47**:77–80.
12. **Xi, L., J. Sun, C. Lu, H. Liu, Z. Xie, K. Fukushima, K. Takizawa, M. J. Najafzadeh, and G. S. de Hoog.** 2009. Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in southern China. *Med. Mycol.* **47**:27–33.
13. **Zhang, J., L. Xi, C. Lu, X. Li, T. Xie, H. Zhang, Z. Xie, and G. S. de Hoog.** 2009. Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. *Mycoses* **52**:176–181.

4.4. Comparación de la virulencia de tres especies de *Exophiala* en el ratón.

Comparative virulence of three species of *Exophiala* in mice.

Calvo E, Rodríguez MM, Mariné M, Mayayo E, Pastor FJ, Guarro J.
Medical Mycology. 2010, 48:853-857.

Comparative virulence of three species of *Exophiala* in mice

ENRIQUE CALVO, M. MAR RODRÍGUEZ, MARÇAL MARINÉ, EMILIO MAYAYO, F. JAVIER PASTOR & JOSEP GUARRO

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

The virulence of *Exophiala dermatitidis*, *E. oligosperma* and *E. xenobiotica*, three of the most common members of the genus that cause human infections, was evaluated using experimental models of disseminated infection in immunocompromised mice. *Exophiala dermatitidis*, and to a lesser extent *E. oligosperma*, were the two species causing the highest mortality, while mice infected with *E. xenobiotica* had the lowest mortality. Tissue burden and histopathology studies demonstrated the neurotropism of *E. dermatitidis*, while *E. oligosperma* and *E. xenobiotica* had a limited capacity for invading brain tissue. These models could be useful for testing new therapies against *Exophiala* infections.

Keywords Phaeohyphomycosis, *Exophiala*, animal models

Introduction

Phaeohyphomycoses are infections, most of which are cutaneous and subcutaneous, caused by melanized fungi that affect both healthy and immunosuppressed subjects [1]. Disseminated phaeohyphomycosis is a more severe infection that has been reported with increasing frequency in recent years almost exclusively in immunosuppressed patients and has a high mortality [1,2]. One of the most frequent genera involved in disseminated phaeohyphomycosis is *Exophiala*. Recent molecular studies have produced dramatic changes in the taxonomy of this genus and in the spectrum of species that cause human infections [3,4]. The species most commonly associated with phaeohyphomycosis are *E. dermatitidis*, *E. oligosperma* and *E. xenobiotica*. The latter two were recently described and separated from *Exophiala jeanselmei* [3,5]. These species are associated, at least in the USA, with different clinical manifestations, i.e., *E. dermatitidis* and *E. oligosperma* as the cause of mainly deep infections, while *E. xenobiotica* affects primarily cutaneous and subcutaneous tissues [4]. Since they have been described only recently, there is little data on the antifungal susceptibility of *E. oligosperma* and

E. xenobiotica [6], and appropriate experimental models have not been developed for testing the *in vivo* activity of antifungal drugs. In addition, it is not known if these recently described species are different in their pathogenicity from *E. dermatitidis* which has been, up to now, considered the most virulent species.

The aim of our study was to compare the virulence in murine models of clinical strains of these three species.

Materials and methods

Six clinical isolates were used in this study which included two each of the following species: *E. dermatitidis* (CBS 748.88 from sputum of a cystic fibrosis patient, Norway and FMR 10037 from a hemato-oncological patient, Argentina); *E. oligosperma* (CBS 725.88 from a tumor of the sphenoidal cavity, Germany and CBS 109807 from a case of fungemia, Brazil); and *E. xenobiotica* (CBS 117650 from an arm abscess, USA and CBS 102455 from a case of keratitis, Brazil).

On the day of infection, conidia from 10-day-old potato dextrose agar (PDA) cultures of the *E. oligosperma* and *E. xenobiotica* strains and two-day-old cultures of the *E. dermatitidis* isolates were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells and hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum concentration based on haemocytometer counts, with dilutions of the original suspensions cultured on PDA plates to confirm the haemocytometer counts.

Received 3 September 2009; Received in final revised form 21 December 2009; Accepted 26 December 2009

Correspondence: J. Guarro, 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: josep.guarro@urv.cat

© 2010 ISHAM

DOI: 10.3109/13693780903582481

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

Mice were immunosuppressed one day prior to infection by a single intraperitoneal injection of 200 mg kg⁻¹ of body weight of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk S.A., Barcelona, Spain). In addition, 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma S.A., Barcelona, Spain) at 150 mg kg⁻¹ of body weight was intravenously inoculated into the animals at the same time. Previous studies have shown that with a single administration of cyclophosphamide plus 5-fluorouracil, the peripheral blood PMN counts were < 100/μl from day 3 to day 9 or more [7,8].

Two groups of 10 mice were randomly established for each strain with one group used for survival studies and one for tissue burden and histopathological analyses. Infection was established with a conidial suspension of 2 × 10⁵ colony forming units (cfu) in 0.2 ml of sterile saline solution injected into the lateral tail vein. This inoculum level was chosen based upon previous studies with CBS 748.88 that indicated that this concentration was the minimal dose that killed all the animals infected within 15 days post-infection (data not shown). An additional group of five

non-infected mice was included as control. Survival groups were checked daily for 30 days with survivors sacrificed by carbon dioxide inhalation at the end of the experiment. Mice assigned to tissue burden groups were sacrificed on day 6 post-infection. Lungs, brains, spleens, livers and kidneys were aseptically removed and approximately half of each organ was weighed and homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were inoculated on PDA, incubated at 30°C and examined daily for 7 days. The number of cfu/g⁻¹ of tissue was calculated for each sample.

The remaining half of the organs were fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin embedded, sliced into 2 μm sections and then stained with Haematoxylin-Eosin, Periodic acid Schiff (P.A.S.) and Grocott methamine silver and examined in blinded fashion by light microscopy.

Mean survival time was estimated using the Kaplan-Meier method and compared among groups with the log rank test. Colony counts in tissue burden studies were analyzed using the Kruskal-Wallis test. When that test was significant, we used the Mann-Whitney U test to compare pairs of strains. The Bonferroni correction was used to avoid the increase in the type I error due to multiple comparisons. The observed differences were considered statistically significant at *P* < 0.05.

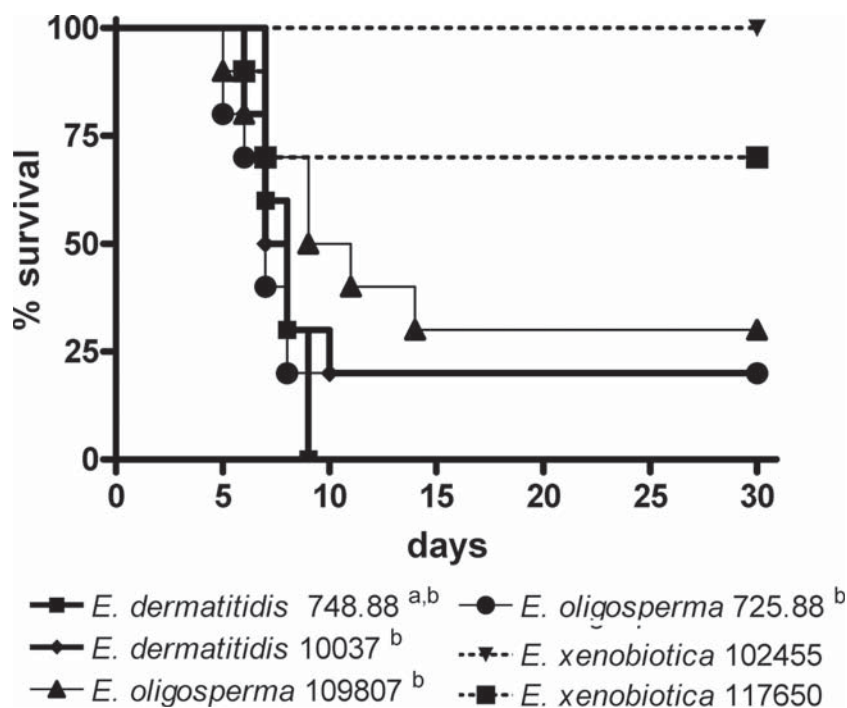


Fig. 1 Cumulative mortality of mice infected with *Exophiala* spp. ^a*P* < 0.05 versus *Exophiala oligosperma* CBS 109807; ^b*P* < 0.05 versus both strains of *Exophiala xenobiotica*.

Results

Results of the survival study are shown in Fig. 1. There were no significant differences between the two strains of each species with respect to the survival of infected mice.

E. dermatitidis strains were significantly more virulent than both isolates of *E. xenobiotica*, and *E. dermatitidis* CBS 748.88 also caused a higher rate of mortality than *E. oligosperma* CBS 109807. The two strains of *E. oligosperma*

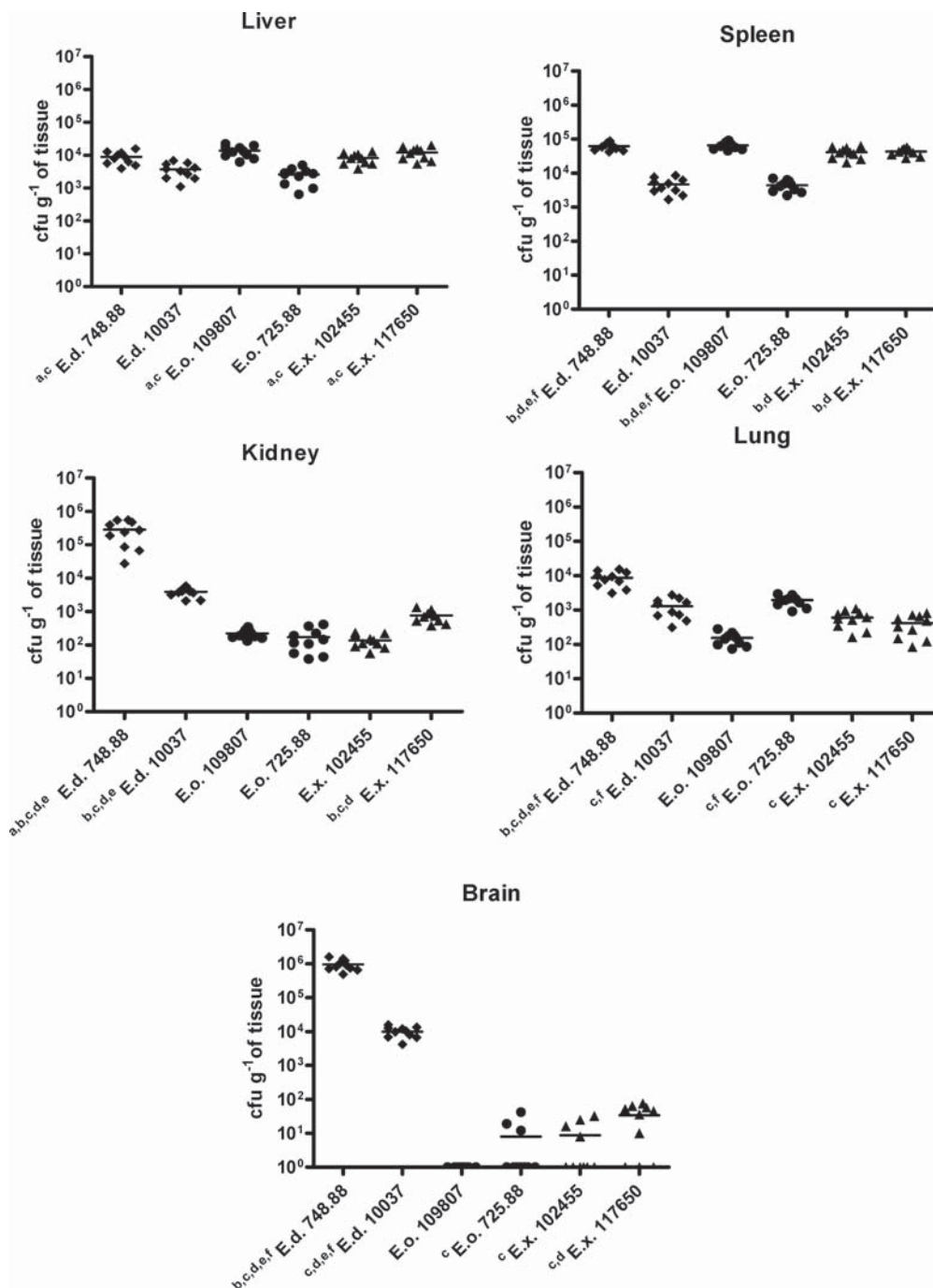


Fig. 2 Colony count comparison among different strains and species of *Exophiala* in lung, spleen, kidney, brain and liver. ^a*P* < 0.003 versus *Exophiala dermatitidis* (E.d.) FMR 10037; ^b*P* < 0.003 versus *Exophiala oligosperma* (E.o.) CBS 109807; ^c*P* < 0.003 versus *Exophiala oligosperma* CBS 725.88; ^d*P* < 0.003 versus *Exophiala xenobiotica* (E.x.) CBS 102455; ^e*P* < 0.003 versus *Exophiala xenobiotica* CBS 117650. Horizontal lines indicate mean values.

were significantly more virulent than those of *E. xenobiotica*. All mice infected with *E. dermatitidis* strain CBS 748.88 died within 9 days post-infection, while 80% of those infected with FMR 10037 died within 30 days. Mortality for the same times of animals infected with the two strains of *E. oligosperma* was 70% and 80%, respectively, and 0% and 30%, respectively, of those infected with *E. xenobiotica*. All controls survived to the end of experiment (data not shown).

Tissue burden results are shown in Fig. 2. The two strains of *E. dermatitidis* showed remarkable differences, i.e., the fungal load found in all organs of mice infected with CBS 748.88 being significantly higher than that of FMR 10037. Despite these differences, fungal burden in brain and kidney of mice infected with both *E. dermatitidis* isolates was significantly higher than that of mice inoculated with the other species. Significant differences in the fungal load in the lung, spleen and liver were noted between the *E. oligosperma* isolates, but brain tissue was little affected by both strains. No significant differences were found in fungal recovery from the organs of mice infected with the two strains of *E. xenobiotica*, with the exception of kidney. As occurred with *E. oligosperma*, brain was little affected in mice infected with *E. xenobiotica*.

Histological studies revealed tissue changes only in kidney and brain of mice infected with *E. dermatitidis* CBS 748.88 (Fig. 3). Kidneys showed parenchyma destruction and little inflammatory response with lymphocytic infiltration, while brains had higher diffuse invasion with dispersed fungal cells and edema but no signs of necrosis or infiltration of inflammatory cells. On the contrary, we did not observe significant inflammatory changes or presence of fungal cells in the rest of the organs included in the present study.

Discussion

In the present study we developed a murine model of disseminated infection to compare the virulence of three common *Exophiala* species. Several experimental investigations with melanin-deficient mutants of *E. dermatitidis* have demonstrated a correlation between the presence of this pigment and the virulence of this species in mice [9,10]. However, to our knowledge, this is the first study that has explored the virulence of *E. oligosperma* and *E. xenobiotica* in mice.

Exophiala dermatitidis has been associated with cases of fungemia [11] and brain abscesses [12–14]. In our murine model *E. dermatitidis* caused a high mortality and marked cerebral invasion, which was confirmed by histopathology (Fig. 3). Our results agree with other murine experimental studies in which this fungus was shown to have a high virulence and neurotropism [9,10,15].

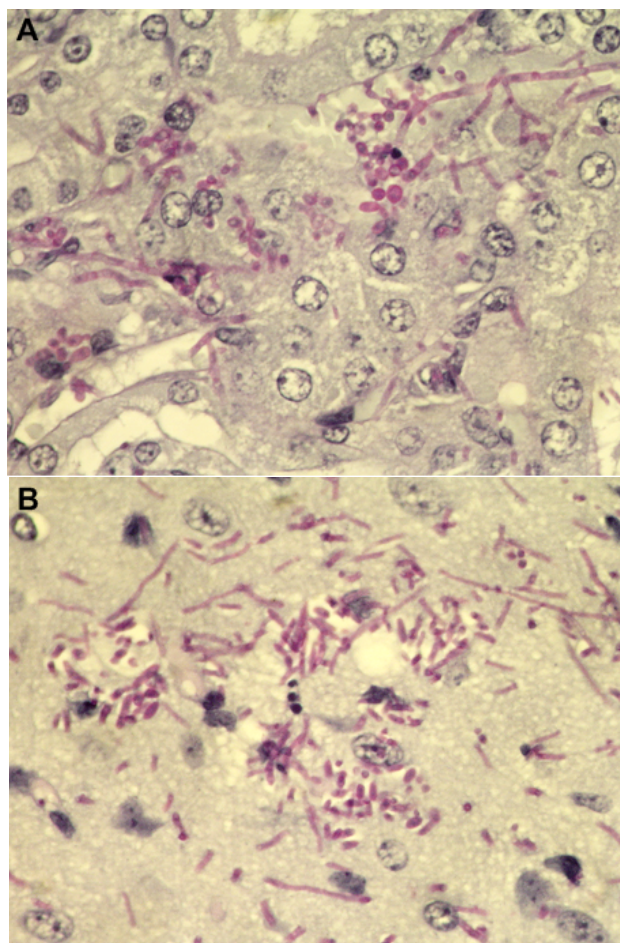


Fig. 3 (A) Transversal kidney section, showing hyphae and conidia of *Exophiala dermatitidis* CBS 748.88. (P.A.S. $\times 400$). (B) Transversal brain section showing hyphae and conidia of *Exophiala dermatitidis* CBS 748.88. (P.A.S. $\times 400$).

Exophiala oligosperma has also been involved, although with a lower incidence than *E. dermatitidis*, with fungemia [4,16], cutaneous [4], subcutaneous [4,17], and deep infections in humans [18]. However, it is difficult to assess the real clinical incidence of *E. oligosperma* infections due to its recent description and the fact that previous cases were probably attributed to *E. jeanselmei*. In our study, *E. oligosperma*, and especially the strain CBS 752.88, caused a similar mortality in mice to that generated by *E. dermatitidis*. This strain had been isolated from the only described case of central nervous system infection caused by *E. oligosperma* [5,19]. In our model, infection with this strain caused high mortality in mice, but was not associated with massive brain colonization, as generally occurs in *E. dermatitidis* infections. *Exophiala dermatitidis* and *E. oligosperma* have also been reported to cause lung infections [4]. In our study, intravenous infection with these species, especially *E. dermatitidis* CBS 748.88 and

E. oligosperma CBS 725.88, were found to have a high ability to affect lung tissue.

Cutaneous and subcutaneous infections seem to be the most common clinical manifestation of *E. xenobiotica* in humans [4,20], although one case of disseminated infection produced by this species has also been reported [4]. In our model this species was able to cause systemic infection as it was recovered from all the organs tested, but mortality in the experimental animals was significantly lower in comparison to the other species.

Although all strains tested were isolated from all organs, the histopathological study revealed tissue damage only in organs of mice infected with the most virulent strain, *E. dermatitidis* (CBS 748.88) and that also had high fungal loads. Tissue damage was not found in the other organs tested, probably due to the fact that the organs were extracted before the production of visible tissue lesions. In the case of *E. xenobiotica*, which caused a low mortality in the animals, it is possible that this species did not involve any type of alteration in tissue.

In conclusion, our results suggest a higher virulence of *E. dermatitidis*, being the species that produced the highest fungal load in brain. However, the high mortality showed by *E. oligosperma* indicates that this recently described species warrants further studies to assess its real pathogenicity.

Declaration of interest: No conflict of interest.

References

- 1 Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, Pullen R, Rinaldi MG. Disseminated phaeohiphomycosis: review of an emerging mycosis. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 467–476.
- 2 Li DM, Li RY, de Hoog GS, Wang YX, Wang DL. *Exophiala asiatica*, a new species from a fatal case in China. *Med Mycol* 2009; **47**: 101–109.
- 3 De Hoog GS, Vicente V, Caligiorne RB, et al. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4767–4778.
- 4 Zeng JS, Sutton DA, Fothergill AW, et al. Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 3713–3720.
- 5 De Hoog GS, Zeng JS, Harrak MJ, Sutton DA. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., and opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek* 2006; **90**: 257–268.
- 6 Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol* 2009; **47**: 41–43.
- 7 Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D, Luther MF. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2467–2473.
- 8 Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Guarro J. Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **50**: 247–251.
- 9 Dixon DM, Polak A, Szaniszló PJ. Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin deficient *Wangiella dermatitidis*. *J Med Vet Mycol* 1987; **25**: 97–106.
- 10 Dixon DM, Polak A, Conner GW. Mel-mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: evaluation of multiple mouse and fungal strains. *J Med Vet Mycol* 1989; **27**: 335–341.
- 11 Nachman S, Alpan O, Malowitz R, Spitzer ED. Catheter-associated fungemia due to *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 1011–1013.
- 12 Matsumoto T, Matsuda T, McGinnis MR, Ajello L. Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections. *Mycoses* 1993; **36**: 145–155.
- 13 Horré R, de Hoog GS. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Stud Mycol* 1999; **43**: 176–193.
- 14 Chang CL, Kim DS, Park DJ, et al. Acute cerebral phaeohiphomycosis due to *Wangiella dermatitidis* accompanied by cerebrospinal fluid eosinophilia. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1965–1966.
- 15 Graybill JR, Najvar LK, Johnson E, Bocanegra R, Loebenberg D. Posaconazole therapy of disseminated phaeohiphomycosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2288–2291.
- 16 Al-Obaid I, Ahmad S, Khan ZU, Dinesh B, Hejab HM. Catheter-associated fungemia due to *Exophiala oligosperma* in a leukemic child and review of fungemia cases caused by *Exophiala* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; **29**: 729–732.
- 17 González-López MA, Salesa R, González-Vela MC, Fernández-Llaca H, et al. Subcutaneous phaeohiphomycosis caused by *Exophiala oligosperma* in a renal transplant recipient. *Br J Dermatol* 2007; **156**: 762–764.
- 18 Bossler AD, Richter SS, Chavez AJ, et al. *Exophiala oligosperma* causing olecranon bursitis. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4779–4782.
- 19 Tintelnot K, de Hoog GS, Thomas E, et al. Cerebral phaeohiphomycosis caused by an *Exophiala* species. *Mycoses* 1991; **34**: 239–244.
- 20 Aoyama Y, Nomura M, Yamanaka S, Ogawa Y, Kitajima Y. Subcutaneous phaeohiphomycosis caused by *Exophiala xenobiotica* in a non-Hodgkin lymphoma patient. *Med Mycol* 2009; **47**: 95–99.

This paper was first published online on Early Online on 9 February 2010.

4.5. Terapias antifúngicas en feohifomicosis diseminadas causadas por especies de *Exophiala* en el ratón.

**Antifungal therapies in murine disseminated
phaeohyphomycoses caused by *Exophiala* species.**

Calvo E, Pastor FJ, Guarro J.

Journal of Antimicrobial Agents. 2010, 48:853-857.

Antifungal therapies in murine disseminated phaeohyphomycoses caused by *Exophiala* species

Enrique Calvo, F. Javier Pastor and Josep Guarro*

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

*Corresponding author. Tel: +34-977759359; Fax: +34-977759322; E-mail: josep.guarro@urv.cat

Received 23 February 2010; returned 18 March 2010; revised 23 April 2010; accepted 26 April 2010

Objectives: We have evaluated the efficacy of posaconazole, itraconazole and amphotericin B in murine models of disseminated infection caused by *Exophiala* spp.

Methods: Immunosuppressed mice were treated with posaconazole at 10, 20 or 40 mg/kg/day orally (po), amphotericin B at 1.5 mg/kg/day intraperitoneally (ip) or itraconazole at 50 mg/kg/day po. Treatment began 1 day after infection and continued for 7 days post-infection. Two strains of each of the three most relevant clinical species, i.e. *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala oligosperma* and *Exophiala xenobiotica*, were tested.

Results: Posaconazole showed the highest efficacy in mice infected with *E. dermatitidis*, the only species that showed a high neurotropism, while the three drugs showed a similarly good activity against *E. oligosperma* and *E. xenobiotica* infections.

Conclusions: The results suggest that posaconazole may have a clinical role in the treatment of disseminated infections caused by *Exophiala* species, especially in those with CNS invasion.

Keywords: posaconazole, itraconazole, amphotericin B, animal models

Introduction

The genus *Exophiala* comprises dematiaceous fungi widely distributed in nature.¹ In recent years, the incidence of these fungi has increased as a cause of human phaeohyphomycoses.¹ They are usually chronic infections, mainly involving cutaneous and subcutaneous tissues, but disseminated infections, especially in immunosuppressed patients, have also been described.^{2–4} The main pathogenic species of *Exophiala* is *Exophiala dermatitidis*, which presents marked neurotropism, causing severe or lethal infections. However, recently described species such as *Exophiala oligosperma* and *Exophiala xenobiotica* have also been reported as agents of systemic phaeohyphomycosis.⁴ The treatment of choice for these rare infections has not yet been established, since current antifungal drugs show poor efficacy or toxicity after long periods of administration, making it necessary to investigate more appropriate therapies. Amphotericin B, alone or in combination with flucytosine, or triazoles, such as voriconazole and itraconazole, have been used, but without completely satisfactory results.⁴ Itraconazole has shown efficacy on some occasions, but its use is limited by its variable gastrointestinal absorption and alterations in cardiac conductivity.⁵

We have evaluated the efficacy of posaconazole, itraconazole and amphotericin B in murine infections caused by each of the three most common *Exophiala* species related to human

systemic disease, i.e. *E. dermatitidis*, *E. oligosperma* and *E. xenobiotica*, using previously developed models of disseminated infection.⁶

Materials and methods

Six clinical isolates were used in this study, two isolates corresponding to each of the following species: *E. dermatitidis* (CBS 748.88 from the sputum of a cystic fibrosis patient, Norway; and FMR 10037 from a haemato-oncological patient, Argentina); *E. oligosperma* (CBS 725.88 from a tumour of the sphenoidal cavity, Germany; and CBS 109807 from a case of fungaemia, Brazil); and *E. xenobiotica* (CBS 117650 from an arm abscess, USA; and CBS 102455 from a keratitis case, Brazil). Their *in vitro* antifungal susceptibility to amphotericin B, itraconazole and posaconazole was tested by using a broth microdilution method following the CLSI guidelines for filamentous fungi.⁷

For the *in vivo* study, male OF1 mice (Charles River; Criffa SA, Barcelona, Spain) with a mean weight of 30 g were used. The animals were housed in standard boxes with corncob bedding and had free access to food and water. All animal procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee.

Mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal (ip) injection of 200 mg/kg cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk SA, Barcelona, Spain) plus 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma SA, Barcelona, Spain) at 150 mg/kg intravenously 1 day prior to the infection.

In order to prevent bacterial infections, all mice received 5 mg/day ceftazidime subcutaneously from days 1 to 7 after infection.

On the day of infection, 10 day cultures on potato dextrose agar (PDA) of the *E. oligosperma* and *E. xenobiotica* strains and 2 day cultures of the *E. dermatitidis* strains were suspended in sterile normal saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells or hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on the haemocytometer counts. Dilutions of the original suspension were cultured on PDA plates to confirm the haemocytometer count.

For each strain and each treatment, groups of 20 mice were established and challenged with a conidial suspension of 2×10^5 cfu of *E. dermatitidis* strains, 1.2×10^6 cfu of *E. oligosperma* strains or 1.6×10^6 cfu of *E. xenobiotica* strains in 0.2 mL of sterile normal saline into the lateral tail vein. Previous studies performed with each one of the six strains tested demonstrated that these inocula produced an acute infection, with all the animals dying within 15 days (data not shown).

The drugs assayed were: amphotericin B (Fungizone; Squibb Industrial Farmacéutica SA, Barcelona, Spain), posaconazole (Noxafil; Schering-Plough Ltd, Welwyn Garden City, UK) and itraconazole (Canadiol; Laboratorios Dr. Esteve S.A., Barcelona, Spain), administered as follows: amphotericin B given at doses of 1.5 mg/kg ip once daily; posaconazole given at doses of 10, 20 or 40 mg/kg orally once daily; and itraconazole given at doses of 25 mg/kg orally twice daily. Control animals received no treatment. All treatments began 1 day after challenge and the therapy lasted for 7 days. The efficacy of the different drugs was evaluated through prolongation of survival and reduction of fungal tissue burden.

Ten mice of each group were randomly assigned to the survival study and checked daily for 30 days. At the end of the experiment, survivors were sacrificed by carbon dioxide inhalation. For tissue burden studies, 10 mice of each group identified before the study started were sacrificed on day 6 post-infection. Kidneys, brain and spleen were aseptically removed and homogenized in 1 mL of sterile normal saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA, incubated at 30°C and examined daily for 7 days. The numbers of cfu/g of tissue were calculated.

Mean survival time was estimated by the Kaplan–Meier method and compared between groups by using the log rank test. Colony counts in tissue burden studies were analysed using the Kruskal–Wallis test. When the Kruskal–Wallis test was significant, we used the Mann–Whitney *U*-test to compare pairs of strains. The Bonferroni correction was used to avoid an increase in type I error due to multiple comparisons. When $P < 0.05$, the observed differences were considered statistically significant.

Results

The three drugs tested showed low MICs for all the isolates tested in this study (Table 1). All treatments, with a few exceptions, significantly prolonged survival with respect to the control group (Figure 1). Posaconazole at 40 mg/kg performed significantly better than amphotericin B for both *E. dermatitidis* strains, and significantly better than itraconazole in mice infected with the strain FMR 10037.

Table 2 shows the results of the fungal load study. In mice infected with *E. dermatitidis* strains, in general all the treatments significantly reduced the fungal load in the three organs analysed. In brain, posaconazole at 20 and 40 mg/kg performed better than the other two drugs against the two strains tested. In mice infected with *E. oligosperma*, posaconazole at 20 mg/kg and at 40 mg/kg and amphotericin B were able to significantly reduce the fungal load in spleens of mice infected with both

Table 1. *In vitro* activity of amphotericin B, posaconazole and itraconazole against three species of *Exophiala*

Species	Strain	MIC (mg/L)		
		AMB	ITC	PSC
<i>E. dermatitidis</i>	CBS 478.88	1	0.25	0.5
	FMR 10037	0.5	0.5	0.25
<i>E. oligosperma</i>	CBS 725.88	0.5	0.5	0.12
	CBS 109807	0.5	0.5	0.12
<i>E. xenobiotica</i>	CBS 117650	0.25	0.5	0.25
	CBS 102455	0.25	0.5	0.12

AMB, amphotericin B; PSC, posaconazole; ITC, itraconazole.

strains. In such tissue, posaconazole at 40 mg/kg for the strain CBS 109807 and amphotericin B for both *E. oligosperma* strains also significantly reduced the fungal burden with respect to itraconazole. In kidneys, only amphotericin B was unable to reduce the tissue burden. Although the fungal load in brain tissue was generally very low, it could be reduced significantly by posaconazole at 40 mg/kg.

In the case of *E. xenobiotica*, only amphotericin B showed efficacy against strain CBS 117650 in spleen. All other treatments were effective apart from posaconazole at 10 mg/kg against one strain in spleen, and itraconazole and amphotericin B against one strain each in kidneys. On several occasions, posaconazole was able to further improve the results that had been obtained with the other drugs.

In summary, posaconazole was the best drug for reducing the fungal burden in kidneys for the three species tested, and in brains of mice infected with *E. dermatitidis* strains. Amphotericin B showed better efficacy in reducing the fungal load in spleen tissue, especially in comparison with itraconazole.

Discussion

Disseminated phaeohyphomycosis is a severe but relatively rare infection with poor response to antifungal drugs.³ In the clinical setting, posaconazole has shown encouraging results since it was successfully used in a case of disseminated phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera*.² Despite these promising results, clinical experience with posaconazole in this kind of infection is still limited, and animal models can be helpful in predicting its efficacy against rare or poorly known dematiaceous fungi. In the case of *Exophiala* spp., few data are available about the experimental activity of posaconazole, although *in vitro* studies have demonstrated good activity of this drug against clinical isolates of these species.^{4,8} Additionally, posaconazole was effective in a murine systemic infection caused by *E. dermatitidis*,⁹ suggesting that it could be a therapeutic option in the treatment of systemic phaeohyphomycosis. In general, our results agree with the mentioned *in vitro* and *in vivo* studies.

In our murine model, posaconazole showed better results than itraconazole and amphotericin B in prolonging the survival of animals infected with *E. dermatitidis* strains, the only species

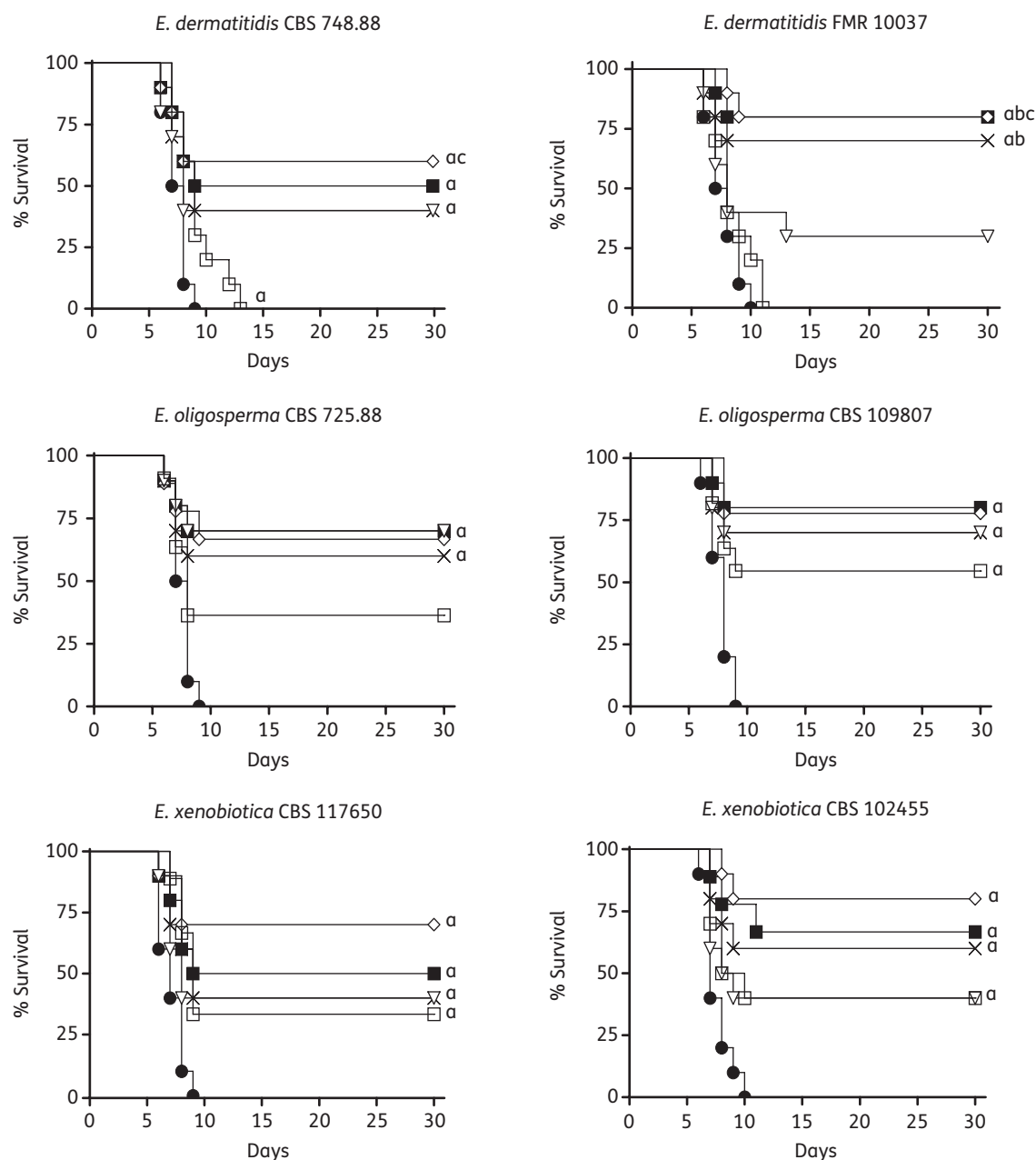


Figure 1. Cumulative mortality of mice infected with various *Exophiala* strains and species. Filled circles, control; crosses, posaconazole at 10 mg/kg; filled squares, posaconazole at 20 mg/kg; open diamonds, posaconazole at 40 mg/kg; open triangles, itraconazole at 50 mg/kg; open squares, amphotericin B at 1.5 mg/kg. ^a $P < 0.05$ versus control. ^b $P < 0.05$ versus itraconazole at 50 mg/kg. ^c $P < 0.05$ versus amphotericin B at 1.5 mg/kg.

that showed clear neurotropic behaviour. On the other hand, the limited fungal invasion in brains of mice infected with *E. oligosperma* and *E. xenobiotica* makes it difficult to detect significant differences between therapies. These good posaconazole results were also observed in a previous study in which we obtained similar results when administering the same drugs and doses against a murine infection caused by *Fonsecaea monophora*, a dematiaceous fungus causing subcutaneous infections.¹⁰

To our knowledge, this is the first study that has explored the *in vivo* efficacy of antifungal therapy against the novel species *E. oligosperma* and *E. xenobiotica* in experimental infections. Both species seem to have lower virulence than *E. dermatitidis*,⁶ infecting mainly cutaneous and subcutaneous tissues. However, the real incidence of such species in disseminated phaeohyphomycosis could be underestimated due to their so recent description.⁴ In our study, all the drugs tested were effective against the systemic infections provoked by these species.

Table 2. Effects of the antifungal treatments on colony counts of three species of *Exophiala* in spleen, kidneys and brain of mice

Isolate	Drug dose in mg/kg/day	Mean log ₁₀ cfu/g of (95% CI)		
		spleen	kidneys	brain
<i>E. dermatitidis</i>				
CBS 748.88	none	4.80 (4.72–4.86)	4.34 (4.10–4.49)	5.45 (5.27–5.58)
	PSC (10)	4.09 (3.93–4.21) ^a	3.08 (2.92–3.20) ^a	3.69 (3.54–3.79) ^a
	PSC (20)	4.25 (4.13–4.34) ^a	2.88 (2.78–2.96) ^a	3.53 (3.24–3.71) ^{a,b,c}
	PSC (40)	4.03 (3.87–4.14) ^a	2.64 (2.54–2.71) ^{a,c,d,e}	3.43 (3.17–3.58) ^{a,b,c}
	ITC (50)	4.01 (3.91–4.09) ^a	2.77 (2.63–2.87) ^{a,d}	4.36 (3.98–4.56) ^a
	AMB (1.5)	3.84 (3.68–3.95) ^{a,e}	2.88 (2.77–2.97) ^a	4.20 (3.92–4.38) ^a
FMR 10037	none	4.38 (4.24–4.49)	4.00 (3.94–4.06)	4.70 (4.60–4.49)
	PSC (10)	4.04 (3.91–4.13) ^{a,b}	3.33 (3.22–3.41) ^{a,b,c}	4.32 (4.21–4.40) ^a
	PSC (20)	4.11 (3.92–4.24) ^a	3.37 (3.29–3.44) ^{a,b,c}	3.92 (3.84–3.98) ^{a,b,c,d}
	PSC (40)	4.00 (3.83–4.12) ^{a,b}	2.85 (2.56–3.02) ^{a,b,c,d,e}	3.86 (3.79–3.91) ^{a,b,c,d}
	ITC (50)	4.24 (4.15–4.32)	3.73 (3.62–3.82) ^a	4.28 (4.18–4.36) ^a
	AMB (1.5)	3.84 (3.69–3.95) ^{a,b}	3.61 (3.52–3.69) ^a	4.20 (4.09–4.28) ^a
<i>E. oligosperma</i>				
CBS 725.88	none	4.73 (4.55–4.86)	3.54 (3.34–3.68)	2.16 (2.05–2.27)
	PSC (10)	4.49 (4.31–4.61)	2.96 (2.78–3.09) ^{a,c}	2.02 (1.88–2.15)
	PSC (20)	4.34 (4.17–4.46) ^a	2.83 (2.65–2.96) ^{a,c}	1.97 (1.77–2.17)
	PSC (40)	4.22 (4.05–4.34) ^a	2.61 (2.28–2.80) ^{a,c,d}	1.94 (1.79–2.09)
	ITC (50)	4.46 (4.32–4.57)	2.96 (2.76–3.10) ^{a,c}	2.13 (2.03–2.24)
	AMB (1.5)	4.19 (3.96–4.34) ^{a,b}	3.34 (3.13–3.48)	2.17 (2.04–2.97)
CBS 109807	none	5.72 (5.62–5.80)	3.43 (3.31–3.52)	2.22 (1.98–2.38)
	PSC (10)	5.34 (5.19–5.45) ^a	2.83 (2.68–2.94) ^{a,c}	1.99 (1.75–2.14)
	PSC (20)	5.32 (5.20–5.42) ^a	2.82 (2.67–2.93) ^{a,c}	2.00 (1.81–2.12)
	PSC (40)	5.16 (5.01–5.27) ^{a,b}	2.65 (2.26–2.86) ^{a,b,c}	1.82 (1.64–1.95) ^a
	ITC (50)	5.43 (5.31–5.53) ^a	3.01 (2.87–3.11) ^{a,c}	2.10 (1.94–2.22)
	AMB (1.5)	5.11 (4.85–5.27) ^{a,b}	3.26 (3.16–3.35)	2.08 (1.90–2.21)
<i>E. xenobiotica</i>				
CBS 117650	none	5.90 (5.72–6.04)	3.20 (2.96–3.35)	2.03 (1.81–2.07)
	PSC (10)	5.90 (5.64–6.06)	1.34 (0.11–1.65) ^{a,b}	1.42 (0.23–1.71) ^a
	PSC (20)	5.68 (5.49–5.81)	ND ^{a,b,c}	1.33 (0.16–1.65) ^a
	PSC (40)	5.55 (5.29–5.72)	ND ^{a,b,c}	1.39 (0.50–1.66) ^a
	ITC (50)	5.61 (5.36–5.77)	2.93 (2.69–3.08)	1.16 (1.10–1.49) ^a
	AMB (1.5)	5.15 (4.78–5.35) ^{a,d,e}	2.12 (0.29–2.45) ^{a,b}	1.03 (0.10–1.35) ^a
CBS 102455	none	5.61 (5.45–5.73)	2.99 (2.83–3.11)	1.98 (1.68–2.16)
	PSC (10)	5.26 (4.93–5.44)	2.22 (1.79–2.43) ^{a,c}	1.64 (1.28–1.83) ^a
	PSC (20)	5.23 (4.85–5.43) ^a	0.94 (0.10–1.28) ^{a,b,c,d}	1.10 (0.20–1.46) ^a
	PSC (40)	5.09 (4.70–5.29) ^a	ND ^{a,b,c,d}	0.75 (0.11–1.12) ^a
	ITC (50)	5.11 (4.91–5.25) ^a	2.07 (1.55–2.30) ^{a,c}	0.84 (0.16–1.21) ^a
	AMB (1.5)	4.61 (4.38–4.76) ^{a,b,d,e}	2.84 (2.64–2.98)	ND ^a

AMB, amphotericin B; PSC, posaconazole; ITC, itraconazole; ND, not detected.

^a*P* < 0.003 versus control.

^b*P* < 0.003 versus 50 mg/kg ITC.

^c*P* < 0.003 versus 1.5 mg/kg AMB.

^d*P* < 0.003 versus 10 mg/kg PSC.

^e*P* < 0.003 versus 20 mg/kg PSC.

In conclusion, our results confirm previous studies that suggest posaconazole as an alternative in the treatment of invasive infections caused by melanized fungi, especially in those with CNS involvement. But in general, all the antifungal

therapies tested showed good efficacy in the treatment of the systemic murine infections caused by *Exophiala*, including the recently described species *E. oligosperma* and *E. xenobiotica*.

Funding

No specific funding.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Horré R, de Hoog GS. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Stud Mycol* 1999; **43**: 176–93.
- 2 Negrón R, Helou SH, Petri N *et al*. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeohyphomycosis due to *Exophiala spinifera*. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 15–20.
- 3 Revankar SG. Phaeohyphomycosis. *Infect Clin Dis North Am* 2006; **20**: 609–20.
- 4 Zeng JS, Sutton DA, Fothergill AW *et al*. Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 3713–20.
- 5 Okamoto J, Fukunami M, Kioka H. Frequent premature ventricular contractions induced by itraconazole. *Circ J* 2007; **71**: 1323–5.
- 6 Calvo E, Rodríguez MM, Mariné M *et al*. Comparative virulence of three species of *Exophiala* in mice. *Med Mycol* 2010; doi:10.3109/13693780903582481.
- 7 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi—Second Edition: Approved Standard M38-A2*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 8 Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol* 2009; **47**: 41–3.
- 9 Graybill JR, Najvar LK, Johnson E *et al*. Posaconazole therapy of disseminated phaeohyphomycosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2288–91.
- 10 Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM *et al*. Murine model of a disseminated infection by the novel fungus *Fonsecaea monophora* and successful treatment with posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 919–23.

4.6. Actividad *in vitro* y eficacia *in vivo* de la anidulafungina en infecciones murinas por *Aspergillus flavus*.

***In vitro* activity and *in vivo* efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*.**

Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Salas V, Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011, 55:1290-1292.

In Vitro Activity and *In Vivo* Efficacy of Anidulafungin in Murine Infections by *Aspergillus flavus*[∇]

Enrique Calvo, F. Javier Pastor, Emilio Mayayo, Valentina Salas, and Josep Guarro*

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

Received 20 September 2010/Returned for modification 7 November 2010/Accepted 5 December 2010

Anidulafungin (AFG) showed high activity against 27 strains of *Aspergillus flavus* by use of broth microdilution and disk diffusion methods. This drug was effective *in vivo* in a murine model of disseminated infection with five isolates tested. AFG was able to prolong survival and reduce tissue burden of infected mice but not able to reduce galactomannan serum concentrations. The AFG serum levels were above the corresponding minimum effective concentrations (MEC) for all of the strains tested.

Aspergillus flavus is the second most important agent of invasive aspergillosis (IA) after *Aspergillus fumigatus* (9) and is considered more virulent and resistant to antifungal drugs than other *Aspergillus* species (6). Voriconazole is the recommended drug for primary treatment of IA, with lipid formulations of amphotericin B and echinocandins being alternative therapies when voriconazole fails (8, 18). Anidulafungin (AFG) shows *in vitro* and *in vivo* activities against *Aspergillus* similar to those of the other echinocandins (16) but seems to have a wider range of action, a lower toxicity, and fewer drug interactions (2). Nevertheless, AFG has been evaluated *in vivo* only against *A. fumigatus* experimental infections (11, 12, 17), and little is known about its *in vivo* efficacy against other *Aspergillus* species.

We have tested the *in vitro* activities of AFG against 27 *A. flavus* strains from different origins by using two different methods, microdilution (3) and disk diffusion methods, determining the minimum effective concentrations (MEC) (5) and the inhibition zone diameters (IZD), respectively, in order to determine if there were any significant differences among both techniques.

Disk diffusion was carried out using nonsupplemented Mueller-Hinton agar and 6-mm-diameter paper disks containing 5 µg of AFG (4).

For the *in vivo* studies, we chose five isolates. Male OF1 mice were immunosuppressed (13) and used following the procedural standards approved by the Animal Welfare and Ethics Committee of Rovira i Virgili University. Mice were challenged intravenously with a conidial suspension of 1×10^4 CFU in 0.2 ml of saline. AFG was administered at 1, 5, or 10 mg/kg of body weight intraperitoneally once a day. These doses were selected based on previous experimental studies of aspergillosis by *A. fumigatus* (11, 12, 16). All treatments began 24 h after challenge and lasted for 7 days. Groups of 10 animals were established. Control animals received no treatment. For survival studies, mice were checked daily for 30 days. For tissue burden studies, animals were sacrificed on day 5 after infec-

tion. Kidneys and spleens were aseptically removed and homogenized in 1 ml sterile saline. Serial dilutions were plated on potato dextrose agar and incubated for 24 h at 35°C.

Mean survival times were estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups using the log rank test. Colony counts in tissue burden studies were analyzed by the Mann-Whitney U test. A *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

In addition, groups of 5 immunosuppressed mice were challenged with the strain FMR 10084 to determine galactomannan serum levels by enzyme immunoassay (Platelia *Aspergillus*) on the last day of therapy, as a marker of the treatment response.

Additional groups of 5 mice were similarly infected with strain FMR 10084 and treated with the same doses described above to determine levels of AFG in serum by bioassay. Drug standards were prepared in methyl alcohol and placed in wells of 4 mm in diameter in yeast nitrogen base agar. *Candida albicans* ATCC 90028 was the test organism. To calculate serum drug concentrations, diameters of growth inhibition for serum from treated mice, 4 h after the last dosing on day 5 of therapy, were compared to the standard straight line.

Both MEC (≤ 0.06 µg/ml) and IZD (22 to 35 mm) values suggested a good *in vitro* activity of AFG against *A. flavus*.

All of the AFG doses significantly prolonged survival for all strains tested, with the exception of AFG at 1 mg/kg for two strains. For two strains, AFG at 10 mg/kg significantly improved the results obtained with AFG at 1 mg/kg. In any case, there were no significant differences between the doses of AFG at 5 and 10 mg/kg (Fig. 1).

In spleen and kidney, all of the AFG doses significantly reduced the fungal load with respect to that for the control group, with the exception of the lowest dose against one strain in each organ. In both organs and with a few exceptions, AFG showed a dose-dependent response (Table 1).

Bioassay results are shown in Table 2. At day 5 of treatment, antifungal levels in serum were above the corresponding MEC values for all of the strains tested, increasing significantly with dose escalation. None of the doses of AFG was able to significantly reduce the galactomannan serum concentrations in comparison with that for the control group at the end of therapy (Table 2).

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone: 34 977-759359. Fax: 34 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

[∇] Published ahead of print on 13 December 2010.

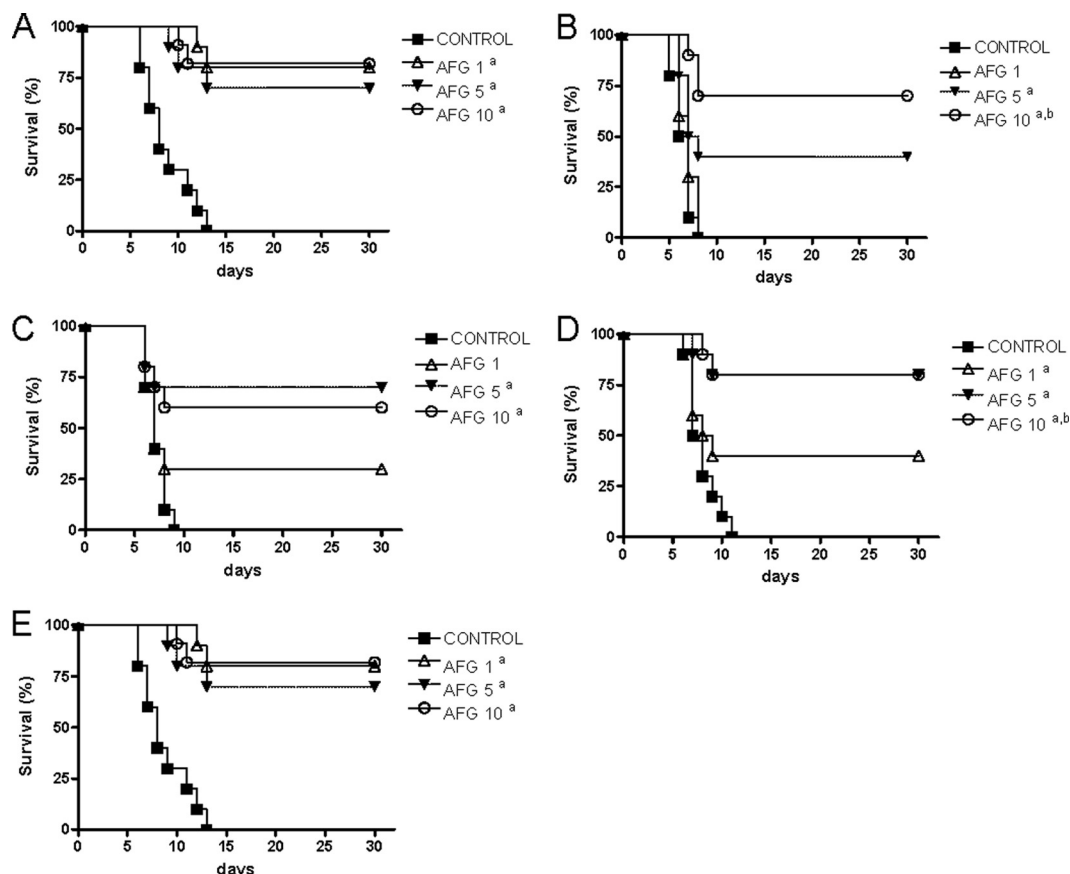


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with 1×10^4 CFU of strain FMR 9965 (A), FMR 8756 (B), FMR 9960 (C), FMR 10084 (D), or FMR 9966 (E) of *A. flavus*. AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg; AFG 5, anidulafungin at 5 mg/kg; AFG 10, anidulafungin at 10 mg/kg. a, $P < 0.05$ versus control; b, $P < 0.05$ versus AFG at 1 mg/kg.

TABLE 1. Effects of antifungal treatment on colony counts of *A. flavus* FMR 9965, FMR 8756, FMR 9960, FMR 10084, and FMR 9966 in spleen and kidney tissues of mice

<i>A. flavus</i> isolate	AFG dose (mg/kg/day)	Mean log ₁₀ CFU/g (95% CI) ^a	
		Spleen	Kidney
FMR 9965	None	2.54 (2.31–2.76)	3.28 (3.15–3.41)
	1	2.07 (1.94–2.20)a	1.80 (1.27–2.33)a
	5	1.92 (1.71–2.12)a	1.76 (1.43–2.09)a
	10	1.77 (1.63–1.91)a,b	0.81 (0.47–1.14)a,b,c
FMR 8756	None	2.67 (2.51–2.82)	2.65 (2.51–2.79)
	1	2.43 (2.30–2.56)a	2.20 (1.94–2.45)a
	5	2.26 (2.12–2.41)a	1.67 (1.29–2.05)a,b
	10	2.23 (2.06–2.41)a	1.55 (1.15–1.94)a,b
FMR 9960	None	2.58 (2.42–2.74)	2.36 (2.18–2.54)
	1	2.34 (2.17–2.51)a	2.27 (2.07–2.46)
	5	2.34 (2.20–2.48)a	1.71 (1.40–2.02)a,b
	10	2.23 (2.09–2.37)a	1.57 (1.25–1.90)a,b
FMR 10084	None	2.51 (2.34–2.68)	3.15 (2.95–3.36)
	1	2.14 (1.98–2.30)a	2.00 (1.16–2.83)a
	5	2.08 (1.95–2.22)a	1.36 (0.98–1.74)a
	10	1.82 (1.70–1.96)a,b,c	1.08 (0.61–1.55)a,b
FMR 9966	None	2.90 (2.80–3.00)	2.93 (2.83–3.04)
	1	2.73 (2.57–2.89)	2.36 (2.10–2.62)a
	5	2.68 (2.52–2.83)a	1.23 (0.95–1.52)a,b
	10	2.64 (2.53–2.76)a	1.40 (1.12–1.69)a,b

^a 95% CI, 95% confidence interval. a, $P < 0.05$ versus control; b, $P < 0.05$ versus AFG at 1 mg/kg; c, $P < 0.05$ versus AFG at 5 mg/kg.

Histological studies of control mice and, to a lesser degree, those treated with AFG at 1 mg/kg showed kidney invasion by fungal cells, with signs of necrosis, like parenchyma destruction and karyolysis, caused by angioinvasion and consequent ischemia, but an inflammatory response was not observed. Mice treated with 5 and 10 mg/kg showed renal congestion, but there was no sign of necrosis, inflammatory response, or invasion by fungal elements.

Several experimental and clinical studies have demonstrated good *in vitro* and *in vivo* activities of echinocandins against aspergillosis (18). Our *in vitro* results showed a remarkable

TABLE 2. Determination of AFG and galactomannan levels in serum^a

AFG dose (mg/kg)	Serum level (μg/ml), mean ± SD	GMI ^b , mean ± SD
None		6.48 ± 0.34
1	2.36 ± 1.21	6.28 ± 0.12
5	10.14 ± 1.04	6.30 ± 0.17
10	13.19 ± 1.65	6.22 ± 0.22

^a AFG levels in serum were determined on day 5 of therapy for mice infected with 1×10^4 CFU of *A. flavus* strain FMR 10084, 4 h after the last dosing; galactomannan levels in serum were determined for mice infected with 1.4×10^2 CFU of the same strain and treated for 7 days with AFG.

^b GMI, galactomannan index.

correlation between the results obtained with disk diffusion and broth microdilution methods. In our *in vivo* study, AFG demonstrated high efficacy against *A. flavus* infections. Other authors had already demonstrated the efficacy of AFG in experimental infections but against *A. fumigatus* (11, 12, 17). In the current study, although the three doses of AFG showed serum concentrations above the MECs of the isolates tested and were effective against the fungal infection, the two higher doses performed better than 1 mg/kg, suggesting a concentration-dependent efficacy, as other authors previously observed with caspofungin (19).

In contrast, the good results obtained with the therapy were not accompanied by a decrease in galactomannan serum levels. This fact was also observed in disseminated and pulmonary murine infections by *A. fumigatus* (1, 10, 14, 15). It has been suggested that due to their fungistatic activity, the echinocandins are not able to reduce galactomannan levels in serum, since this phenomenon was not observed in the treatment of aspergillosis with fungicidal drugs, like azoles (1). Similarly, in a case of invasive aspergillosis treated with caspofungin (CSP), an unexpected rise in galactomannan levels was observed (7). In this case, the authors suggested that the reduction in 1,3- β -D-glucan caused by the exposure to echinocandins and the consequent degradation of the cell wall could lead to a release of galactomannan, thus increasing its circulating levels.

Our results suggest that AFG may be considered a therapeutic option in the management of IA.

REFERENCES

1. **Arendrup, M. C., et al.** 2008. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3504–3511.
2. **Catalán, M., and J. C. Montejo.** 2006. Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Rev. Iberoam. Micol.* **23**:39–49.
3. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
4. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; proposed guideline. Document M51-P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
5. **Espinel-Ingroff, A., et al.** 2007. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1811–1820.
6. **Hedayati, M. T., A. C. Pasqualotto, P. A. Warn, P. Bowyer, and D. W. Denning.** 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **153**:1677–1692.
7. **Klont, R. R., et al.** 2006. Paradoxical increase in circulating *Aspergillus* antigen during treatment with caspofungin in a patient with pulmonary aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **43**:23–25.
8. **Lewis, J. S., II.** 2009. Echinocandin activity against *Aspergillus* spp. and the importance of pharmacodynamics. *Med. Mycol.* **47**:376–381.
9. **Morgan, J., et al.** 2005. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med. Mycol.* **43**:49–58.
10. **Nagasaki, Y., et al.** 2009. Combination therapy with micafungin and amphotericin B for invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompromised mouse model. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:379–382.
11. **Petratis, V., et al.** 1998. Antifungal efficacy, safety, and single-dose pharmacokinetics of LY303366, a novel echinocandin B, in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2898–2905.
12. **Roberts, J., K. Schock, S. Marino, and V. T. Andriole.** 2000. Efficacies of two new antifungal agents, the triazole ravuconazole and the echinocandin LY-303366, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3381–3388.
13. **Rodríguez, M. M., et al.** 2009. Correlation of in vitro activity, serum levels, and in vivo efficacy of posaconazole against *Rhizopus microsporus* in a murine disseminated infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:5022–5025.
14. **Sionov, E., S. Mendlovic, and E. Segal.** 2006. Efficacy of amphotericin B or amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis. *J. Infect.* **53**:131–139.
15. **van de Sande, W. W., et al.** 2009. Combination therapy of advanced invasive pulmonary aspergillosis in transiently neutropenic rats using human pharmacokinetic equivalent doses of voriconazole and anidulafungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2005–2013.
16. **Vazquez, J. A., and J. D. Sobel.** 2006. Anidulafungin: a novel echinocandin. *Clin. Infect. Dis.* **43**:215–222.
17. **Verweij, P. E., K. L. Oakley, J. Morrissey, G. Morrissey, and D. W. Denning.** 1998. Efficacy of LY303366 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:873–878.
18. **Walsh, T. J., et al.** 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guideline of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **46**:327–360.
19. **Wiederhold, N. P., et al.** 2004. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: evidence of concentration-dependent activity. *J. Infect. Dis.* **15**:1464–1471.

4.7. Terapia combinada de voriconazol y anidulafungina en infecciones experimentales por *Aspergillus flavus* en el ratón.

Combined therapy of voriconazole and anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*.

Calvo E, Pastor FJ, Salas V, Mayayo E, Guarro J.

Mycopathologia. 2011, 173:251-257.

Combined Therapy of Voriconazole and Anidulafungin in Murine Infections by *Aspergillus flavus*

Enrique Calvo · F. Javier Pastor ·
Valentina Salas · Emilio Mayayo · Josep Guarro

Received: 12 September 2011 / Accepted: 30 October 2011 / Published online: 4 December 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract The efficacy of the combination of anidulafungin (AFG) at 1 mg/kg plus voriconazole (VRC) at 25 mg/kg was evaluated in a murine model of disseminated infection by *Aspergillus flavus* using three isolates previously tested in vitro. All the combinations showed indifferent in vitro interaction with the exception of one, which showed synergy. In general, the combined treatment prolonged the survival and reduced the fungal load in comparison with AFG alone, and only in a few cases, it improved the results of the VRC monotherapy. The combination of the two drugs and VRC alone reduced the galactomannan levels in serum in comparison with the control group.

Keywords Fungal infection · *Aspergillus flavus* · Antifungal combination · Voriconazole · Anidulafungin · Animal models

Introduction

Invasive aspergillosis (IA) is one of the most common fungal infections in immunocompromised patients,

Aspergillus fumigatus being the most prevalent. In recent years, non-*fumigatus* *Aspergillus* species such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus* have become more common as causal agents of IA associated with high mortality rates [1].

Voriconazole (VRC) is currently the drug of choice for the treatment for IA, alternatives being posaconazole, the lipid formulations of amphotericin B, and the echinocandins for patients intolerant or with infections refractory to VRC [2]. Despite those options, IA treatments are still unsuccessful in a lot of cases [3], which has increased interest in the study of antifungal combinations. Due to their different fungal targets [4, 5] and the lower toxicity of these drugs in comparison with amphotericin B, a combination of azoles and echinocandins has become one of the most encouraging options for the treatment for IA. Anidulafungin (AFG) has shown good efficacy in experimental IA by *A. fumigatus* and non-*fumigatus* *Aspergillus* species [6–9] and seems to have advantages over the other echinocandins, mainly due to its slow, non-enzymatic degradation in comparison with the hepatic metabolism of caspofungin and micafungin [10].

We have tested the combination of AFG plus VRC in a neutropenic murine model of disseminated infection by *A. flavus*, using three clinical isolates against which AFG alone at low doses had shown modest efficacy in a previous study [6].

E. Calvo · F. J. Pastor · V. Salas · E. Mayayo ·
J. Guarro (✉)
Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències
de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Carrer
Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain
e-mail: josep.guarro@urv.cat

Materials and Methods

Fungal Isolates

Three clinical isolates of *A. flavus* were used in this study: FMR 8756, FMR 9960 and FMR 10084. To prepare the inocula, isolates were grown on potato dextrose agar (PDA) for 5 days and cultures were then suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of conidia or hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on hemocytometer counts, and viability was confirmed by serial plating on PDA.

In Vitro Studies

The in vitro susceptibility of the three strains to AFG and VRC was tested in duplicate using a reference broth microdilution method [11]. Drug interactions were assessed using a checkerboard method [12] and were evaluated by determining the fractional concentration index (FICI) using two criteria, minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal effective concentration (MEC). In the first case, MIC-0 was used as the endpoint for both antifungals. In the second case, MEC was used as the endpoint for AFG and MIC-2 for VRC, which has shown good correlation with MEC [13]. Interaction was considered synergic if the FICI was ≤ 0.5 , indifferent if it was >0.5 and ≤ 4 and antagonistic if it was >4 [4]. For the MEC and MIC-2 determinations, microplate antifungal concentrations ranged from 0.25 to 0.0004 $\mu\text{g/ml}$ for AFG and from 1 to 0.0015 $\mu\text{g/ml}$ for VRC. For MIC-0 determinations of AFG and VRC, the microplate antifungal concentrations ranged from 32 to 0.06 $\mu\text{g/ml}$ and from 16 to 0.03, respectively.

Animals

Male OF1 mice weighing 30 g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used. Animals were housed under standard conditions. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee.

Drugs

We tested AFG (Ecalta, Pfizer Inc. Madrid, Spain) and VRC (Vfend, Pfizer Inc. Madrid, Spain).

Immunosuppression

Animals were immunosuppressed 1 day prior to infection by administering a single dose of 200 mg of cyclophosphamide per kg intraperitoneally (i.p.) plus a single dose of 150 mg of 5-fluorouracil per kg intravenously.

Infection and Therapy

On the day of infection, mice were inoculated with a conidial suspension of 8×10^3 CFU in 0.2 ml of sterile normal saline into the lateral tail vein. Preliminary studies with the three strains demonstrated that this inoculum was the optimal dose for producing an acute infection, with all animals dying within 7 days after infection (data not shown).

The efficacy of the treatments was evaluated through prolongation of survival, reduction in fungal tissue burden, decrease in galactomannan serum levels and histopathological studies. For each strain and each treatment, groups of 20 mice were established. Ten mice were randomly assigned to the survival study and checked daily for 30 days. For tissue burden studies, groups of ten mice were also established, and the animals were killed on day 5 after infection. Kidneys and spleens were aseptically removed, and approximately half of each organ was weighed and homogenized in 2 ml sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA and incubated for 48 h at 30°C. AFG was administered at 1 mg/kg of body weight i.p. once a day; VRC was administered at 12.5 mg/kg of body weight orally twice daily. Using these doses has been shown to deliver plasma levels that are similar to those in humans treated with AFG or VRC [5, 6, 14, 15]. The combination of VRC plus AFG was tested at the same doses and route of administration as the monotherapies. From 3 days prior to infection, the mice treated with VRC were given diluted (50%) grapefruit juice instead of water [16]. All treatments began 24 h after challenge and lasted for 7 days. Control animals received no antifungal treatment. To prevent bacterial infections, mice received ceftazidime (5 mg/day subcutaneously) from days 1 to 7 after challenge.

Galactomannan Assay

Before being killed, approximately 1 ml of blood from each mouse belonging to the tissue burden groups was

Table 1 In vitro antifungal activity of voriconazole and anidulafungin against three strains of *A. flavus*

Strain	MIC-0 (µg/ml)			MIC-2, MEC (µg/ml)		
	VRC	AFG	FICI	VRC	AFG	FICI
FMR 8756	0.5	>32	0.531	0.25	0.0032	0.685
FMR 9960	0.5	>32	0.503	0.50	0.0032	0.685
FMR 10084	1.0	>32	0.560	0.50	0.0016	0.425

VRC voriconazole, AFG anidulafungin, FICI fractional inhibitory concentration index, MIC-0 minimal inhibitory concentration (100% inhibition of growth), MIC-2 minimal inhibitory concentration (50% inhibition of growth), MEC minimal effective concentration

extracted by cardiac puncture to determine galactomannan serum levels by enzyme immunoassay (Platelia *Aspergillus*[®], Bio Rad, Marmes, la Coquette, France) as a marker of the treatment response. Values were expressed as a galactomannan index (GMI).

Histopathological Study

Half of each organ was fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin-embedded

and sliced into 2-µm sections, which were then stained with hematoxylin–eosin, periodic acid schiff (PAS) and Grocott methenamine silver (GMS) and examined in blinded fashion by light microscopy.

Statistics

Mean survival time was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups using the log rank test. Colony counts in tissue burden studies were analyzed by the Mann–Whitney *U* test. A *P* value of ≤0.05 was considered statistically significant.

Results

Table 1 shows the in vitro activity of AFG and VRC and their interactions against the three strains of *A. flavus* tested. The results of FICIs by using MIC-0 values as endpoints showed indifferent interactions. When FICIs were calculated using MEC and MIC-2 values as endpoints, the combination showed synergy

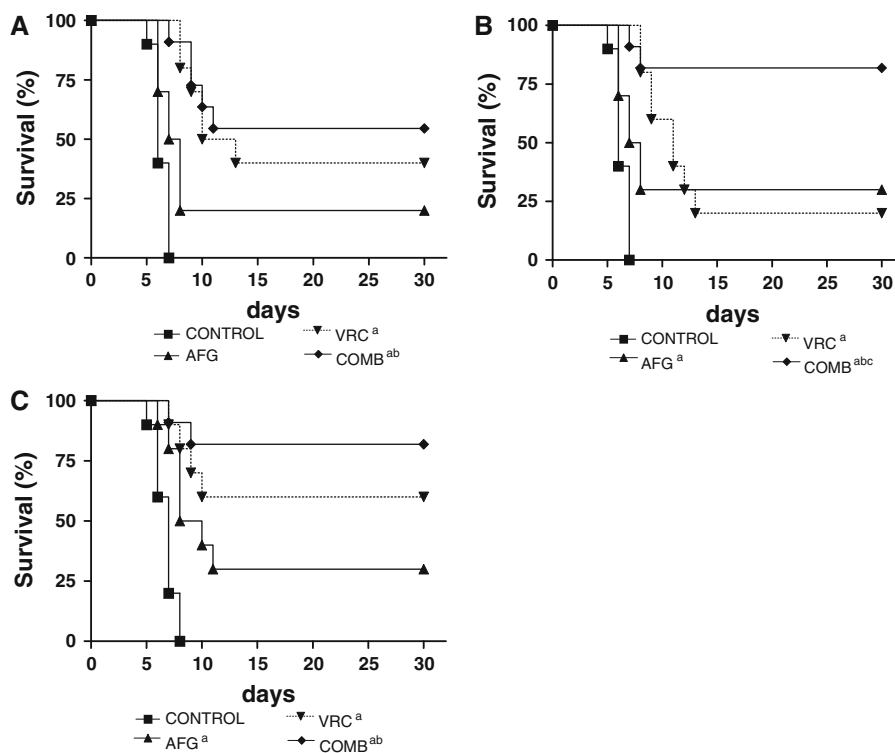


Fig. 1 Cumulative mortality of mice infected with 8×10^3 CFU of the strains FMR 10084 (a), FMR 8756 (b), FMR 9960 (c) of *A. flavus*. AFG, anidulafungin at 1 mg/kg; VRC,

voriconazole at 25 mg/kg; COMB, AFG plus VRC. a *P* < 0.05 versus control; b *P* < 0.05 versus AFG 1 mg/kg; c *P* < 0.05 versus VRC 25 mg/kg

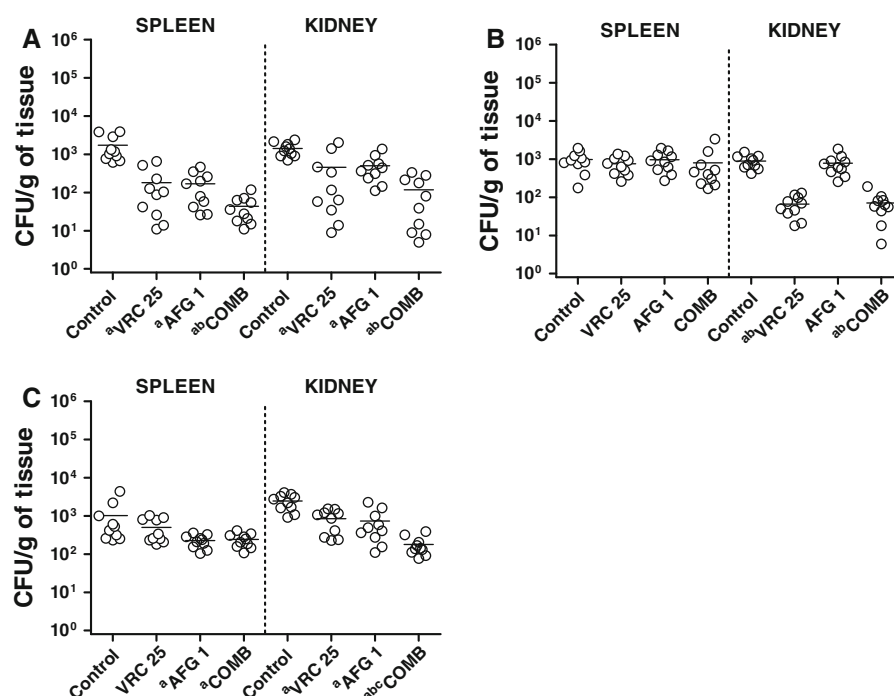


Fig. 2 Effects of antifungal treatment on colony counts of *A. flavus* FMR 10084 (a), FMR 8756 (b), FMR 9960 (c), in spleen and kidney tissues of mice. AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg; VRC 25, voriconazole at 25 mg/kg; COMB, AFG 1 plus VRC

25. *a* $P < 0.05$ versus control; *b* $P < 0.05$ versus AFG 1 mg/kg; *c* $P < 0.05$ versus VRC 25 mg/kg. Horizontal lines indicate mean values

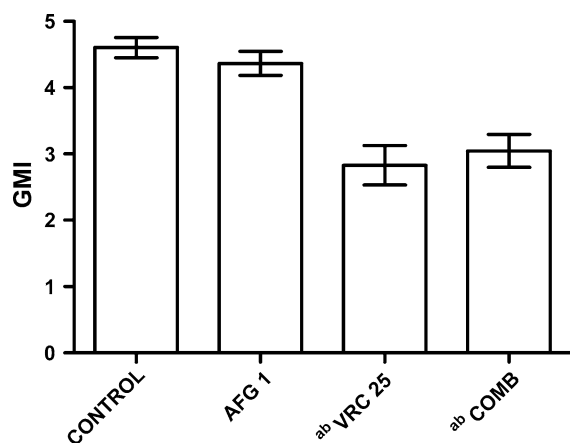


Fig. 3 Galactomannan serum levels in mice infected with *A. flavus* on day 5 after challenge. AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg; VRC 25, voriconazole at 25 mg/kg; Combo, AFG 1 plus VRC 25. *a* $P < 0.05$ versus control; *b* $P < 0.05$ versus AFG 1. GMI, galactomannan index

for the strain FMR 10084, while it was indifferent for the other two strains.

The results of the survival study are shown in Fig. 1. All the treatments significantly prolonged

survival with respect to the control group for all the strains tested, with the exception of AFG for the strain FMR 10084. The combined therapy significantly prolonged the survival of mice in comparison with the AFG monotherapy for the three strains tested, with respect to VRC for the strain FMR 8756.

The results of the tissue burden study are shown in Fig. 2. The combined therapy reduced the fungal load with respect to the control and the AFG monotherapy in practically all the cases. The combination worked better than VRC in only one strain in kidney. The reduction achieved by the monotherapies depended on the strain and organ tested.

The combined therapy and VRC were able to significantly reduce the GMI in comparison with the control group and the group treated with AFG, with no differences between them. AFG did not reduce such levels (Fig. 3).

Histological studies of untreated mice showed parenchyma invasion and angioinvasion by fungal cells. Signs of necrosis without inflammatory response were also observed. Mice treated with AFG showed infiltrates by fungal elements, which were less

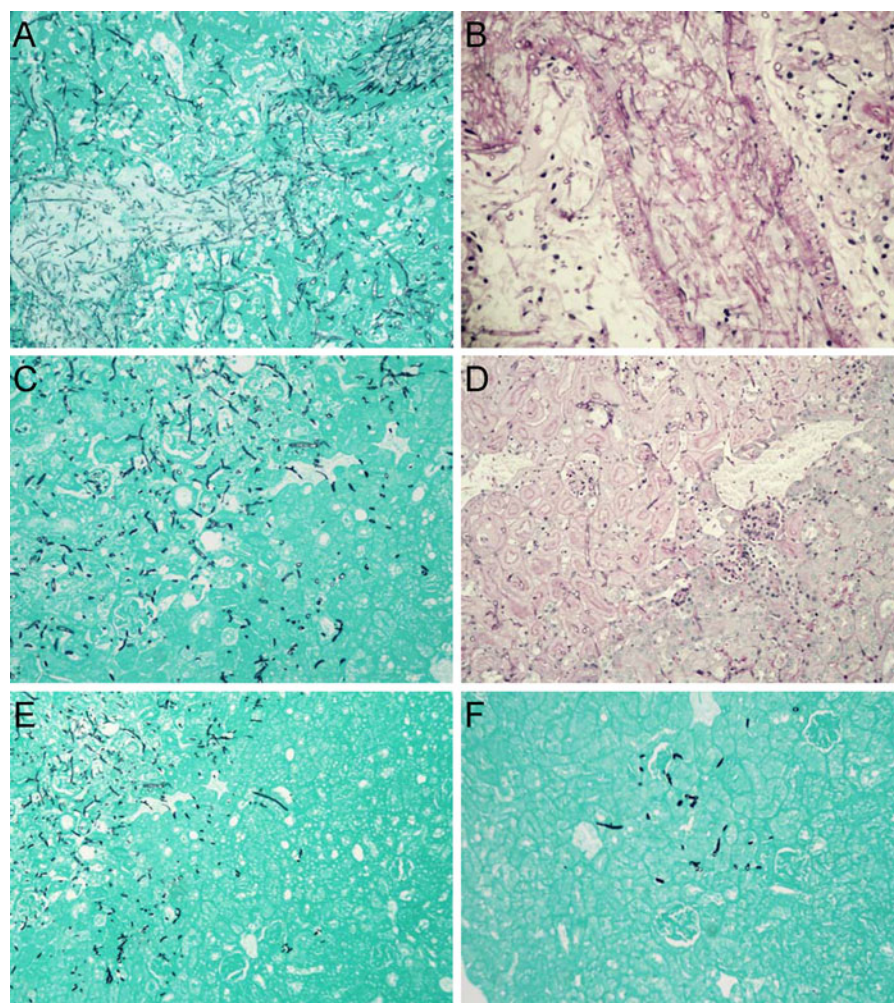


Fig. 4 **a, b** Kidney sections of control mice infected with the strain FMR 8756 showing massive fungal invasion and parenchyma destruction; GMS $\times 200$ and PAS $\times 400$, respectively. **c, d** Kidney section of a mouse treated with AFG at 1 mg/kg showing fungal invasion GMS $\times 200$ and PAS $\times 200$,

respectively. **e** Kidney section of mice treated with VRC at 25 mg/kg, and **(f)** kidney section of mice treated with the combined regimen showing tissue less invaded by fungal elements; GMS $\times 200$

abundant in mice treated with VRC and especially with the combined therapy (Fig. 4).

Discussion

Combined antifungal therapies are not recommended as a primary treatment for IA due to the little clinical experience of their use [2]. The administration of VRC plus AFG in humans showed to be safe and well tolerated [17], although it is not clear whether such a combination would improve the efficacy of the

corresponding monotherapies against IA [18]. In this study, we have considered both MICs and MECs as endpoints because it has been demonstrated previously that the interactions between azoles and echinocandins depend on the endpoint used [19–21]. The results showed an *in vitro* synergistic effect for only one strain, which was not precisely that against the combination showed the best *in vivo* results, in the rest of cases being indifferent. These results agree with previous studies on *Aspergillus* species, including *A. flavus*, in which combinations of VRC with echinocandins were synergistic or indifferent, but never antagonistic [20, 22–25].

In the *in vivo* study, the combined regimen worked better than AFG and, though modestly, better than VRC. Similarly, in a model of IA by *A. fumigatus* in neutropenic rabbits, Petraitis et al. [26] demonstrated indifferent or synergistic effects of VRC (30 mg/kg/day) combined with AFG at 5 mg/kg/day, such interaction being indifferent or antagonistic when AFG was administered at 10 mg/kg/day. Similar combined doses of VRC and AFG were also tested in a neutropenic rat model of IA by *A. fumigatus* showing, in this case, no better efficacy than the respective monotherapies [27]. Previous experimental studies testing combinations of VRC with other echinocandins have also shown contradictory results. In a neutropenic guinea-pig model of IA by *A. fumigatus*, VRC plus micafungin did not show significantly higher efficacy than the respective monotherapies [28]. On the other hand, VRC plus caspofungin showed a synergistic effect in similar guinea-pig models of IA by *A. fumigatus* in which the combination was better than both respective monotherapies in reducing organs fungal load [22, 29] and in prolonging the survival [29]. It has been suggested that these discrepancies might be due to the different experimental conditions employed in the studies, rather than the presence of a strain-dependent synergy, since the improvements achieved by the combined therapy with respect to monotherapies are too slight to be the consequence of a clear synergistic effect [29]. Having said that, in most of these experimental studies, the authors emphasize the absence of any antagonism by these combined therapies and the need for further studies evaluating azole–echinocandin combinations against IA.

In the clinical setting, since AFG is not approved for the treatment for IA, there is no data on the concomitant use of AFG and VRC. In contrast, there are some reports on the use of combined therapies with VRC and caspofungin in the treatment for IA, mainly against *A. fumigatus* [3, 30–33] or, more rarely, *A. flavus* infections [30, 33], generally with successful results, even improving on those of the VRC monotherapy in some cases [3, 32].

In summary, our results are similar to those of previous studies and case reports that have analysed the efficacy of echinocandins plus VRC against IA by *A. fumigatus*. In the treatment of experimental IA by *A. flavus*, the combination of AFG plus VRC improved the efficacy of the AFG monotherapy, and there was

no negative interaction. A synergistic effect was observed in some cases, suggesting that such therapy might have a clinical role in the treatment of IA.

References

1. Marr KA. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med Mycol.* 2008;46:293–302.
2. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF. Treatment of aspergillosis: clinical practice guideline of the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis.* 2008;46:327–60.
3. Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2004;39:797–802.
4. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:693–715.
5. Perkhofer S, Lass-Flörl C. Anidulafungin and voriconazole in invasive fungal disease: pharmacological data and their use in combination. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18:1393–404.
6. Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Salas V, Guarro J. *In vitro* and *in vivo* efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1290–2.
7. Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. Efficacy of anidulafungin against *Aspergillus niger* *in vitro* and *in vivo*. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38:360–3.
8. Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:1447–66.
9. Pastor FJ, Guarro J. Anidulafungin: experimental therapy of fungal infections in animal models. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:119–23.
10. Vazquez JA. The safety of anidulafungin. *Expert Opin Drug Saf.* 2006;5:751–8.
11. Laboratory Clinical Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38–A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
12. Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. *In vitro* evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:970–8.
13. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:327–30.
14. Theuretzbacher U. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of echinocandins. *Eur J Microbiol Infect Dis.* 2004;23:805–12.
15. Warn PA, Sharp A, Mosquera J, Spickermann J, Schmitt-Hoffmann A, Heep M, Denning DW. Comparative *in vivo*

- activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:1198–207.
16. Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med Mycol.* 2000;38:209–12.
 17. Dowell JA, Schranz J, Baruch A, Foster G. Safety and pharmacokinetics of coadministered voriconazole and anidulafungin. *J Clin Pharmacol.* 2005;45:1373–82.
 18. Crandon JL, Banevicius MA, Fang AF, Crownover PH, Knauff RF, Pope JS, Russomanno JH, Shore E, Nicolau DP, Kutl JL. Bronchopulmonary disposition of intravenous voriconazole and anidulafungin given in combination to healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5102–7.
 19. Shalit I, Shadkchan Y, Samra Z, Oshero N. In vitro synergy of caspofungin and itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus minimal effective concentration end points. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1416–8.
 20. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Buitrago MJ, Rodriguez-Tudela JL. Combined activity in vitro of caspofungin, amphotericin B, and azole agents against itraconazole-resistant clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1232–5.
 21. Pastor FJ, Guarro J. In vitro activity of the echinocandins. How should it be evaluated? *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:133–40.
 22. Kirkpatrick WR, Perea S, Coco BJ, Patterson TF. Efficacy of caspofungin alone and in combination with voriconazole in a Guinea pig model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2564–8.
 23. Perea S, Gonzalez G, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, Patterson TF. In vitro interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3039–41.
 24. Philip A, Odabasi Z, Rodriguez J, Paetznick VL, Chen E, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. In vitro synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3572–4.
 25. Perkhof S, Jost D, Dierich MP, Lass-Flörl C. Susceptibility testing of anidulafungin and voriconazole alone and in combination against conidia and hyphae of *Aspergillus* spp. under hypoxic conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1873–5.
 26. Petraitis V, Petraitene R, Hope WW, Meletiadis J, Mickiene D, Hughes JE, Cotton MP, Stergiopoulou T, Kasai M, Francesconi A, Shaufele RL, Sein T, Avila NA, Bacher J, Walsh TJ. Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: in vitro and in vivo correlations of the concentration- and dose- dependent interactions between anidulafungin and voriconazole by Bliss independence drug interaction analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2382–91.
 27. van de Sande WW, Mathotten RA, ten Kate MT, van Vianen W, Tavakol M, Rijnders BJ, Bakker-Woudenberg IA. Combination therapy of advanced invasive pulmonary aspergillosis in transiently neutropenic rats using human pharmacokinetic equivalent doses of voriconazole and anidulafungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2005–13.
 28. Chandrasekar PH, Cutright JL, Manavathu EK. Efficacy of voriconazole plus amphotericin B or micafungin in a guinea-pig model of invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:925–8.
 29. MacCallum DM, Whyte JA, Odds FC. Efficacy of caspofungin and voriconazole combinations in experimental aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3697–701.
 30. Gubler C, Wildi SM, Imhof A, Schneemann M, Müllhaupt B. Disseminated invasive aspergillosis with cerebral involvement successfully treated with caspofungin and voriconazole. *Infection.* 2007;35:364–6.
 31. Schuster F, Moelter C, Schmid I, Graubner UB, Kammer B, Belohradsky BH, Führer M. Successful antifungal combination therapy with voriconazole and caspofungin. *Pediatr Blood Cancer.* 2005;15:682–5.
 32. Singh N, Limaye AP, Forrest G, Safdar N, Muñoz P, Pursell K, Houston S, Rosso F, Montoya JG, Patton P, del Busto R, Aguado JM, Fisher RA, Klintmalm GB, Miller R, Wagener MM, Lewis RE, Kontoyannis DP, Husain S. Combination of voriconazole and caspofungin as primary therapy for invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients: a prospective, multicenter, observational study. *Transplantation.* 2006;81:320–6.
 33. Thomas A, Korb V, Guillemain R, Caruba T, Boussaud V, Baillaud E, Prognon P, Begué D, Sabatier B. Clinical outcomes of lung-transplant recipients treated by voriconazole and caspofungin combination in aspergillosis. *J Clin Pharm Ther.* 2010;35:49–53.

4.8. Eficacia de la anidulafungina frente a *Aspergillus niger* *in vitro* e *in vivo*.

Efficacy of anidulafungin against *Aspergillus niger* *in vitro* and *in vivo*.

Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J.

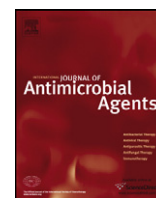
International Journal of Antimicrobial Agents. 2011, 38:360-363.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>



Short communication

Efficacy of anidulafungin against *Aspergillus niger* in vitro and in vivo

Enrique Calvo, F. Javier Pastor, Emilio Mayayo, Josep Guarro*

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2010

Accepted 15 June 2011

Keywords:

Aspergillus niger

Mice

Anidulafungin

ABSTRACT

In this study, anidulafungin (AFG) showed high in vitro activity against 10 isolates of *Aspergillus niger* by broth microdilution and disk diffusion methods. The efficacy of AFG at 1, 5 and 10 mg/kg was tested against six of the isolates in a murine model of disseminated infection. AFG was able to reduce mortality, showing survival rates of 70–100%, 60–100% and 30–60% in mice treated with AFG at 10, 5 and 1 mg/kg, respectively. AFG also showed a dose–response efficacy in reducing tissue burden in kidneys and spleen. A parallel experiment demonstrated that administration of AFG did not reduce serum concentrations of galactomannan in mice. Histopathological studies confirmed the efficacy of AFG.

© 2011 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Invasive aspergillosis (IA) is a life-threatening fungal infection predominantly affecting immunocompromised patients. Although the majority of infections are caused by *Aspergillus fumigatus*, other species such as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus* also have relevant clinical importance [1]. *Aspergillus niger* is mainly associated with otomycosis, although in immunocompromised patients it can produce severe infections such as peritonitis, endocarditis and disseminated infections, generally following major surgery [2].

Voriconazole (VCZ) is the drug of choice in the treatment of IA, and other azoles such as posaconazole and itraconazole are considered alternative therapies [1]. However, increasing resistance of *Aspergillus* isolates to azoles has been reported [3], making it necessary to develop new therapeutic approaches. The echinocandins are newer alternatives to VCZ, with caspofungin (CAS) having been approved as primary therapy and with micafungin recommended for prophylaxis and as salvage therapy for IA [1]. The efficacy of AFG against aspergillosis has only been demonstrated in experimental infections by *A. fumigatus* [4] and *A. flavus* [5]. It is not known whether this drug is effective against experimental *A. niger* infections.

In this study, the in vitro activity of AFG against 10 clinical isolates of *A. niger* was tested by two different methods and its in vivo efficacy was determined in a murine model of systemic infection using 6 randomly chosen isolates from the 10 isolates tested in vitro.

2. Materials and methods

The in vitro antifungal activity of AFG against 10 isolates of *A. niger* was determined by broth microdilution and disk diffusion methods. The broth microdilution method was carried out to determine the minimum effective concentration (MEC) (in mg/L), defined as the lowest antifungal concentration that produced morphological alterations of hyphal growth compared with that of the control well [6]. In the disk diffusion method, inhibition zone diameters (IZDs) (in mm) were determined using non-supplemented Mueller–Hinton agar and 6-mm diameter paper disks containing 5 µg of AFG [7]. To evaluate the in vitro susceptibility of *A. niger* isolates to AFG, the suggested breakpoints at 24 h for CAS against *Aspergillus* for MEC and IZD, respectively, were as follows: susceptible, ≤ 1 mg/L or ≥ 17 mm; intermediate, 2 mg/L or 14–16 mm; and resistant, ≥ 4 mg/L or ≤ 13 mm [8].

For the in vivo study, six isolates previously tested in vitro were randomly chosen. Two of these strains (FMR 7156 and FMR 11252) were environmental, whilst the other four had a clinical origin [FMR 11251 from cutaneous aspergillosis, FMR 11250 from sputum, FMR 11248 from perionyxis and FMR 11254 from sputum of a human immunodeficiency virus (HIV)-positive patient]. On the day of infection, cultures on potato dextrose agar (PDA) incubated at 30 °C for 7 days were suspended in sterile saline and were filtered through sterile gauze to remove clumps of spores or hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on haemocytometer counts and by serial plating on PDA to confirm viability.

Male OF1 mice weighing 30 g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used. Animals were immunosuppressed 1 day prior to infection by administering a single intraperitoneal dose of 200 mg/kg cyclophosphamide plus a single intravenous dose of 150 mg/kg 5-fluorouracil. To prevent bacterial infection, the mice

* Corresponding author. Tel.: +34 977 759 359; fax: +34 977 759 322.
E-mail address: josep.guarro@urv.cat (J. Guarro).

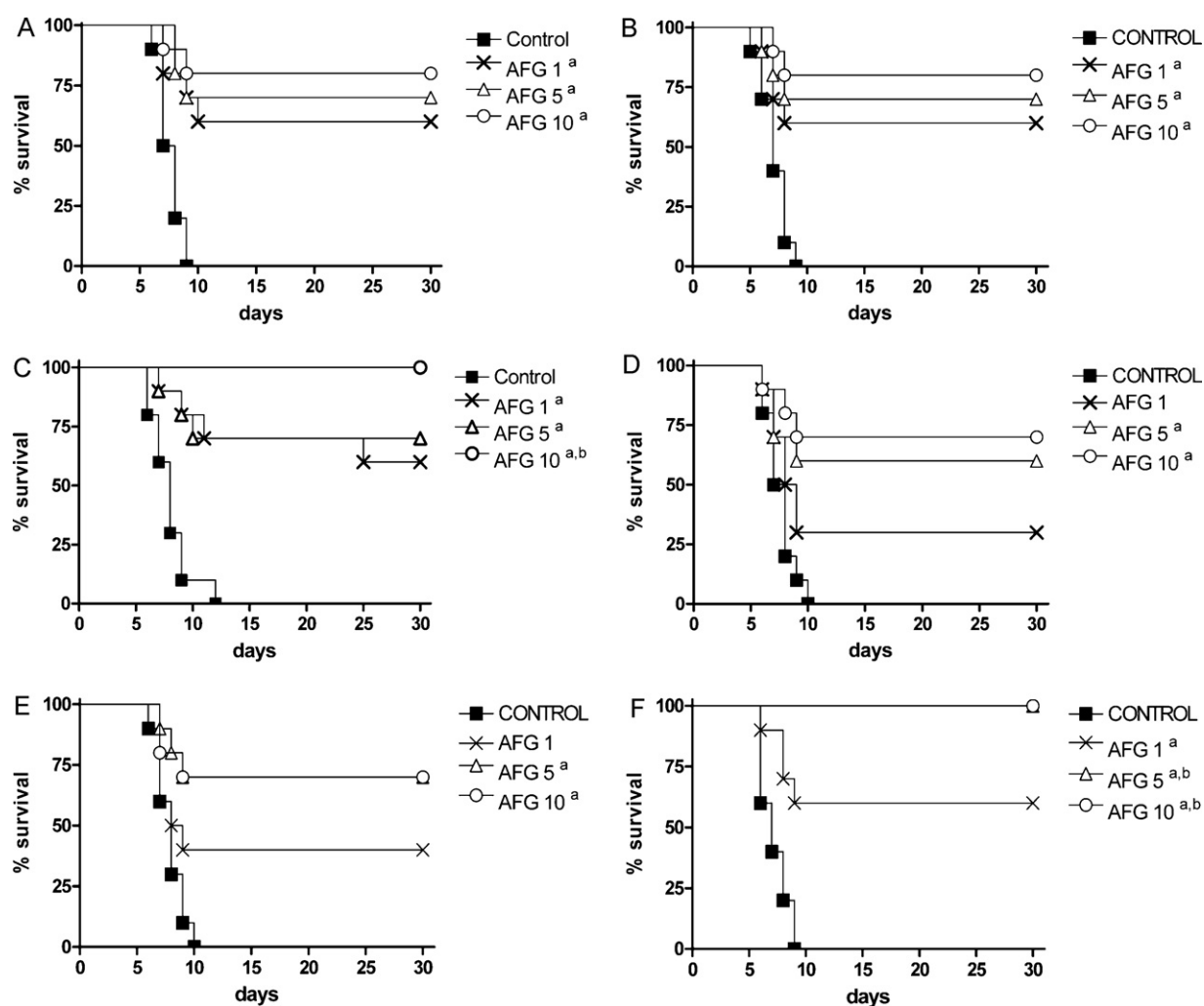


Fig. 1. Cumulative mortality of mice infected with 1×10^5 colony-forming units (CFU) of *Aspergillus niger* strains (A) FMR 7156, (B) FMR 11252, (C) FMR 11251, (D) FMR 11250, (E) FMR 11248 and (F) FMR 11254. AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg; AFG 5, anidulafungin at 5 mg/kg; AFG 10, anidulafungin at 10 mg/kg. ^a $P < 0.05$ vs. control; ^b $P < 0.05$ vs. AFG 1.

received ceftazidime (5 mg/day subcutaneously) from Days 1–7 after challenge. Mice were infected with a conidial suspension of 1×10^5 colony-forming units (CFU) in 0.2 mL of sterile normal saline injected intravenously via a lateral tail vein. Previous tests with the six strains have shown that this inoculum was suitable for producing an acute infection, with all the animals dying within 10 days of challenge (data not shown).

AFG (Ecalta; Pfizer Inc., Madrid, Spain) was administered in 0.1 mL of sterile saline at 1, 5 or 10 mg/kg body weight intraperitoneally once a day. All treatments began 24 h after challenge and lasted for 7 days. Groups of 20 mice were established for each strain and each treatment. Control animals received no treatment. The efficacy of the drug was evaluated through prolongation of survival and reduction of tissue fungal burden. For each strain and dose, groups of 10 mice were randomly assigned to the survival study and were checked daily for 30 days. For tissue burden studies, the other 10 mice from each group were sacrificed on Day 5 after infection. The kidneys and spleen were aseptically removed and approximately one-half of each organ was weighed and homogenised in 2 mL of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA and were incubated for 48 h at 30 °C.

Mean survival time was estimated by the Kaplan–Meier method and was compared amongst groups using the log-rank test. Colony counts in tissue burden studies were analysed by the

Mann–Whitney U -test. A P -value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

For the histopathological study, the remaining half of each organ was fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin-embedded and sliced into 2 μ m sections that were stained with haematoxylin–eosin, Periodic acid Schiff and Grocott's methenamine silver and were examined in blinded fashion by light microscopy.

In a parallel study, groups of five immunosuppressed mice were challenged with 2×10^2 CFU of *A. niger* strain FMR 11254. These mice were treated for 7 days with the same doses of AFG to determine the galactomannan serum levels by enzyme immunoassay (Platelia™ *Aspergillus* EIA; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) on the last day of therapy as an additional marker of treatment efficacy. Serum was obtained from centrifuged blood samples extracted by cardiac puncture with the mice anaesthetised by sevoflurane inhalation. Following the procedure described by the manufacturer, 100 μ L of treatment solution [4% ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)] was added to 300 μ L of each serum sample. The mixture was heated for 6 min at 120 °C and the samples were centrifuged. Then, 50 μ L of the supernatant and 50 μ L of conjugate were added to each well of an anti-galactomannan antibody-coated plate. Plates were incubated at 37 °C for 90 min and were washed five times. Finally, 200 μ L of chromogen solution was added to each well and was incubated for 30 min at room

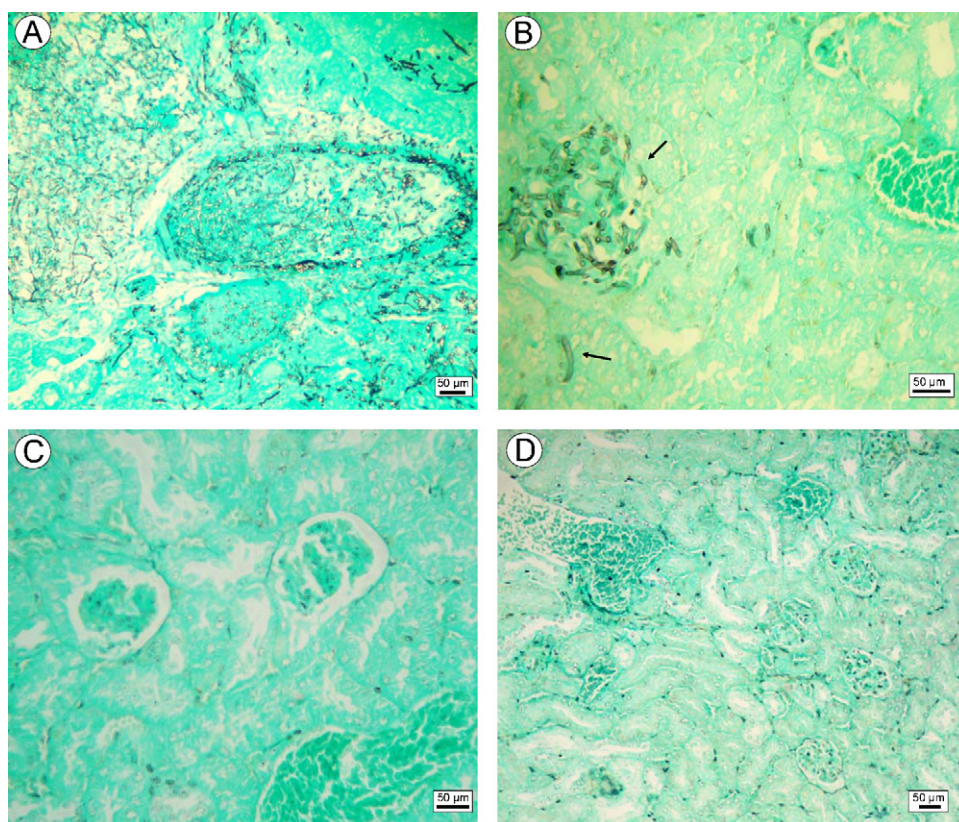


Fig. 2. (A) Kidney section of a control mouse showing invasion of fungal elements in parenchyma and in a blood vessel. (B) Kidney section of a mouse treated with anidulafungin (AFG) at 1 mg/kg, showing infiltration of hyphae (arrows). (C and D) Kidney sections of mice treated with AFG at 5 mg/kg (C) and 10 mg/kg (D), showing no fungal invasion. Grocott's stain.

temperature in darkness. After stopping the reaction, the optical density was measured at 450 nm and 620 nm. Data were expressed as a serum galactomannan index (GMI), with results expressed as mean \pm standard deviation. Results were compared using a *t*-test.

3. Results

The MECs were ≤ 0.06 mg/L for all strains tested. The disk diffusion test showed an IZD range of 23–25 mm (23 mm for strains FMR 11251 and FMR 11254, 24 mm for strains FMR 7156, FMR 11252 and FMR 11250 and 25 mm for strain FMR 11248). All the MEC and IZD values for AFG were within the suggested ranges of susceptibility, i.e. all the strains showed MECs ≤ 1 mg/L and IZDs ≥ 17 mm.

Fig. 1 shows the results of the survival study. For all the strains tested, AFG at 5 mg/kg and 10 mg/kg significantly prolonged the survival of mice with respect to the control group. AFG at 1 mg/kg prolonged the survival for all the strains with the exception of FMR 11248 and FMR 11250. In addition, AFG at 10 mg/kg for strains FMR 11251 and FMR 11254 and AFG at 5 mg/kg for strain FMR 11254 also prolonged survival with respect to mice treated with AFG at 1 mg/kg. Table 1 shows the results of the tissue burden study. AFG at 10 mg/kg reduced the fungal load in comparison with the control group for all strains tested in the kidney, and for all the strains except FMR 11251 and FMR 11250 in spleen tissue. AFG at 10 mg/kg reduced the spleen fungal recovery in comparison with mice treated with AFG at 1 mg/kg for strain FMR 11252, and in kidney tissue for strains FMR 7156, FMR 11252, FMR 11250 and FMR 11248. For strain FMR 11252, AFG at 10 mg/kg also reduced the fungal recovery in spleen and kidney with respect to mice treated with AFG at 5 mg/kg. AFG at 5 mg/kg reduced the fungal load with respect to the control group in the spleen for strains FMR 7156, FMR 11252, FMR 11248 and FMR 11254, and for all strains except FMR

Table 1
 Effects of antifungal treatment on colony counts of *Aspergillus niger* in spleen and kidney tissues of mice.

Isolate	Dose	Mean log ₁₀ CFU/g (95% CI)	
		Spleen	Kidney
FMR 7156	None	4.53 (4.43–4.62)	3.21 (3.11–3.31)
	AFG 1	4.38 (4.25–4.50)	2.71 (2.58–2.84)*
	AFG 5	4.24 (4.16–4.32) [†]	2.48 (2.36–2.60)*
	AFG 10	4.15 (4.03–4.26) [†]	2.14 (1.95–2.34)**
FMR 11252	None	4.73 (4.62–4.85)	2.94 (2.75–3.14)
	AFG 1	4.63 (4.53–4.72)	2.72 (2.61–2.83)
	AFG 5	4.33 (4.20–4.45)**	2.69 (2.51–2.86)
	AFG 10	3.73 (3.57–3.90)** [†]	2.08 (1.96–2.21)** [†]
FMR 11251	None	4.33 (4.19–4.47)	3.15 (2.99–3.31)
	AFG 1	4.14 (4.01–4.27)	2.76 (2.64–2.88)
	AFG 5	4.16 (4.03–4.28)	2.39 (2.14–2.64)*
	AFG 10	4.19 (4.05–4.32)	2.44 (2.23–2.64)*
FMR 11250	None	4.43 (4.34–4.53)	3.17 (3.04–3.29)
	AFG 1	4.30 (4.23–4.38)	2.87 (2.72–3.01)
	AFG 5	4.29 (4.17–4.40)	2.49 (2.31–2.66)**
	AFG 10	4.20 (4.07–4.34)	2.37 (2.22–2.53)**
FMR 11248	None	4.52 (4.42–4.63)	3.32 (3.20–3.43)
	AFG 1	4.41 (4.33–4.49)	2.86 (2.75–2.98) [†]
	AFG 5	4.29 (4.19–4.38) [†]	2.58 (2.44–2.73)**
	AFG 10	4.30 (4.18–4.42) [†]	2.41 (2.23–2.59)**
FMR 11254	None	4.05 (3.96–4.13)	3.17 (3.07–3.26)
	AFG 1	3.78 (3.61–3.94) [†]	2.31 (2.07–2.55)*
	AFG 5	3.74 (3.64–3.84) [†]	2.18 (2.02–2.34)*
	AFG 10	3.60 (3.46–3.73) [†]	1.95 (1.77–2.12)*

CFU, colony-forming units; CI, confidence interval; AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg; AFG 5, anidulafungin at 5 mg/kg; AFG 10, anidulafungin at 10 mg/kg.

* *P* < 0.05 vs. control.

** *P* < 0.05 vs. AFG 1.

[†] *P* < 0.05 vs. AFG 5.

11252 in kidney tissue. Such a dose also reduced the fungal load in comparison with mice treated with AFG at 1 mg/kg for strain FMR 11252 in the spleen, and for strains FMR 11250 and FMR 11248 in kidney tissue. AFG at 1 mg/kg reduced the fungal load in comparison with the control group for strain FMR 11254 in the spleen, and for strains FMR 7156, FMR 11248 and FMR 11254 in the kidney.

None of the doses of AFG was able to reduce significantly the GMI levels in comparison with the control group. After 7 days of therapy, GMI values were 6.67 ± 0.19 for control mice and 6.49 ± 0.16 , 6.22 ± 0.33 and 6.26 ± 0.27 for mice treated with AFG at 1, 5 and 10 mg/kg, respectively.

In untreated mice and in those treated with AFG at 1 mg/kg, the histopathological study revealed fungal invasion in renal parenchyma and blood vessels. Kidneys of mice treated with the higher doses of AFG did not show fungal elements. These findings were observed in the spleen and kidney but were more evident in the latter (Fig. 2).

4. Discussion

Infections by *A. niger*, although relatively rare, are usually fatal in immunosuppressed patients [9–11]. In most infections, patients receive amphotericin B as the sole antifungal therapy, with poor clinical efficacy. Although VCZ remains the first option against IA, strains of *A. niger* have been reported that are resistant in vitro to azoles [3]. In addition, at least one case of invasive infection by *A. niger* did not respond to the VCZ therapy [12].

Both in vitro methods used in this study showed good activity of AFG against *A. niger*. The good correlation between the two in vitro methods used suggests a potential use, due to its simplicity, of the disk diffusion method in the clinical laboratory for testing susceptibility to echinocandins.

The murine study confirmed the high efficacy of AFG against experimental invasive infections by *A. niger*. This drug had already shown efficacy in experimental infections by *A. fumigatus* [4] and *A. flavus* [5]. In a previous study [5], the three doses tested in the current study showed AFG serum concentrations above the MECs of the *A. niger* isolates tested. Despite this, and in agreement with a previous animal study that tested CAS on *A. fumigatus* murine infections [13], the higher doses of AFG performed better than the lowest one. This fact was especially evident in the histopathological study, where no fungal elements were found in kidneys of mice treated with the higher doses, in contrast to the abundant cells observed in kidneys of untreated mice or mice treated with 1 mg/kg AFG. Despite the good efficacy of AFG in the histopathological, survival and tissue burden studies, AFG was not able to reduce the galactomannan serum concentrations after 7 days of treatment in mice infected with a low inoculum of *A. niger*. A previous study demonstrated that using a similar murine model of invasive aspergillosis, GMI values started to decline after 5 days of therapy [14]. For this reason, a new group of animals was infected with a lower fungal dose to ensure that all animals survived for the 7 days of therapy. In control mice, galactomannan levels were high (mean value 6.67 ± 0.19) and fell very slightly following AFG therapy, although the changes were not significant. In previous studies, we have demonstrated that successful treatment of

A. terreus with posaconazole produces highly significant reductions in galactomannan levels [15]. Our result agrees with other experimental studies with *A. fumigatus* and *A. flavus* in which treatment with echinocandins did not lead to a decrease in galactomannan levels [5,14]. The fungistatic activity of echinocandins has been suggested as the probable cause of maintained galactomannan levels, in contrast to the fungicidal drugs like the azoles that reduce the concentration of this antigen [14].

In summary, we have found a correlation between in vitro activity and in vivo efficacy of AFG in experimental infections by *A. niger*, suggesting a potential role of this drug in the treatment of IA caused by *A. niger*.

Funding: No funding sources.

Competing interests: None declared.

Ethical approved: All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee (Reus, Spain).

References

- [1] Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46:327–60.
- [2] Guarro J, Xavier MO, Severo LC. Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. In: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2010. p. 7–32.
- [3] Verweij PE, Howard SJ, Merchers WJ, Denning DW. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009;12:141–7.
- [4] Pastor FJ, Guarro J. Anidulafungin: experimental therapy of fungal infections in animal models. *Rev Iberoam Micol* 2008;25:119–23 [in Spanish].
- [5] Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Salas V, Guarro J. In vitro activity and in vivo efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1290–2.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 2nd ed. Document M38-A2. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; proposed guideline. Document M51-P. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- [8] Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller MA, Messer S, et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. *J Clin Microbiol* 2007;45:1811–20.
- [9] Fianchi L, Picardi M, Cudillo L, Corbata L, Mele L, Trapè G, et al. *Aspergillus niger* infection in patients with haematological diseases: a report of eight cases. *Mycoses* 2004;47:163–7.
- [10] Shimoni Z, Goldenberg A, Niven M. Fatal invasive pulmonary aspergillosis presenting as profound hypoglycemia in a patient with anorexia nervosa. *Eur J Intern Med* 2006;17:295–7.
- [11] Xavier MO, Sales P Mda, Camargo Jde J, Pasqualotto AC, Severo LC. *Aspergillus niger* causing tracheobronchitis and invasive pulmonary aspergillosis in a lung transplant recipient: case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41:200–1.
- [12] Person AK, Chudgar SM, Norton BL, Tong BC, Stout JE. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *J Med Microbiol* 2010;59:834–8.
- [13] Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Chi J, Prince RA, Tam VH, Lewis RE. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: evidence of concentration-dependent activity. *J Infect Dis* 2004;15:1464–71.
- [14] Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, et al. Establishing in vitro–in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3504–11.
- [15] Salas V, Pastor FJ, Rodríguez MM, Calvo E, Mayayo E, Guarro J. In vitro activity and in vivo efficacy of posaconazole in treatment of murine infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:676–9.

4.9. ¿Son los puntos de corte epidemiológicos valores indicativos de la eficacia *in vivo* de los azoles en aspergilosis experimentales?

Are epidemiological cut-off values predictors of the *in vivo* efficacy of azoles in experimental aspergillosis?

Calvo E, Pastor FJ, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Salas V, Guarro J.

Enviado a la revista International Journal of Antimicrobial Agents, Ms.
Ref. No.: IJAA-D-12-00105

Are epidemiological cut-off values predictors of the in vivo efficacy of azoles in experimental aspergillosis?

Enrique Calvo¹, F. Javier Pastor¹, Deanna A. Sutton², Anette W. Fothergill²,
Michael G. Rinaldi², Valentina Salas¹, Josep Guarro^{1*}

¹ Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

² Fungus Testing Laboratory University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas

- **Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili. Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain. Phone +34 977-759359. Fax: +34 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat**

Abstract

The degree of correlation between in vitro and in vivo responses to triazoles of clinically relevant non-*fumigatus* *Aspergillus* was evaluated in order to try to establish in vivo breakpoints. The in vitro activity of voriconazole (VRC) and posaconazole (POS) against 36 isolates of *Aspergillus flavus* and 18 isolates of *Aspergillus niger* species complexes was determined by broth microdilution and disk diffusion methods. The results of both in vitro techniques correlated for strains with MICs ≤ 1 mg/L, which corresponded with inhibition zone diameters above 17 mm. The efficacy of VRC or POS, both at 25 mg/kg/day, was assessed in a murine model of disseminated infection by testing strains of the two species with different MICs. For *A. flavus*, VRC showed efficacy in survival and fungal load studies against all the strains tested, even for those with MICs above the epidemiological cutoff value (ECV) (1 mg/L). For *A. niger*, VRC drug was ineffective against those strains for which the MIC was one dilution below the corresponding ECV (2 mg/L). POS showed efficacy against all the strains of both species included in the study, although isolates with MICs $>$ ECV were not tested. In this murine study, ECVs of VRC for *A. flavus* and *A. niger* were not reliable indicators of in vivo outcome, and POS MICs lower than or equal to the EVC were associated to in vivo efficacy of the drug.

Keywords: *Aspergillus*, voriconazole, posaconazole, epidemiological cutoff values, murine models

1. Introduction

Invasive aspergillosis is after candidiasis the second most common invasive fungal infection and, despite antifungal therapy, it is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients [1]. VRC is the drug recommended as primary therapy for invasive aspergillosis, POS and Itraconazole being alternatives [2]. However, recently there has been a noticeable increase in clinical *Aspergillus* isolates that are resistant to azoles [3,4]. With the lack of clinical breakpoints for moulds, and in order to identify resistant strains early, epidemiological cut-off values (ECVs) have been proposed for the most clinically important *Aspergillus* species [5]. Based on the analysis of MIC distributions, ECVs have been defined as those critical drug concentrations that would theoretically be able to distinguish drug-susceptible wild-type strains from those with probably-acquired resistance mechanisms [6]. Since ECVs are exclusively in vitro data, animal studies might be particularly helpful for evaluating their usefulness in predicting in vivo outcome [7]. Apart from *Aspergillus fumigatus*, the other species of *Aspergillus* of clinical relevance have been poorly studied in animal models [8,9,10], and the number of strains tested with known in vitro MICs has generally been very low. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, two complexes of species that can usually only be identified by molecular methods [11] are, after *A. fumigatus*, the most common agents of aspergillosis and have emerged in recent years as a cause of severe infections [12]. Despite such increasing clinical importance and their reduced susceptibility to the antifungals with respect to other species of the genus [13,14], such species have received little attention in previous studies.

We have tested isolates of *A. flavus* and *A. niger* that represent the most common POS and VRC MICs in murine models of disseminated infections, trying to determine which in vitro values could be the most predictive of in vivo results.

2. Materials and Methods

2.1 Antifungal susceptibility testing. The in vitro susceptibility to POS and VRC of 34 clinical and 2 environmental isolates of *A. flavus*, and 14 clinical and 4 environmental isolates of *A. niger* was determined. The activity of the drugs was determined by a broth microdilution method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines for moulds [15], and by a disk diffusion method carried out using non-supplemented Mueller-Hinton agar and 6 mm diameter paper discs containing 1 µg of VRC or 5 µg of POS [16]. The ECVs suggested for VRC and POS against *A. flavus* are 1 mg/L and 0.5 mg/L, respectively, while for *A. niger* they are 2 mg/L and 1 mg/L, respectively [5]. Inhibition zone diameters (IZDs) ≥ 17 mm are considered indicators of susceptibility of moulds to these azoles [17].

2.2 In vivo studies. The efficacy of VRC was evaluated against a panel of 8 isolates of *A. flavus* and 8 of *A. niger*, while of POS efficacy was assessed by testing 6 strains of each species. These strains were selected on the basis of the MICs shown in the in vitro study and a wide range of in vitro susceptibility to both antifungals was tested.

On the day of challenge, cultures on potato dextrose agar (PDA) were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of conidia or hyphae. The resulting suspensions were adjusted based on

haemocytometer counts to the desired inoculum and then serial plated on PDA to confirm viability.

Male OF1 mice weighing 30 g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used in this study. Animals were housed under standard conditions. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Animals were immunodepressed one day prior to infection by administering a single dose of 200 mg of cyclophosphamide per kg intraperitoneally plus a single dose of 150 mg of 5-fluorouracil per kg intravenously. To prevent bacterial infections, the mice received ceftazidime (5 mg/day subcutaneously) from days 1 to 7 after infection. Mice infected with *A. flavus* were challenged with conidial suspensions of 2×10^3 colony-forming units (CFU) and those infected with *A. niger* with 2×10^4 CFU, in 0.2 ml of sterile normal saline injected via a lateral tail vein. Preliminary experiments demonstrated that these concentrations were the optimal doses for producing an acute infection, with all animals dying within 10 days (data not shown).

We tested POS (Noxafil, Pfizer Inc. Madrid, Spain) administered orally at 12.5 mg/kg of body weight twice a day, and VRC (Vfend, Pfizer Inc. Madrid, Spain), administered orally at 25 mg/kg of body weight once daily [10]. From 3 days prior to infection, the mice treated with VRC were given diluted (50%) grapefruit juice instead of water [18]. All treatments began 24 h after challenge, and lasted for 7 days. Groups of 20 mice were established for each strain and each treatment. The efficacy of the treatments was evaluated through the prolongation of survival, and the reduction of fungal tissue burden and galactomannan serum levels. Control animals received no treatment. One group of ten mice was

randomly assigned to the survival study and checked daily for 30 days, and the other groups of ten were established for tissue burden studies and sacrificed on day 5 after infection. Kidneys and spleens were aseptically removed and each organ was weighed and homogenized in 2 ml sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA and incubated for 24 hours at 35°C.

2.3 Galactomannan assay. Before being sacrificed, approximately 1 ml of blood from all the mice in the tissue burden groups was extracted by cardiac puncture. Pooled serum samples from the mice of each treatment group were used to determine galactomannan levels by enzyme immunoassay (Platelia *Aspergillus*[®], Bio Rad, Marnes, la Coquette, France) as an additional marker of treatment response. Values were expressed as a galactomannan index (GMI).

2.4 Statistical analysis. Mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups using the Log Rank test. Colony counts in tissue burden studies were analyzed using the Mann-Whitney U test. A *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 *Aspergillus flavus*

Table 1 shows the results of the in vitro activity of VRC and POS against *A. flavus*. MICs and IZD values of VRC ranged from 0.25 to 4 mg/L and from 34 to 22 mm, respectively, while for POS, the values varied from 0.12 to 0.5 mg/L and from 37 to 34 mm, respectively. Figure 1 shows the mean survival time of mice infected with the different *A. flavus* strains after 7 days of therapy. Both azoles

significantly prolonged the survival of the mice, with no significant differences among isolates regardless their MICs, with only one exception for each drug.

Figure 2 shows the results of the tissue burden study in spleens and kidneys. VRC significantly reduced fungal load in both organs for all the strains tested, with the exception of the isolate that showed the highest MIC (4 mg/L). POS significantly reduced the fungal recovery with respect to the control groups in both organs. It showed a similar, good efficacy for those isolates tested (MICs \leq 0.5 mg/L). For VRC, no correlation was observed between MICs $>$ 1 mg/L and a significant decrease of the survival and the tissue burden.

Figure 3 shows the results of the galactomannan determination. Infections caused by isolates for which VRC MICs were \leq 2 mg/L significantly decreased in the levels of the antigen with respect to the control and to the isolate with MIC = 4 mg/L. For POS, the reduction was significant in comparison with the control for all the strains tested. For strains with similar VRC and POS MICs, the galactomannan reduction was approximately 3 times higher after treatments with POS than after those with VRC.

3.2 *Aspergillus niger*

For the *A. niger* strains, the VRC MICs ranged from 0.06 to 8 mg/L and the IZDs from 45 to 11 mm, while those for POS ranged from 0.03 to 1 mg/L and from 48 to 26 mm, respectively (Table1).

VRC was not only able to prolong the survival of the animals infected with the strain with the highest MIC (8 mg/L), this drug showing a better efficacy for strains for which the MICs were 0.12 mg/L (Fig. 4, A). POS significantly prolonged the survival of mice for all the strains tested (Fig. 4, B).

Figure 5 shows the results of the fungal load study in spleens and kidneys. In spleen tissue, VRC significantly reduced the fungal recovery only for those strains with a MIC \leq 0.25 mg/L. In kidneys, VRC significantly decreased the fungal recovery with respect to the controls for all the strains, except for the less susceptible strains, FMR 11251 (MIC = 1 mg/L) and UTHSC 04-3468 (MIC = 8 mg/L). In both organs, VRC significantly reduced the fungal load for MICs \leq 0.12 mg/L. Similarly, POS reduced the spleen fungal load more for MICs = 0.12 mg/L, while for those \geq 0.5 mg/L, and for one = 0.25 mg/L, the drug did not improve the results of the control groups. In contrast, POS reduced the fungal load for all the strains practically to undetectable levels in kidneys.

For *A. niger* strains for which VRC MICs were $<$ 1 mg/L, the drug reduced the galactomannan serum levels in comparison with controls and with the strain UTHSC 04-3468. POS significantly reduced the antigen levels for all the MICs tested. Similarly to that observed in *A. flavus* infections, the reduction in the levels was much more evident in mice treated with POS than in those treated with VRC (Fig. 6).

4. Discussion

Studies that try to correlate in vitro and in vivo results are crucial for establishing clinical breakpoints for azoles and *Aspergillus* species in the future. The current study tested strains of two emerging pathogens as *A. flavus* and *A. niger*, representing the commonest VRC and POS MICs [5]; however, due to their low frequency, isolates of *A. flavus* and *A. niger* for which POS MICs were above the corresponding ECV were not available for this study. We compared two techniques that determine in vitro activity. Considering the ECVs proposed by

the CLSI for filamentous fungi [17], both techniques only correlated for MICs ≤ 1 mg/L, which were associated to IZDs ≥ 17 mm, and for one strain for which the VRC MIC was 8 mg/L and the IZD was 11 mm. The data agrees with previous studies that have shown differences in the results for azoles and for *Aspergillus* species, since they have only shown correlation for isolates susceptible or very resistant to these drugs [19].

For *A. flavus*, our survival and tissue burden results showed a good efficacy of POS against mice infected with isolates with MICs lower or equal to the corresponding ECV. Similarly, previous studies have shown the efficacy of this drug in infections by strains of *A. fumigatus* with POS MICs = ECV (0.5 mg/L) [20]. VRC showed efficacy even against strains for which the MICs were above the ECVs. This fact suggests that, for this drug and this species, these ECVs could be too low to be a reliable predictor of in vivo failure. The results agree with a previous experimental study with *A. fumigatus* that demonstrated the efficacy of VRC against one strain for which the MIC was higher than the ECV [21]. Despite all the strains tested with VRC MICs ≤ 2 mg/L showing significant survival prolongation and reduction in the fungal load in comparison with the respective controls, there was a marked variability in the results among such isolates, mainly in reducing tissue burden. The linear progression in MIC values did not correlate to a similar decrease in efficacy, this fact already having been reported in a clinical study that analyzed 115 *A. fumigatus* infections treated with VRC for 6 or 12 weeks [22].

Our results for *A. niger* infections also showed a good efficacy of POS for those isolates with MICs \leq ECV. On the contrary, the VRC efficacy for this species was lower against isolates with MICs ≥ 1 mg/L, i.e. one dilution below the ECV.

For both species, the levels of galactomannan were notably higher in mice treated with POS compared to those treated with VRC. This difference might be explained by the reported time-dependent fungicidal activity of VRC against *Aspergillus* species [23], which would justify the reduction in galactomannan levels after only 4 days of treatment.

There have been no clinical studies reported that have compared outcomes of infections by *A. flavus* or *A. niger* treated with VRC or POS with in vitro susceptibility data. In a case report for each of these species where VRC failed, the in vitro susceptibility of the isolates was not determined [24,25]. Our results agree with clinical data available for invasive infections by *A. fumigatus*, where a VRC MIC higher than the ECV was not a marker of therapy failure [22,26], since it has only been reported for infections caused by highly resistant strains [27,28]. Regarding POS, it has been successfully used against *A. fumigatus* infections in isolates for which the drug showed MICs = ECV [29,30], the clinical efficacy of this drug against *Aspergillus* isolates with MICs > ECV remaining unknown.

In conclusion, our study shows that, similar to results observed in experimental and clinical *A. fumigatus* infections, the VRC ECVs for *A. flavus* and *A. niger* have an uncertain in vivo predictive value. POS was effective against strains for which the MICs did not exceed the corresponding ECV. These results suggest that, despite the proposal that the ECVs are an important advance in the detection of resistant isolates, they must be treated with caution in the clinical setting. In order to refine the in vivo relevance of the ECVs, further animal studies might be particularly useful, testing a greater number of isolates that represent all the reported MICs.

Acknowledgements

We thank Pilar Hernández for her statistical assistance.

References

- [1] Marr KA. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med Mycol* 2008; 46: 293-302.
- [2] Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guideline of the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 327-60.
- [3] Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1068-76.
- [4] Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 789-95.
- [5] Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, et al. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the triazoles. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 586-90.
- [6] Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, Rex JR, Alexander BD et al. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3142-6.

- [7] Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1447-66.
- [8] Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Salas V, Guarro J. In vitro and in vivo efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1290-2.
- [9] Salas V, Pastor FJ, Rodríguez MM, Calvo E, Mayayo E et al. In vitro activity and in vivo efficacy of posaconazole in treatment of murine infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 676-9.
- [10] Warn PA, Sharp A, Mosquera J, Spickermann J, Schmitt-Hoffmann A, et al. Comparative in vivo activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 1198-207.
- [11] Samson RA, Varga J, Frisvad JC. Taxonomic studies of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 2011; 69: 1-97.
- [12] Erjavec Z, Kluin-Nelemans, Verweij PE. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 625-33.
- [13] Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 2007; 153: 1677-92.
- [14] Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Species identification and antifungal susceptibility

patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4514-7.

- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard-second edition. Document M38-A2. CLSI, Wayne, PA. USA, 2008.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi: approved guideline. Document M51-A. CLSI, Wayne, PA. USA, 2010.
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; informational supplement. Document M51-S1 (proposed). CLSI, Wayne, PA. USA, 2009.
- [18] Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med Mycol* 2000; 38: 209-12.
- [19] Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller MA, et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1811-20.
- [20] Mavridou E, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 860-5.

- [21] Mavridou E, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Verweij PE, Mouton JW. Impact of *cyp51A* mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4758-64.
- [22] Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, et al. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3271-5.
- [23] Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45: 649-63.
- [24] Mittal V, Mittal R, Sharma PC. Voriconazole-refractory fungal infection of phacoemulsification tunnel. *Indian J Ophthalmol* 2010; 58: 434-7.
- [25] Person AK, Chudgar SM, Norton BL, Tong BL, Stout JE. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *J Med Microbiol* 2010; 59: 834-8.
- [26] Warris A, Weemaes CM, Verweij PE. Multidrug resistance in *Aspergillus fumigatus*. *N Engl J Med* 2002; 347: 2173-4.
- [27] Kuipers S, Brüggemann RJ, de Sévaux RG. Failure of posaconazole therapy in a renal transplant patient with invasive aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus* with attenuated susceptibility to posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3564-6.
- [28] Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125: S3-S13.

- [29] Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1481-3.
- [30] Hodiamont CJ, Dolman KM, Ten Berge IJ. Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med Mycol* 2009; 47: 210-7.

Table 1. In vitro activity of voriconazole (VRC) and posaconazole (POS) against 36 isolates of *A. flavus* and 18 isolates of *A. niger*.

Species	Strain	VRC		POS	
		MIC(mg/L)	IZD(mm)	MIC(mg/L)	IZD(mm)
<i>A. flavus</i>	UTHSC 05-2864	0.12	32	-	-
	UTHSC 09-2766	-	-	0.12	37
	UTHSC 10-3191	0.25	34	-	-
	UTHSC 10-2099	0.25	31	0.25	35
	UTHSC 09-2752	-	-	0.25	36
	UTHSC 10-1094	0.25	36	0.12	38
	UTHSC 10-516	0.25	37	0.12	37
	FMR 9962	0.5	32	0.25	37
	FMR 7147	0.5	30	0.25	38
	FMR 9961	0.5	35	0.25	38
	FMR 10206	0.5	32	0.25	42
	FMR 10200	0.5	30	0.5	38
	FMR 8750	0.5	38	0.25	38
	FMR 8768	1	32	0.5	37
	FMR 10055	1	38	0.25	36
	FMR 10224	1	30	0.25	35
	FMR 10084	1	27	0.25	37
	FMR 10207	1	28	0.5	36
	FMR 9966	1	32	0.5	37
	FMR 10221	1	28	0.5	34
	FMR 9965	1	28	0.5	35
	FMR 9981	1	27	0.5	36
	FMR 9978	1	35	0.5	38
	FMR 10081	1	31	0.25	30
	FMR 10225	1	39	0.5	30
	FMR 8760	1	36	0.25	38
	FMR 10229	1	37	0.25	35
	FMR 9960	1	33	0.25	35
	FMR 10065	1	27	0.25	36
	FMR 8757	1	28	0.5	37
	FMR 8756	1	30	0.5	39
	FMR 9977	1	31	0.5	37
	FMR 10223	1	35	0.5	37
	FMR 11893	1	27	0.5	35
	FMR 10205	2	25	0.5	34
	UTHSC 06-305	4	22	0.5	33
<i>A. niger</i>	UTHSC 08-2492	0.06	45	-	-
	UTHSC-1665	0.06	46	-	-
	UTHSC-2050	0.12	45	-	-
	UTHSC-828	0.12	40	-	-
	UTHSC-4357	1	27	0.25	34
	UTHSC-3966	-	-	0.03	48
	UTHSC-3468	8	11	0.25	35
	UTHSC-1740	-	-	0.25	36
	FMR 11249	0.25	36	0.12	45
	FMR 11252	0.25	26	0.25	39
	FMR 11250	0.5	26	0.5	31
	FMR 11254	0.5	23	0.5	34
	FMR 9394	0.5	35	0.5	37
	FMR 11248	0.5	22	0.5	27
	FMR 11253	0.5	24	0.5	27
	FMR 11251	1	22	0.5	29
	FMR 9393	1	17	0.5	32
	FMR 7156	1	20	1	32
<i>P. variotii</i>	ATCC MYA-3630	0.12	44	0.25	40

UTHSC, University of Texas Health Science Center; FMR, Faculty of Medicine of Reus; MIC, minimal inhibitory concentration; IZD, inhibition zone diameter.

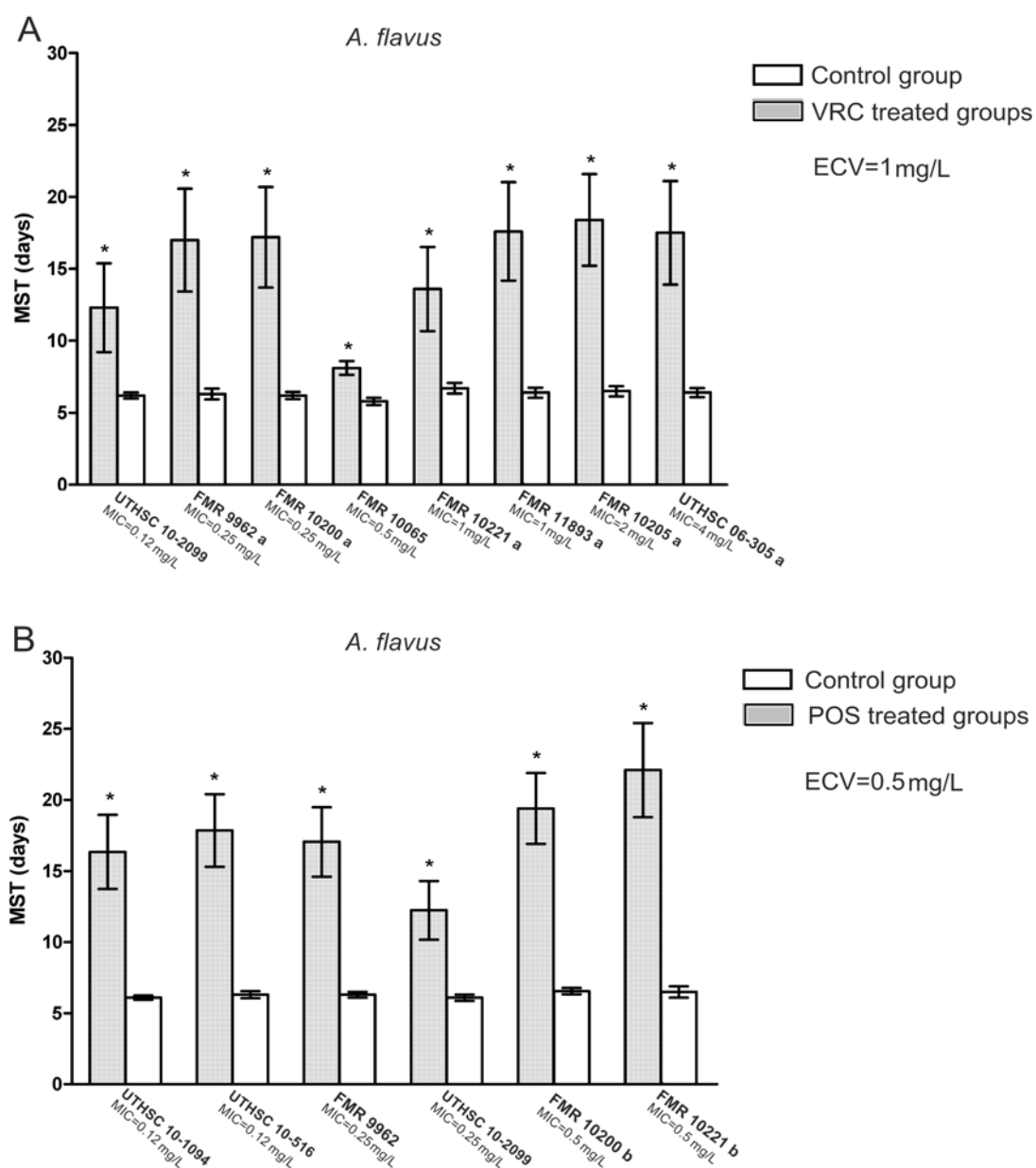


Fig. 1. Mean survival time of mice infected with *A. flavus* after therapy with voriconazole (VRC) (A) or posaconazole (POS) (B). * $P < 0.05$ versus control; a, $P < 0.05$ versus FMR 10065; b, $P < 0.05$ versus UTHSC 10-2099.

UTHSC, University of Texas Health Science Center; FMR, Faculty of Medicine of Reus; ECV, Epidemiological cut-off value; MIC, minimal inhibitory concentration.

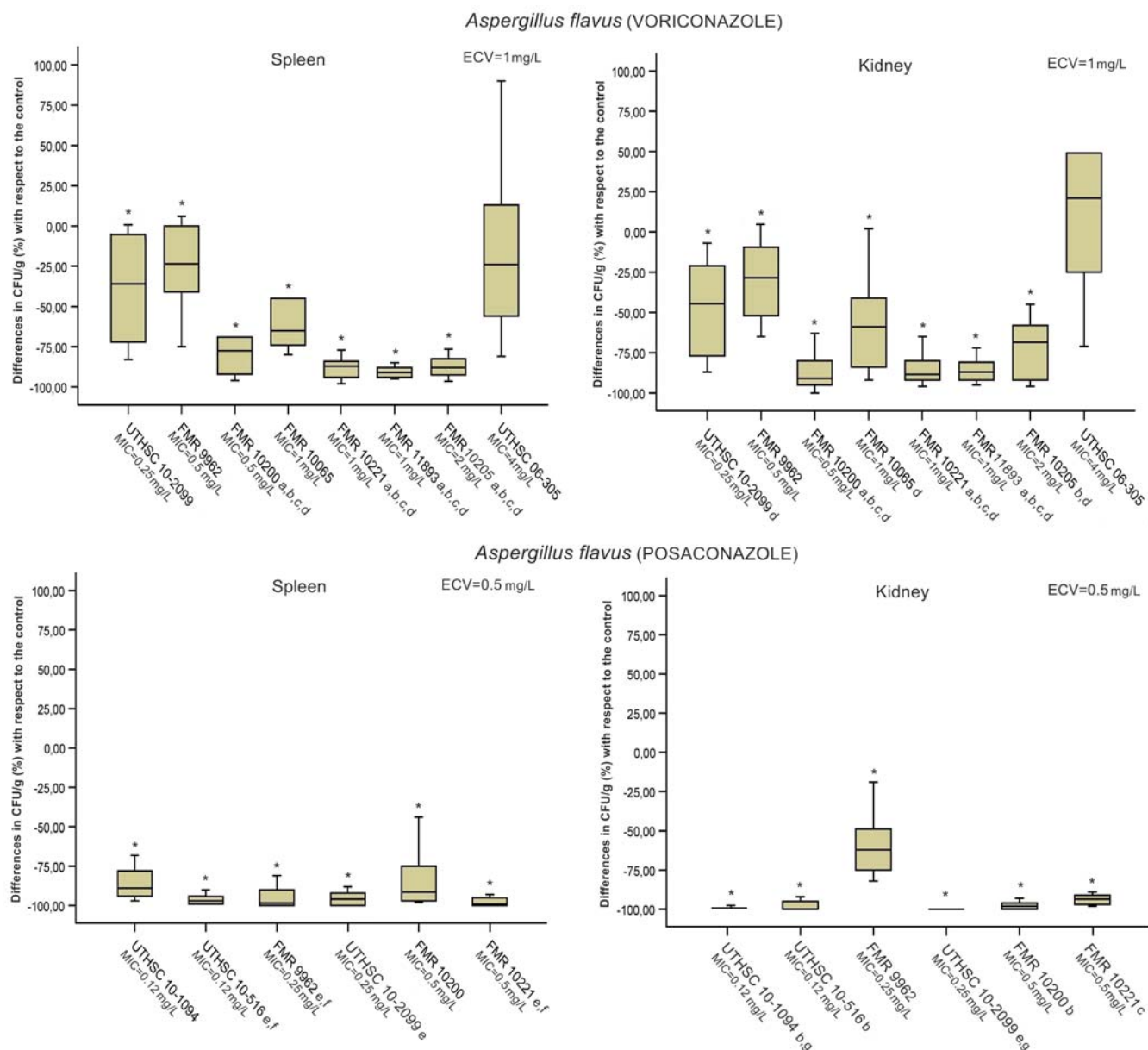


Fig. 2. Box-plot of changes in fungal load of mice infected with 2×10^3 CFU of *A. flavus* with respect to the respective control in spleen and kidney of mice treated with voriconazole or posaconazole. *, $P < 0.05$ versus control; a, $P < 0.05$ versus UTHSC 10-2099; b, $P < 0.05$ versus FMR 9962; c, $P < 0.05$ versus FMR 10065; d, $P < 0.05$ versus UTHSC 06-305; e, $P < 0.05$ versus UTHSC 10-1094; f, $P < 0.05$ versus FMR 10200; g, $P < 0.05$ versus FMR 10221. Horizontal lines indicate median values.

UTHSC, University of Texas Health Science Center; FMR, Faculty of Medicine of Reus; ECV, Epidemiological cut-off value; MIC, minimal inhibitory concentration.

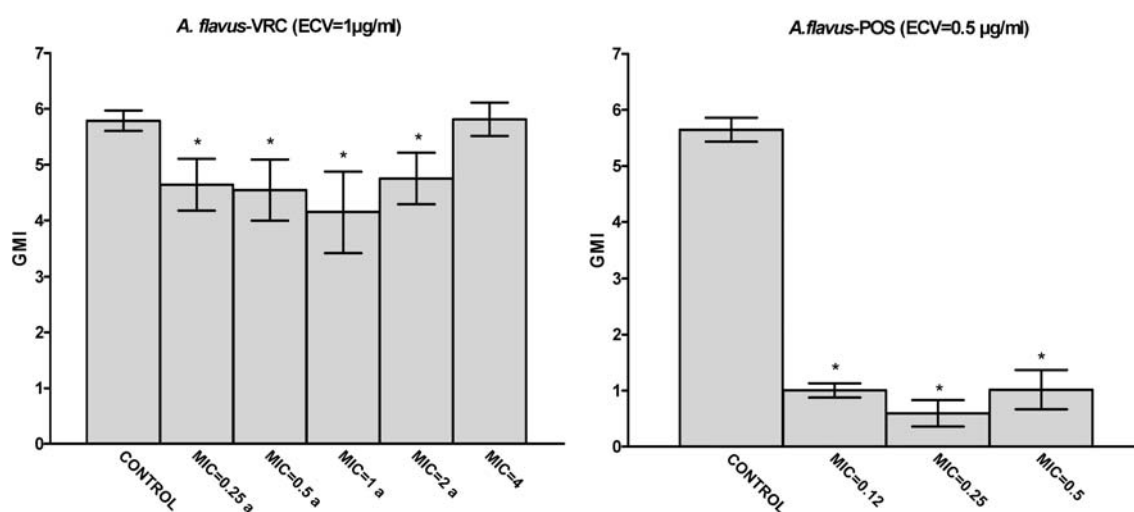


Fig. 3. Galactomannan serum levels in mice infected with *A. flavus* on day 5 after challenge, treated with voriconazole (VRC) or posaconazole (POS). MICs are expressed as mg/L. *, $P < 0.05$ versus control; a, $P < 0.05$ versus 4.

GMI, galactomannan index; ECV, Epidemiological cut-off value; MIC, minimal inhibitory concentration.

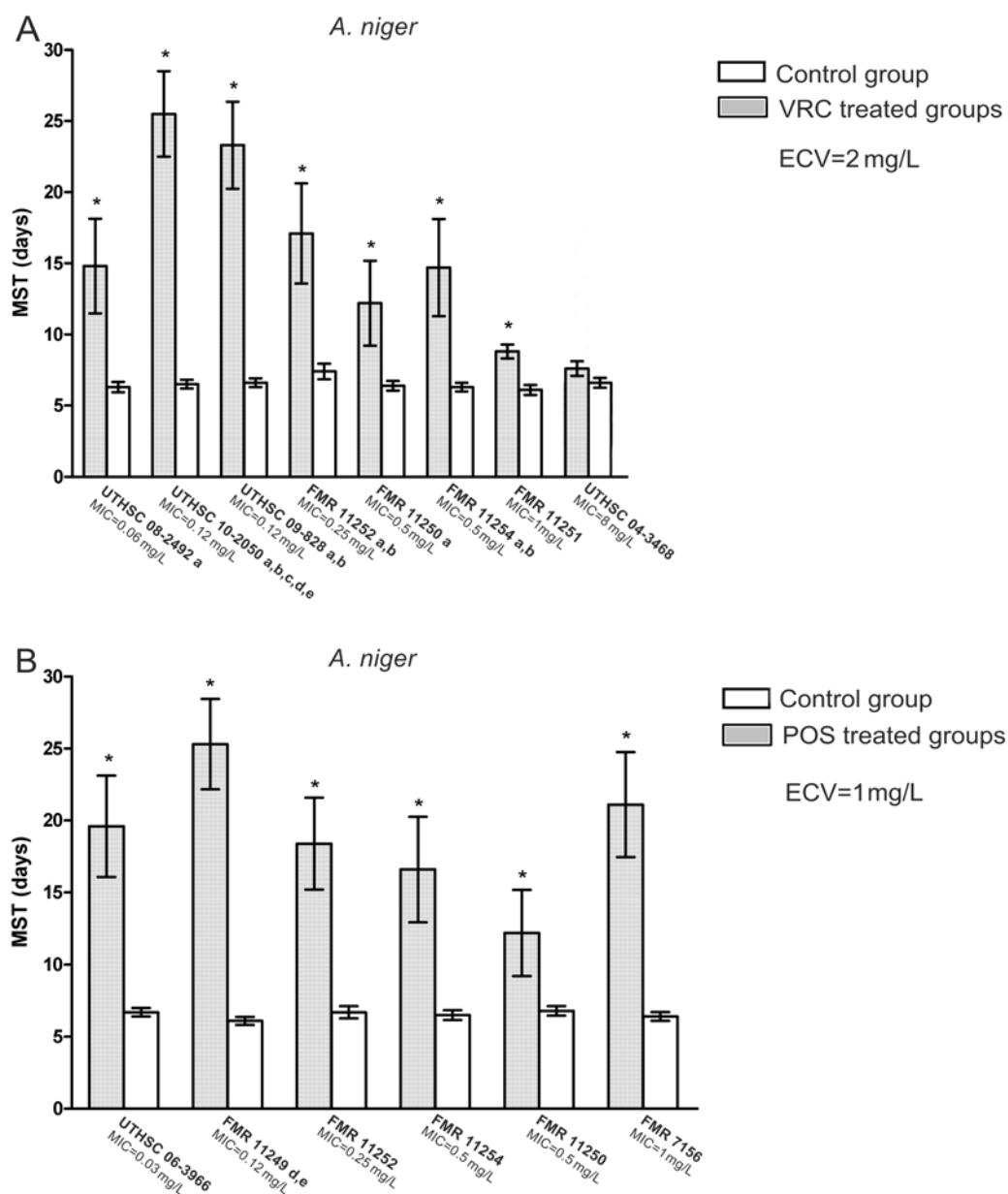


Figure 4. Mean survival time of mice infected with *A. niger* after therapy with voriconazole (VRC) (A) or posaconazole (POS) (B). * $P < 0.05$ versus control; a, $P < 0.05$ versus UTHSC 04-3468; b, $P < 0.05$ versus FMR 11251; c, $P < 0.05$ versus UTHSC 08-2492; d, $P < 0.05$ versus FMR 11250; e, $P < 0.05$ versus FMR 11254.

UTHSC, University of Texas Health Science Center; FMR, Faculty of Medicine of Reus; ECV, Epidemiological cut-off value; MIC, minimal inhibitory concentration.

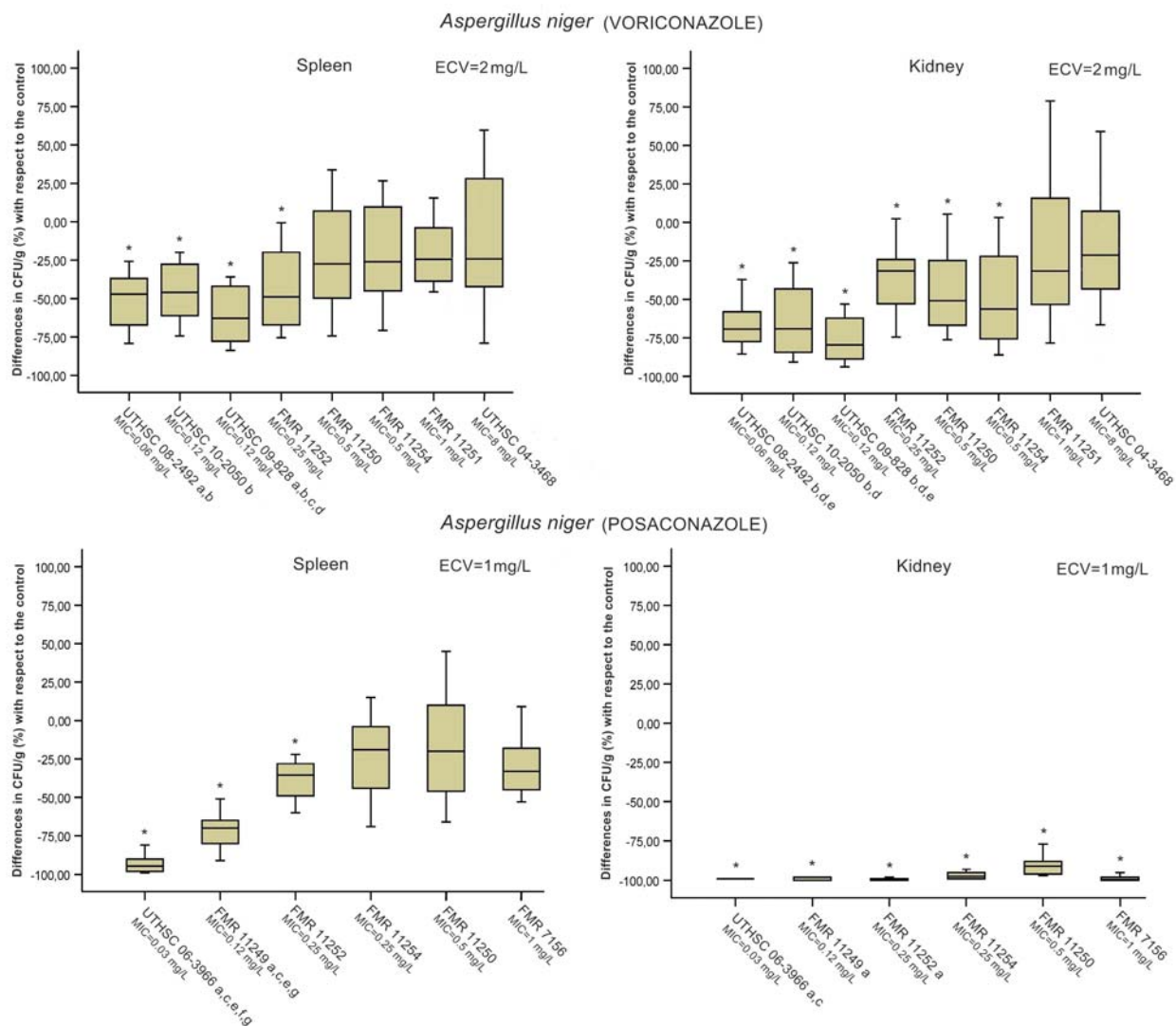


Figure 5. Box-plot of changes in fungal load of mice infected with 2×10^4 CFU of *A. niger* with respect to the respective control in spleen and kidney of mice treated with voriconazole or posaconazole. *, $P < 0.05$ versus control; a, $P < 0.05$ versus FMR 11250; b, $P < 0.05$ versus FMR 11251; c, $P < 0.05$ versus FMR 11254; d, $P < 0.05$ versus UTHSC 04-3468; e, $P < 0.05$ versus FMR 11252; f, $P < 0.05$ versus FMR 11249; g, $P < 0.05$ versus FMR 7156. Horizontal lines indicate median values.

UTHSC, University of Texas Health Science Center; FMR, Faculty of Medicine of Reus; ECV, Epidemiological cut-off value

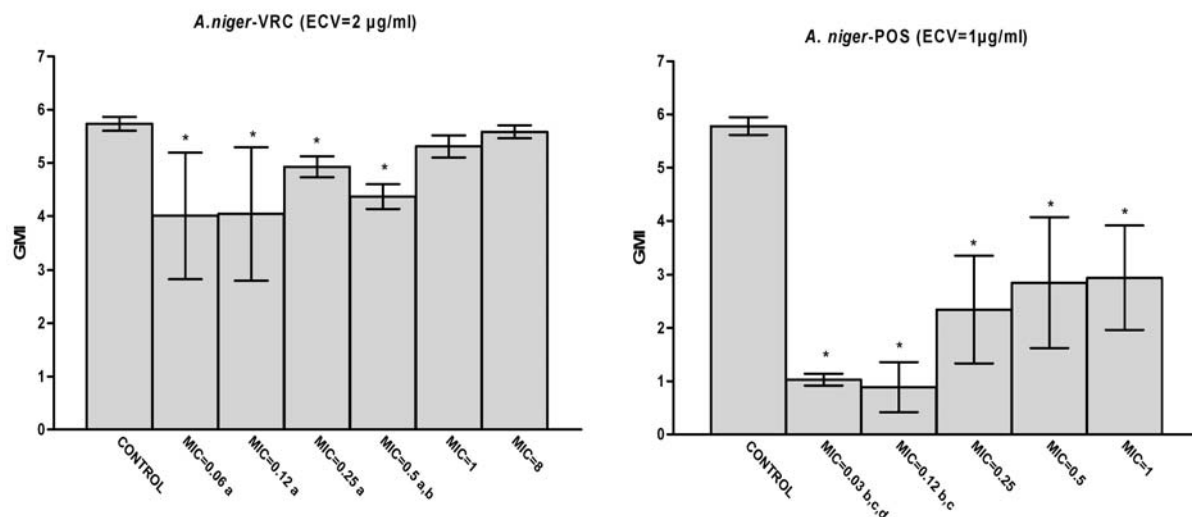


Figure 6. Galactomannan serum levels in mice infected with *A. niger* on day 5 after challenge, treated with voriconazole (VRC) or posaconazole (POS). MICs are expressed as mg/L. *, $P < 0.05$ versus control; a, $P < 0.05$ versus 8; b, $P < 0.05$ versus 1; c, $P < 0.05$ versus 0.5; d, $P < 0.05$ versus 0.25.

GMI, galactomannan index; ECV, Epidemiological cut-off value; MIC, minimal inhibitory concentration.

5. DISCUSIÓN

5.1. Cromoblastomycosis

La cromoblastomycosis es una infección característica de zonas tropicales y subtropicales que afecta a tejidos cutáneos y subcutáneos. Aunque muchas especies de hongos dematiáceos pueden ser responsables, *Fonsecaea pedrosoi* y *Cladophialophora carrionii* son los principales agentes causales de este proceso infeccioso. En la actualidad no existe tratamiento de elección para la cromoblastomycosis. En general, las terapias actuales se basan en tratamientos de larga duración que no siempre evitan las recidivas del proceso infeccioso. El uso del itraconazol o de la terbinafina está ampliamente extendido, sin embargo la administración del itraconazol durante un largo periodo de tiempo puede inducir la aparición de organismos resistentes al fármaco (Andrade *et al.*, 2004; Bonifaz *et al.*, 2004), a la vez que su uso también se ha asociado a casos de insuficiencia cardiaca congestiva (Fung *et al.*, 2008). La terbinafina es un fármaco eficaz y bien tolerado en el tratamiento de esta infección, obteniéndose con él tasas de curación de entre el 45 y el 70%, con una tasa de aparición de efectos secundarios en el 2-10% de los tratados (Bonifaz *et al.*, 2004; Bonifaz *et al.*, 2005). Por otro lado, el porcentaje de casos en los que el fármaco fracasa y la posibilidad de producción de hepatitis colostásica (Ajit *et al.*, 2003; Burstein *et al.*, 2004), hacen necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas.

5.1.1. *Fonsecaea pedrosoi*

Debido a las limitaciones actuales en el tratamiento de la cromoblastomycosis, decidimos comparar la eficacia de la terbinafina y el itraconazol, los fármacos más utilizados contra esta infección, frente a la del posaconazol y el voriconazol, fármacos que, a pesar de haber sido poco utilizados en clínica en este tipo de infecciones, se presentan como alternativas a considerar debido a los buenos resultados que han mostrado frente a hongos dematiáceos (Negroni *et al.*, 2004; Al-Abdely *et al.*, 2005; Lyons *et al.*, 2005; Takei *et al.*, 2007; Koo *et al.*, 2010). Con este objetivo decidimos desarrollar un modelo de cromoblastomycosis causada por *F. pedrosoi* en ratones a partir de modelos experimentales descritos en la

literatura. Sin embargo, a pesar de repetir las mismas condiciones experimentales, inicialmente no fuimos capaces de reproducir la infección, posiblemente debido a la diferente virulencia existente entre aislados o, en el caso del modelo de infección intraperitoneal desarrollado por Cardona-Castro y Agudelo-Flórez (Cardona-Castro y Agudelo-Flórez 1999), por la baja frecuencia de signos cutáneos que producía esta vía de infección. Finalmente, pudimos obtener un modelo repetible de cromoblastomycosis crónica infectando subcutáneamente ratones atímicos (Ahrens *et al.*, 1989). La inmunodeficiencia debida a la falta de células T en estos animales facilitó el establecimiento de la infección, ya que estas células desempeñan una labor básica en el mecanismo de defensa del huésped frente a *F. pedrosoi* (Ahrens *et al.*, 1989).

Una vez obtenido el modelo, la evaluación de la eficacia de dos dosis diferentes de itraconazol, terbinafina, posaconazol y voriconazol se realizó a partir de la evolución del tamaño de las lesiones, junto con estudios histopatológicos y siembra en medios de cultivos de las mismas. Tras cuatro meses de tratamiento, pudimos comprobar que el posaconazol fue el fármaco más efectivo en reducir el tamaño de las lesiones y el porcentaje de cultivos positivos del hongo a partir de tejido afectado. En estudios experimentales anteriores se ha demostrado que el posaconazol es eficaz frente a infecciones causadas por hongos dematiáceos (Graybill *et al.*, 2004; Mariné *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2010) incluyendo la cromoblastomycosis (Defavery y Graybill, 1990). En el ámbito clínico también se ha constatado la eficacia del posaconazol frente a este tipo de hongos, ya que ha sido efectivo en el tratamiento de feohifomicosis cerebrales y diseminadas (Negroni *et al.*, 2004; Al-Abdely *et al.*, 2005), e incluso en casos de cromoblastomycosis causadas por *F. pedrosoi* que no respondieron a la terbinafina ni al itraconazol (Negroni *et al.*, 2005). Nuestros resultados y los antecedentes comentados, unidos a su buena tolerancia en terapias prolongadas y su capacidad para penetrar en capas profundas de la piel (Raad II *et al.*, 2006; Krishna *et al.*, 2010), convierten al posaconazol en un fármaco a tener en cuenta para el tratamiento de la cromoblastomycosis.

Aunque se han detectado aislados de *F. pedrosoi* resistentes al itraconazol (Pranidaud y Bolzinger, 1991; Poirriez *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2004),

este fármaco sigue siendo el más utilizado frente a esta infección (Bonifaz *et al.*, 2001). En nuestro estudio, especialmente tras la administración de la dosis más alta, se pudo observar una buena eficacia del itraconazol en el tratamiento de la infección experimental.

Por su parte, el voriconazol ha mostrado una buena actividad *in vitro* frente a hongos dematiáceos (Espinell-Ingroff *et al.*, 2001). Este fármaco ha sido administrado con éxito en casos de feohifomicosis cutáneas, (Queiroz-Telles *et al.*, 2011) y, debido a su buena penetración en cerebro (Johnson y Kauffman, 2003), también en feohifomicosis cerebrales, aunque en este último caso con resultados contradictorios (Fica *et al.*, 2003; Takei *et al.*, 2007; Koo *et al.*, 2010). La experiencia clínica del uso del voriconazol frente a cromoblastomicosis, se limita a cuatro casos causados por *F. pedrosoi* con pobre respuesta al itraconazol y a la terbinafina, en los que se observó una moderada mejoría tras su administración. Bajo nuestras condiciones experimentales, el voriconazol fue ineficaz frente a la infección, ya que se observó un aumento en el tamaño de las lesiones, una elevada respuesta inflamatoria en las mismas y la ineficacia del antifúngico para evitar el crecimiento del hongo en los cultivos de tejido.

Debido a su elevada eficacia y buena tolerabilidad, se considera a la terbinafina como una de las mejores opciones para el tratamiento de la cromoblastomicosis (Queiroz-Telles *et al.*, 2009). Nuestros resultados mostraron que este fármaco a una dosis de 250 mg/kg/día, evitó la diseminación de la infección y redujo la respuesta inflamatoria de una manera similar a la del posaconazol y el itraconazol. Sin embargo, la terbinafina fue menos eficaz en reducir el tamaño de las lesiones y en disminuir el número de cultivos de tejido positivos en comparación con estos dos azoles.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio fueron publicados en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55:3709-3713.

5.1.2. *Cladophialophora carrionii*

El éxito del tratamiento de la cromoblastomicosis depende de diversos factores, tales como la severidad del proceso infeccioso y la etapa en la que se encuentra, o el agente causal, ya que *Cladophialophora carrionii* y

Phialophora verrucosa parecen ser especies más sensibles a los fármacos antifúngicos que otras que especies que provocan esta infección, como *F. pedrosoi* (Bonifaz *et al.*, 2004).

En nuestro estudio determinamos la actividad *in vitro* del itraconazol, de la terbinafina, del posaconazol y del voriconazol frente a un aislado de *C. carrionii*, el cual, con el objetivo de estudiar la eficacia *in vivo* de los fármacos, fue posteriormente utilizado en un modelo de cromoblastomycosis experimental en ratones atímicos similar al de nuestro estudio anterior con *F. pedrosoi*. De esta manera y en base a los resultados obtenidos en el estudio anterior, se pretendió comparar y evaluar la eficacia del posaconazol y del voriconazol frente a las dos especies más frecuentes causantes de cromoblastomycosis.

En concordancia con estudios previos de sensibilidad *in vitro* (González *et al.*, 2005; Vitale *et al.*, 2009), los datos que obtuvimos mostraron una buena actividad de los fármacos analizados. En el estudio *in vivo* se observó que la administración de terbinafina o de voriconazol únicamente fue capaz de limitar el crecimiento de las lesiones, mientras que el posaconazol fue el único fármaco cuya administración produjo una reducción del tamaño de las lesiones al final del tratamiento. Sin embargo, tras cuatro meses de tratamiento, los cultivos de tejido afectado presentaron crecimiento fúngico en todos los casos. Nuestro estudio, la primera aportación al tratamiento experimental de cromoblastomycosis causada por *C. carrionii*, reveló resultados similares a los obtenidos en estudios previos realizados con *F. pedrosoi* en los se demostró una buena eficacia del posaconazol (Defavery y Graybill, 1991; Calvo *et al.*, 2011), siendo ésta incluso mayor que la mostrada por el itraconazol, la terbinafina y el voriconazol (Calvo *et al.*, 2011). Estos resultados no difieren de los descritos en los escasos casos clínicos de cromoblastomycosis por *C. carrionii*, ya que corroboran que tanto la terbinafina como el itraconazol son fármacos en general efectivos (Esterre *et al.*, 1996; Pradeepkumar y Joseph, 2011). Hasta la fecha, no se han descrito casos de infecciones causadas por *C. carrionii* tratadas con voriconazol, mientras que el posaconazol se ha utilizado con éxito en un caso de infección en un paciente trasplantado de hígado y páncreas (Dupont *et al.*, 2010). A pesar de la buena eficacia de los dos azoles, especialmente del posaconazol, su uso se ve muy limitado debido al elevado precio de

estos fármacos, lo cual es difícilmente asumible en las zonas donde esta infección es endémica.

Los resultados de este estudio se publicaron en la revista *Journal of Antimicrobial Agents* doi:10.1093/jac/dkr537.

5.2. Feohifomicosis sistémicas

La feohifomicosis sistémica es un proceso infeccioso grave, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, cuya frecuencia ha aumentado en los últimos años (Revankar *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2009). Tradicionalmente, los fármacos que han mostrado mayor eficacia y, por lo tanto, los más utilizados en este tipo de infecciones son el itraconazol (Surash *et al.*, 2005, Revankar, 2006, Queiroz-Telles *et al.*, 2009) y la anfotericina B desoxicolato (Nóbrega *et al.*, 2003, Surash *et al.*, 2005). Sin embargo, la toxicidad de la anfotericina B limita su uso especialmente en terapias tan prolongadas como las requeridas en este tipo de infecciones (Queiroz-Telles *et al.*, 2009). Por su parte, la administración del itraconazol puede dar lugar a trastornos de la conductividad cardiaca (Kaukonen *et al.*, 1997, Okamoto *et al.*, 2007) y a la aparición de resistencias a este fármaco (Andrade *et al.*, 2004, Queiroz-Telles *et al.*, 2009). Todo ello justifica la realización de estudios encaminados a la investigación de terapias alternativas para el tratamiento de estas infecciones.

5.2.1. *Fonsecaea monophora*

Fonsecaea monophora es una especie causante de feohifomicosis cerebrales (Surash *et al.*, 2005; Nóbrega *et al.*, 2006; Takei *et al.*, 2007; Koo *et al.*, 2010) y cromoblastomicosis (Xi *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Najafzadeh *et al.*, 2010), que ha sido recientemente segregada de *Fonsecaea pedrosoi* (de Hoog *et al.*, 2004). Ambas especies son muy similares morfológicamente pero diferirían en el espectro de infección, ya que *F. pedrosoi* parece estar exclusivamente asociada a casos de cromoblastomicosis, mientras que *F. monophora* puede causar también infecciones en el sistema nervioso central (de Hoog *et al.*, 2004). Sin

embargo, el hecho de que se trate de una especie relativamente nueva, conlleva que se conozca muy poco sobre la virulencia y la sensibilidad a los antifúngicos de este hongo, haciendo necesario el desarrollo de métodos experimentales para su estudio.

Por esta razón, realizamos estudios comparativos de la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* de la anfotericina B, del itraconazol y, considerando las limitaciones de estos fármacos anteriormente comentadas, también la de una posible alternativa como el posaconazol. En los estudios *in vitro* e *in vivo* utilizamos dos aislados clínicos de *F. monophora*, uno de ellos proveniente de un absceso cerebral. El itraconazol y, especialmente el posaconazol, fueron los fármacos que mejor actividad *in vitro* presentaron frente a los dos aislados. Para realizar el estudio *in vivo* provocamos una infección diseminada en ratones neutropénicos la cual invadió tejido cerebral, aunque en menor medida que el resto de órganos estudiados: bazo, riñón, hígado y pulmón. Los resultados del estudio con antifúngicos mostraron una elevada correlación entre la buena actividad *in vitro* del posaconazol, la concentración de dicho fármaco en suero y cerebro, y su eficacia, incluso a dosis bajas, para prolongar la supervivencia y disminuir la carga fúngica en los órganos estudiados.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios similares realizados con otros hongos dematiáceos (Graybill *et al.*, 2004; Mariné *et al.*, 2009) y con los de casos clínicos en los que el posaconazol fue eficaz en el tratamiento de feohifomicosis sistémicas con afectación cerebral (Al-Abdely *et al.*, 2005; Pitisuttithum *et al.*, 2005). En cambio, y a pesar de haber sido un fármaco muy utilizado para el tratamiento de este tipo de infecciones, la eficacia de la anfotericina B en nuestro estudio fue escasa, coincidiendo nuestros datos con los pobres resultados clínicos obtenidos con este fármaco en el tratamiento de las feohifomicosis (Revankar, 2002). Por su parte, el uso del itraconazol contra este tipo de infecciones está ampliamente aceptado (Revankar, 2006); sin embargo, en nuestro estudio, el itraconazol presentó unos resultados similares a los de la anfotericina B, siendo en ambos casos claramente inferiores a los mostrados por el posaconazol.

Los resultados de este estudio se publicaron en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54:919-923.

5.2.2. *Exophiala* spp.

Exophiala es el principal género relacionado con feohifomicosis sistémicas, siendo *E. dermatitidis*, *E. oligosperma* y *E. xenobiotica* las especies aisladas más frecuentemente en este tipo de infecciones (Zeng *et al.*, 2007). Debido a su reciente descripción (de Hoog *et al.*, 2003; de Hoog *et al.*, 2006), resulta difícil evaluar la incidencia real de las infecciones causadas por *E. oligosperma* y *E. xenobiotica*, ya que es posible que muchos de los casos hayan sido atribuidos a *Exophiala jeanselmei*, la especie de la cual fueron separadas. De la misma manera, se desconoce si estas dos especies poseen un poder patógeno distinto al de *E. dermatitidis*, hasta la fecha la especie considerada como la más virulenta del género. Debido a esta falta de datos sobre la virulencia de las dos especies nuevas, consideramos interesante realizar un estudio que nos permitiera comparar a *E. dermatitidis*, *E. oligosperma* y *E. xenobiotica* en base a la mortalidad y a la invasión fúngica en órganos producidas en un modelo de infección diseminada en el ratón inmunocomprometido.

E. dermatitidis se asocia comúnmente a casos de fungemia (Nachman *et al.*, 1996) y a abscesos cerebrales (Matsumoto *et al.*, 1993; Horr  y de Hoog, 1999; Chang *et al.*, 2000). En nuestro estudio se pudo observar la elevada virulencia y la gran capacidad de *E. dermatitidis* para invadir tejido cerebral, confirmándose así datos obtenidos en estudios anteriores (Dixon *et al.*, 1987; Dixon *et al.*, 1989; Graybill *et al.*, 2004).

Por su parte, aunque con una menor incidencia que *E. dermatitidis*, *E. oligosperma* se ha descrito como agente causal en humanos de fungemias e infecciones cutáneas, subcutáneas y profundas (Zeng *et al.*, 2007; Al-Obaid *et al.*, 2006; González-López *et al.*, 2007). Nuestros resultados en el modelo animal de infección diseminada demostraron que una de las cepas ensayadas de *E. oligosperma*, procedente del único caso descrito de infección del sistema nervioso central causada por esta especie (Tintelnot *et al.*, 1991; de Hoog *et al.*, 2006), provocó una elevada mortalidad en los ratones, similar a la causada por las cepas de *E. dermatitidis*. La elevada virulencia de esta cepa, al contrario de lo observado en las infecciones por *E. dermatitidis*, no se correlacionó con una invasión masiva en cerebro, sin

embargo, ambas especies mostraron un gran capacidad para invadir tejido pulmonar.

La mayoría de infecciones producidas por *E. xenobiotica* en humanos afectan a tejidos cutáneos y subcutáneos (Zeng *et al.*, 2007; Aoyama *et al.*, 2009; Morio *et al.*, 2012), aunque se ha descrito un caso de infección diseminada (Zeng *et al.*, 2007). En nuestro modelo experimental en el ratón, la inoculación intravenosa de esta especie dio lugar a infecciones diseminadas que permitieron aislar el hongo de todos los órganos analizados, aunque la mortalidad producida fue significativamente menor que la causada por las otras dos especies.

El estudio histopatológico únicamente mostró daño tisular en los órganos de los animales infectados con la cepa más virulenta de *E. dermatitidis*. Probablemente, la falta de signos de lesión causados por *E. oligosperma* y *E. xenobiotica* se debió a una extracción previa a la aparición de daños visibles o, en el caso de la segunda especie, a su baja virulencia. Los datos obtenidos demostraron una mayor virulencia de *E. dermatitidis* y una alta mortalidad en las infecciones causadas por *E. oligosperma*, sugiriendo estos resultados la necesidad de realizar más estudios para evaluar la patogenicidad de esta especie.

Los resultados obtenidos en este estudio se publicaron en la revista *Medical Mycology* 2010; 48:853-857.

Existen pocos datos sobre la sensibilidad a los antifúngicos de *E. oligosperma* y *E. xenobiotica* (Fothergill *et al.*, 2009), lo cual junto a la falta de modelos experimentales que permitan evaluar la eficacia *in vivo* de los fármacos frente a estas especies, nos indujo a realizar un estudio sobre la actividad *in vitro* e *in vivo* de la anfotericina B, del itraconazol y del posaconazol sobre estas especies, basándonos en el modelo de feohifomicosis diseminada en el ratón neutropénico utilizado en el trabajo anterior (Calvo *et al.*, 2010).

El posaconazol ha mostrado una buena actividad *in vitro* frente a especies de hongos dematiáceos (Zeng *et al.*, 2007; Fothergill *et al.*, 2009) e incluso ha resultado eficaz en el tratamiento de infecciones experimentales causadas por *E. dermatitidis* (Graybill *et al.*, 2004). En el ámbito clínico, el posaconazol también ha demostrado eficacia en un caso de feohifomicosis

diseminada causada por *Exophiala spinifera* (Negróni *et al.*, 2004). Estos antecedentes sugieren que dicho fármaco podría considerarse como una opción en el tratamiento de feohifomicosis sistémicas causadas por especies del género *Exophiala*. Los resultados de nuestros estudios *in vitro*, en los que todos los fármacos mostraron una buena actividad, y los correspondientes a los estudios *in vivo* concuerdan con esta hipótesis para las dos especies nuevas del género *Exophiala*, *E. oligosperma* y *E. xenobiotica*, y confirman los obtenidos por Graybill *et al.* con *E. dermatitidis* (Graybill *et al.*, 2004). Fue precisamente frente a esta última especie donde el posaconazol mostró mejores resultados en prolongar la supervivencia y reducir la carga fúngica en órganos en comparación con el itraconazol y la anfotericina B. En cambio, estas diferencias entre los tratamientos fueron menos evidentes en las infecciones causadas por las otras dos especies, para las que en general todas las terapias fueron efectivas, debido probablemente a que no mostraron el neurotropismo observado por *E. dermatitidis*. Estos resultados que ponen de manifiesto la mayor eficacia del posaconazol respecto a la anfotericina B y al itraconazol, se asemejan a los obtenidos en feohifomicosis experimentales causadas por *Fonsecaea monophora* (Calvo *et al.*, 2010).

Los resultados de este estudio se publicaron en la revista Journal of Antimicrobial Agents 2010; 65:1455-1459.

5.3. Aspergilosis invasora

La aspergilosis invasora es la micosis invasora más frecuente causada por hongos filamentosos. *Aspergillus fumigatus* es, en la mayoría de los casos, el organismo causante de esta infección, aunque la relevancia clínica de otras especies del género, como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*, ha aumentado en los últimos años (Walsh *et al.*, 2008). Actualmente el voriconazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la aspergilosis invasora, mientras que el posaconazol, las formulaciones lipídicas de anfotericina B, la caspofungina y la micafungina se presentan como alternativas en pacientes intolerantes o con procesos resistentes al voriconazol. A pesar de estas diferentes opciones terapéuticas, la aspergilosis invasora continúa causando una elevada mortalidad en

pacientes inmunocomprometidos, hecho que justifica las investigaciones realizadas para la evaluación de la eficacia de nuevos fármacos o de las combinaciones de éstos.

5.3.1. *Aspergillus flavus*

A. flavus, la segunda especie más frecuente causante de aspergilosis invasoras, está considerada como una de las especies más virulentas y resistentes a los antifúngicos del género (Hedayati *et al.*, 2007). Dentro del grupo de las equinocandinas, la micafungina y la caspofungina son fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de estas infecciones. En el caso de la anidulafungina, a pesar de presentar ventajas respecto a las otras dos equinocandinas, la escasez de ensayos clínicos con este fármaco debida a su reciente aparición, no ha permitido la aprobación de su uso en el tratamiento de las aspergilosis invasoras (Vazquez, 2006, Walsh *et al.* 2008).

Por esta razón, consideramos interesante llevar a cabo estudios experimentales *in vitro*, comparando la técnica de microdilución en caldo y la de disco difusión. En nuestro estudio analizamos 27 aislados de *A. flavus* frente a los cuales la anidulafungina mostró una buena actividad, corroborando los datos obtenidos por otros autores (Serrano *et al.*, 2003; Pfaller *et al.*, 2009). A su vez, se confirmó el potencial de la técnica de disco difusión para la determinación de la actividad *in vitro* de las equinocandinas frente a *Aspergillus* sp., ya que se obtuvo una elevada correlación con los resultados obtenidos a partir del método de microdilución. Se realizaron estudios *in vivo* para evaluar la eficacia de la anidulafungina en el tratamiento de la infección diseminada por *A. flavus* en el ratón neutropénico, usándose cinco aislados del hongo. En el modelo experimental pudimos confirmar la eficacia dosis dependiente de la anidulafungina, similar a la obtenida por otros autores frente a *A. fumigatus* (Verweij *et al.*, 1998; Petraitis *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 2000). Por el contrario, la terapia no redujo los niveles del antígeno galactomanano en suero. Este hecho se había observado anteriormente en infecciones experimentales causadas por *A. fumigatus* (Sionov *et al.*, 2006; Arendrup *et al.*, 2008; Nagasaki *et al.*, 2009; van de Sande *et al.*, 2009) así como en un

caso clínico de aspergilosis invasora, en el que los niveles de galactomanano incluso aumentaron una vez iniciado el tratamiento con caspofungina (Klont *et al.*, 2006). El aumento de los niveles de este antígeno parece estar relacionado con la actividad fungistática de las equinocandinas, ya que no se ha observado en tratamientos de la aspergilosis con agentes fungicidas como es el caso de los azoles (Arendrup *et al.*, 2008). La causa radicaría en la reducción del β -glucano provocada por la exposición a la equinocandina y la consecuente degradación de la pared celular que permitiría la liberación de sus componentes, aumentando de esta manera los niveles de galactomanano en suero (Klont *et al.*, 2006).

Los resultados de este estudio se publicaron en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011, 55:1290-1292.

Una vez comprobada la eficacia de la anidulafungina frente a la aspergilosis diseminada experimental por *A. flavus*, se procedió a evaluar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de la terapia combinada de este fármaco con el voriconazol, utilizando el modelo de infección en el ratón desarrollado en nuestro estudio anterior. El diferente mecanismo de acción de las equinocandinas y los azoles, unido a su baja toxicidad, permite que, aunque poco investigada, la terapia combinada de ambos fármacos sea una alternativa terapéutica a tener en cuenta frente a la aspergilosis invasora. La administración conjunta de la anidulafungina y del voriconazol ha demostrado ser segura y bien tolerada en humanos (Dowell *et al.*, 2005), aunque se desconoce hasta qué punto esta combinación de fármacos puede mejorar los efectos de las correspondientes monoterapias en casos de aspergilosis invasora (Crandon *et al.*, 2009). El análisis de la actividad *in vitro* de la combinación de la anidulafungina con el voriconazol demostró interacción sinérgica frente a una de las tres cepas ensayadas, mientras que en los otros dos casos se observó un efecto indiferente. La falta de interacciones antagónicas *in vitro* observadas entre el voriconazol y la anidulafungina ya se ha descrito anteriormente para otras equinocandinas y diferentes especies de *Aspergillus*, incluyendo a *A. flavus* (Kirkpatrick *et al.*, 2002; Perea *et al.*, 2002; Cuenca-Estrella *et al.*, 2005; Philip *et al.*, 2005; Perkhof *et al.*, 2008).

En el modelo experimental *in vivo*, la combinación estudiada demostró mayor eficacia que la monoterapia de anidulafungina, y mejoró ligeramente los efectos del tratamiento con voriconazol. Estos resultados son similares a los obtenidos con *A. fumigatus* en conejos neutropénicos por Petraitis y cols. (Petraitis *et al.*, 2009), ya que observaron interacciones sinérgicas o indiferentes al combinar voriconazol y anidulafungina a dosis similares a las que empleamos nosotros. En cambio, en un modelo de rata neutropénica, esta misma combinación no mejoró los resultados de las respectivas monoterapias frente a *A. fumigatus* (van de Sande *et al.*, 2009). Estos resultados, en parte contradictorios, también se han observado en otros estudios experimentales que analizaron las combinaciones de voriconazol con otras equinocandinas frente a *A. fumigatus* (Kirkpatrick *et al.*, 2002; Chandrasekar *et al.*, 2004; McCallum *et al.*, 2005). Estas discrepancias podrían deberse a las diferentes condiciones experimentales empleadas más que a un efecto sinérgico dependiente de la cepa, ya que los autores consideran que las sinergias observadas son demasiado débiles como para ser consecuencia de un claro efecto sinérgico (McCallum *et al.*, 2005). De todos modos, tal y como pudimos constatar en nuestros resultados, el hecho más destacado en este tipo de estudios es la ausencia de interacciones antagónicas entre las combinaciones de azoles y equinocandinas.

Los resultados de este estudio se han publicado en la revista Mycopathologia 2011; DOI 10.1007/s11046-011-9507-6. Este artículo fue seleccionado y evaluado por un miembro de "Faculty of 1000" quién, en el mes de su publicación, lo incluyó en el 2% de artículos científicos más relevantes dentro del ámbito de la Biología y la Medicina.

5.3.2. *Aspergillus niger*

Las aspergilosis invasoras causadas por *A. niger* son infecciones poco frecuentes pero causantes de una elevada mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Fianchi *et al.*, 2004; Shimoni *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2008). Se han descrito cepas de *A. niger* resistentes *in vitro* al voriconazol (Verweij *et al.*, 2009) y, a pesar de tratarse de la terapia de elección para este tipo de infecciones, se ha descrito al menos un caso

clínico en el que el paciente no respondió a dicho tratamiento (Person *et al.*, 2010).

En nuestro propósito de evaluar a la anidulafungina como una posible alternativa al voriconazol en este tipo de infecciones, realizamos estudios *in vitro*, e *in vivo* en un modelo de infección diseminada en ratones inmunocomprometidos en el que valoramos la capacidad del fármaco para prolongar la supervivencia, reducir la invasión fúngica en órganos y los niveles séricos de galactomanano. Los resultados mostraron una buena actividad del fármaco en ambos estudios, concordando estos resultados con los de estudios anteriores en los que se había demostrado la eficacia experimental de la anidulafungina frente a otras especies del género como *A. fumigatus* (Petraitis *et al.*, 1998; Verweij *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 2000) y *A. flavus* (Calvo *et al.*, 2011). El fármaco mostró una eficacia dosis dependiente especialmente evidente en el estudio histopatológico. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la actividad fungistática de la anidulafungina impidió que ninguna de las dosis empleadas fuera capaz de reducir los niveles de galactomanano en suero.

Los resultados de este estudio se publicaron en la revista International Journal of Antimicrobial Agents 2011, 38.360-363.

5.3.3. Correlación entre la actividad *in vitro* del voriconazol y del posaconazol y su eficacia *in vivo* frente a *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*

En los últimos años se ha detectado un incremento de aislados de *Aspergillus* resistentes a los azoles (Howard *et al.*, 2009; Verweij *et al.*, 2009), los cuales pueden ser difíciles de identificar debido a la falta de puntos de corte basados en la eficacia clínica de estos fármacos. Con el objetivo de detectar estas cepas resistentes se han realizado diversos estudios los cuales han definido puntos de corte epidemiológicos (PCE) basándose en las distribuciones de las CMIs de los azoles para diferentes especies de *Aspergillus* (Espinel-Ingroff *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2011). Estos puntos se definen como concentraciones críticas de fármacos que permitirían identificar cepas salvajes (término que englobaría al menos al

95% de los aislados de la especie) y aquéllas que presentan un probable mecanismo de resistencia a un determinado antifúngico (Pfaller *et al.*, 2009).

Nuestro objetivo fue realizar una primera aproximación en modelos *in vivo* sobre la utilidad de los PCE como indicadores de éxito terapéutico. Para ello, utilizamos un modelo murino de infección diseminada que permitió analizar aislados de *A. flavus* y *A. niger* para los que el voriconazol y el posaconazol presentaran CMI's mayores y menores a los PCE propuestos para estas especies (Pfaller *et al.*, 2011). Desafortunadamente, debido a su baja frecuencia, no pudimos utilizar aislados para los que la CMI del posaconazol fuera mayor al PCE sugerido. A su vez, también comparamos dos técnicas diferentes en la determinación de la actividad *in vitro* de los fármacos, como son la de microdilución en caldo y la de disco difusión. En concordancia con estudios anteriores (Espinell-Ingroff *et al.*, 2007), los resultados de ambas técnicas únicamente se correlacionaron en cepas para las que se obtuvieron CMI's bajas o muy elevadas.

Los estudios de supervivencia y recuento fúngico en órganos de animales infectados con cepas de *A. flavus* demostraron la eficacia del posaconazol en infecciones causadas por aislados para los que la CMI fue menor o igual a su PCE, concordando estos resultados con estudios experimentales anteriores realizados con *A. fumigatus* (Mavridou *et al.*, 2010). El voriconazol demostró eficacia frente a cepas de *A. flavus* para las que las CMI's incluso superaban el PCE. Este resultado sugiere que, tal y como se ha observado en estudios experimentales previos con *A. fumigatus* y voriconazol (Mavridou *et al.*, 2010), el PCE no sería un valor indicativo de éxito o fracaso del tratamiento con dicho fármaco en infecciones causadas por *A. flavus*. En infecciones causadas por cepas para las que el voriconazol mostró una CMI ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, la progresión lineal en los valores de las CMI's no se correlacionó con un descenso similar en la eficacia del fármaco. Este hecho ya se describió en un estudio clínico que analizó 115 infecciones causadas por *A. fumigatus* tratadas con voriconazol (Baddley *et al.*, 2009).

El posaconazol también mostró eficacia frente a los aislados de *A. niger*, para los cuales las CMI's fueron en todos los casos iguales o inferiores a su correspondiente PCE. Para voriconazol, por el contrario, se observó una

pobre actividad del fármaco frente a cepas con una CMI una dilución por debajo del PCE.

Nuestros resultados también se asemejan a los observados en el ámbito clínico en infecciones causadas por *A. fumigatus*. En estos casos, una CMI de voriconazol superior al PCE no siempre se correlaciona con fracaso terapéutico (Warris *et al.*, 2002, Braddley *et al.*, 2009), ya que éste únicamente se ha descrito para cepas altamente resistentes al fármaco (Kuipers *et al.*, 2011; Pfaller, 2012). Por su parte, la eficacia del posaconazol frente a aislados de *Aspergillus* para las que las CMIs son superiores al correspondiente PCE no se ha descrito hasta la fecha, aunque dicho fármaco se ha utilizado con éxito frente a cepas de *A. fumigatus* para las que las CMIs fueron iguales al PCE (Verweij *et al.*, 2007; Hodiamont *et al.*, 2009).

El estudio demostró la correlación existente entre valores de CMIs de posaconazol no superiores al correspondiente PCE y la buena actividad del fármaco en infecciones causadas por *A. flavus* o *A. niger*; mientras que para estas mismas especies, los PCEs para el voriconazol resultaron poseer una limitada utilidad a la hora predecir el éxito de la terapia.

Los resultados de este estudio han sido recogidos en un artículo que ha sido enviado a la revista International Journal of Antimicrobial Agents y actualmente se encuentra en proceso de revisión para su publicación.

6. CONCLUSIONES

6.3. Hemos comparado la virulencia de aislados clínicos de *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala oligosperma* y *Exophiala xenobiotica* en un modelo de infección diseminada en el ratón neutropénico.

- *E. dermatitidis* ha resultado ser la especie más virulenta y la que ha producido una mayor invasión del tejido cerebral, mientras que *E. oligosperma* y, especialmente, *E. xenobiotica* han mostrado una menor capacidad de invadir y lesionar los tejidos estudiados.

6.4. Hemos evaluado la actividad *in vitro* del posaconazol, de la anfotericina B y del itraconazol frente a aislados clínicos de *E. dermatitidis*, *E. oligosperma* y *E. xenobiotica*, así como su eficacia *in vivo* frente a estas especies en un modelo de feohifomicosis sistémica en ratones inmunocomprometidos.

- El posaconazol ha demostrado una mayor actividad *in vitro* frente a las tres especies estudiadas.
- Los tres antifúngicos han mostrado una buena eficacia en el tratamiento de infecciones experimentales causadas por *E. oligosperma* y *E. xenobiotica*. Sin embargo, el posaconazol ha sido el fármaco más eficaz en infecciones causadas por *E. dermatitidis*, mostrando a su vez una mayor capacidad que el resto de fármacos estudiados para reducir la carga fúngica en cerebro.

6.5. Hemos evaluado la actividad *in vitro* de la anidulafungina mediante técnicas de microdilución y de disco difusión frente a diferentes cepas de *Aspergillus flavus* y de *Aspergillus niger*. La eficacia *in vivo* de dicho fármaco frente a estas especies se estudió mediante modelos de aspergilosis invasoras en ratones neutropénicos.

- Se ha observado una buena correlación entre los resultados de las dos técnicas *in vitro*.

- La anidulafungina ha mostrado una buena actividad *in vitro* frente a las dos especies de *Aspergillus* estudiadas, hecho que se ha correlacionado con la buena eficacia del fármaco en el estudio *in vivo*. En base a estos resultados, la anidulafungina podría constituir una alternativa eficaz a los tratamientos actuales de aspergilosis invasoras.

6.6. Se ha evaluado la actividad *in vitro* de la anidulafungina combinada con el voriconazol frente a cepas clínicas de *A. flavus* y, con el objetivo de evaluar la eficacia *in vivo* de dicha combinación, se ha desarrollado un modelo de infección diseminada por *A. flavus* en el ratón neutropénico.

- La combinación de la anidulafungina y del voriconazol ha mostrado una buena actividad *in vitro* frente a *A. flavus*. La interacción de ambos fármacos ha resultado ser indiferente para las tres cepas ensayadas cuando el criterio de lectura utilizado fue la CMI-0 mientras que, al emplear la CMI-2 como criterio de lectura, la interacción ha sido sinérgica para una cepa e indiferente para las otras dos.
- La combinación de la anidulafungina y del voriconazol no ha mostrado interacciones antagónicas, ha mejorado los resultados *in vivo* de la monoterapia con anidulafungina y, en algunos casos, también los obtenidos con el voriconazol. Estos resultados sugieren que el uso de esta terapia combinada podría tener utilidad clínica en el tratamiento de la aspergilosis invasora.

6.7. Mediante las técnicas de microdilución y de disco difusión evaluamos la actividad *in vitro* del voriconazol y del posaconazol frente a diversos aislados de *A. flavus* y *A. niger*. Posteriormente se escogieron cepas con diferentes grados de sensibilidad a los fármacos con las que, utilizando un modelo de infección diseminada en el ratón inmunodeprimido, se evaluó la eficacia de los tratamientos. De esta manera se pretendió determinar qué valores *in vitro* podrían ser indicativos del éxito o del fracaso de la terapia, y

Conclusiones

si éstos se correlacionarían con los puntos de corte epidemiológicos sugeridos para estos fármacos y para estas especies.

- Para ambas especies, el posaconazol fue eficaz en el tratamiento de las infecciones causadas por todas las cepas de *A. flavus* y *A. niger* ensayadas. Debido a que el fármaco presentó CMI's iguales o inferiores al punto de corte epidemiológico para todos los aislados, no se pudo confirmar su eficacia para valores de CMI superiores a los puntos de corte epidemiológicos.
- El voriconazol mostró eficacia en infecciones causadas por cepas de *A. flavus* para las que las CMI's fueron superiores al punto de corte epidemiológico sugerido para esta especie; mientras que para *A. niger*, este antifúngico resultó inefectivo en el tratamiento de infecciones causadas por cepas para las que las CMI's fueron inferiores a su correspondiente punto de corte epidemiológico. Estos resultados demuestran la limitada utilidad de los puntos de corte epidemiológicos a la hora de predecir la eficacia del voriconazol en infecciones por *A. flavus* o *A. niger*.

6.1. Se evaluó la actividad *in vitro* del posaconazol, del voriconazol, de la terbinafina y del itraconazol frente a *Fonsecaea pedrosoi* y *Cladophialophora carrionii*, los dos principales agentes causales de cromoblastomycosis. Posteriormente comparamos la eficacia *in vivo* de los fármacos por medio de modelos de cromoblastomycosis en ratones atímicos causados por dichas especies.

- Los cuatro fármacos mostraron una buena actividad *in vitro* frente a las dos especies.
- Para los dos tipos de cromoblastomycosis estudiados, el posaconazol fue el tratamiento más efectivo en reducir el tamaño de las lesiones, confirmando de esta manera su eficacia frente a infecciones cutáneas ocasionadas por hongos dematiáceos. El voriconazol, por su parte, fue ineficaz en el tratamiento de cromoblastomycosis causadas por *F. pedrosoi*, y mostró una eficacia similar a la de la terbinafina y a la del itraconazol en las infecciones causadas por *C. carrionii*.

6.2. Se ha evaluado la actividad *in vitro* del posaconazol, de la anfotericina B y del itraconazol frente a dos aislados clínicos de *Fonsecaea monophora*. A su vez, se ha desarrollado un modelo de infección diseminada en ratones inmunocomprometidos que ha permitido comparar la eficacia *in vivo* de dichos fármacos y analizar la virulencia de los aislados, así como la posibilidad sugerida por algunos autores de que se trate de una especie neurotrópica.

- La mayor actividad del posaconazol tanto *in vitro* como *in vivo* sugiere su posible utilidad en el tratamiento de infecciones humanas causadas por *F. monophora*.
- Nuestro modelo ha evidenciado la ausencia de un claro comportamiento neurotrópico por parte del hongo ya que, de los órganos estudiados, el cerebro es el que ha presentado una menor invasión fúngica.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ahrens J, Graybill JR, Abishawl A, Tio FO, Rinaldi MG. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989; **40**:651-8.

Ajello L, Georg LK, Steigbigel RT, Wang CJK. A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. *Mycologia* 1974; **66**:490-8.

Ajello L, Hay RJ. Medical Mycology. A: Ajello L, Sussman M, Balows A, Collier L (eds.): Topley & Wilson's Microbiology and Infectious Infections. 9th Edition, Arnold London 1997; vol. 4.

Ajit C, Suvannasankha A, Zaeri N, Munoz SJ. Terbinafine-associated hepatotoxicity. *Am J Med Sci* 2003; **325**:292-5.

Al-Abdely HM, Alkhunaizi AM, Al-Tawfiq JA, Hassounah M, Rinaldi MG, Sutton DA. Successful therapy of cerebral phaeohyphomycosis due to *Ramichloridium mackenziei* with the new triazole posaconazole. *Med Mycol* 2005; **43**:91-5.

Al-Abdely HM, Najvar LK, Bocanegra R, Graybill JR. Antifungal therapy of experimental cerebral phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:1701-7.

Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:4514-7.

Al-Obaid I, Ahmad S, Khan ZU, Dinesh B, Hejab HM. Catheter-associated fungemia due to *Exophiala oligosperma* in a leukemic child and review of fungemia cases caused by *Exophiala* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; **29**:729-32.

Ameen M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. Clin Exp Dermatol 2009; **34**:849-54.

Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. Clin Dermatol 2010; **28**:197-201.

Andes D, Marchillo K, Conklin R, Krishna G, Ezzet F, Cacciapuoti A, Loebenberg D. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis. Antimicrob Agents Chemother 2004; **48**:137-42.

Andrade TS, Castro LG, Nunes RS, Gimenes VM, Cury AE. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. Mycoses 2004; **47**:216-21.

Aoyama Y, Nomura M, Yamanaka S, Ogawa Y, Kitajima Y. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala xenobiotica* in a non-Hodgkin lymphoma patient. Med Mycol 2009; **47**:95-9.

Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, Lass-Flörl C. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. Antimicrob Agents Chemother 2008; **52**:3504-11.

Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2001; **45**:327-30.

Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, Ito JI, Balajee SA, Pappas PG, Moser SA. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the transplant-associated infection surveillance network. J Clin Microbiol 2009; **47**:3271-5.

Berbee ML, Taylor JW. Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. *Biosystems* 1992; **28**:117-25.

Bodet CA 3rd, Jorgensen JH, Drutz DJ. Simplified bioassay method for measurement of flucytosine or ketoconazole. *J Clin Microbiol* 1985; **22**:157-60.

Bolard J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta* 1986; **864**:257-304.

Böhme A, Ruhnke M, Buchheidt D, Cornely OA, Einsele H, Enzensberger R, Hebart H, Heinz W, Junghanss C, Karthaus M, Krüger W, Krug U, Kubin T, Penack O, Reichert D, Reuter S, Silling G, Shiidhoff T, Ullmann AJ, Maschmeyer G. Treatment of invasive fungal infections in cancer patients recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2009; **88**:97-110.

Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, A. Saúl. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; **44**:1-7.

Bonifaz A, Paredes-Solís V, Saúl A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother* 2004; **5**:247-54.

Bonifaz A, Saúl A, Paredes-Solis V, Araiza J, Fierro-Arias L. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. *J. Dermatolog Treat* 2005; **16**:47-51.

Bossler AD, Richter SS, Chavez AJ, Vogelgesang SA, Sutton DA, Grooters AM, Rinaldi MG, de Hoog GS, Pfaller MA. *Exophiala oligosperma* causing olecranon bursitis. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:4779-82.

Burstein Z, Vildósola H, Lozano Z, Verona R, Vargas G. Colestasic toxic hepatitis caused by terbinafine: case report. *Rev Gastroenterol Peru* 2004; **24**:357-62.

Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. Efficacy of anidulafungin against *Aspergillus niger* in vitro and in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **38**:360-3.

Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Hernández P, Guarro J. Antifungal therapy in an athymic murine model of chromoblastomycosis by *Fonsecaea pedrosoi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**:3709-13.

Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Salas V, Guarro J. In vitro and in vivo efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**:1290-2.

Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM, Mayayo E, Salas V, Guarro J. Murine model of a disseminated infection by the novel fungus *Fonsecaea monophora* and successful treatment with posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:919-23.

Calvo E, Rodríguez MM, Mariné M, Mayayo E, Pastor FJ, Guarro J. Comparative virulence of three species of *Exophiala* in mice. *Med Mycol* 2010; **48**:853-7.

Cardona-Castro N, Agudelo-Flórez P. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Med Mycol* 1999; **37**:81-3.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. The fungi as a major group of organisms. A: The fungi. 2nd ed. Academic Press, London 2001; 1-9.

Carrillo-Muñoz AJ, Pemán J, Gobernado M. New antifungals drugs. Present and future. *Rev Esp Quimioter* 1999; **12**:181-204.

Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Ruesga M, Alonso R, del Valle O, Hernández-Molina JM, McNicholas P, Loebenberg D, Santos P. Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and

amphotericin B against yeasts from oropharyngeal candidiasis and other infections. J Antimicrob Chemother 2005; **55**:317-9.

Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. J Infect Dis 2001; **184**:337-44.

Catalán M, Montejo JC. Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. Rev Iberoam Micol 2006; **23**:39-49.

Chandrsekhar PH, Cutright JL, Manavathu EK. Efficacy of voriconazole plus amphotericin B or micafungin in a guinea-pig model of invasive pulmonary aspergillosis. Clin Microbiol Infect 2004; **10**:925-8.

Chang CL, Kim DS, Park DJ, Kim HJ, Lee CH, Shin JH. Acute cerebral phaeohyphomycosis due to *Wangiella dermatitidis* accompanied by cerebrospinal fluid eosinophilia. J Clin Microbiol 2000; **38**:1965-6.

Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. Drugs 2011; **71**:253.

Christiansen KJ, Bernard EM, Gold JW, Armstrong D. Distribution and activity of amphotericin B in humans. J Infect Dis 1985; **152**:1037-43.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi:

approved standard-second edition. Document M38-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; proposed guideline. Document M51-P. Wayne, Pa, USA, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; informational supplement. Document M51-S1 (proposed). Wayne, Pa, USA, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi; approved guideline. Document M51-A. Wayne, Pa, USA, 2010.

Crandon JL, Banevicius MA, Fang AF, Crownover PH, Knauff RF, Pope JS, Russomanno JH, Shore E, Nicolau DP, Kuti JL. Bronchopulmonary disposition of intravenous voriconazole and anidulafungin given in combination to healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:5102-7.

Criado PR, Careta MF, Valente NY, Martins JE, Rivitti EA, Spina R, Belda W Jr. Extensive long-standing chromomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: three cases with relevant improvement under voriconazole therapy. *J Dermatolog* 2011; **22**:167-74.

Cuenca-Estrella M. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Rev Esp Quimioter* 2010; **23**:169-76.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Buitrago MJ, Rodriguez-Tudela JL. Combined activity in vitro of caspofungin, amphotericin B, and azole agents against itraconazole-

resistant clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2005; **49**:1232-5.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. Antimicrob Agents Chemother 2006; **50**:917-21.

Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. Antimicrob Agents Chemother 2004; **48**:970-8.

Debruyne D. Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses. Clin Pharmacokinet 1997; **33**:52-77.

Defaveri J, Graybill JR. Treatment of chronic murine chromoblastomycosis with the triazole SCH39304. Am J Trop Med Hyg 1990; **42**:601-6.

de Hoog, GS, Attili-Angelis D, Vicente VA, Gerrits van den Enden AHG, Queiroz-Telles F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. Med Mycol 2004; **42**:405-16.

de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands and University Rovira i Virgili, Reus, Spain. 2000.

de Hoog GS, Vicente V, Caligiorne RB, Kantarcioglu S, Tintelnot K, Gerrits van den Ende AHG, Haase G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. J Clin Microbiol 2003; **41**:4767-78.

de Hoog GS, Zeng JS, Harrak MJ, Sutton DA. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., and opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. Antonie van Leeuwenhoek 2006; **90**:257-68.

Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, Warnock DW, Kelly SL. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:1364-8.

de Wet N, Bester AJ, Viljoen JJ, Filho F, Suleiman JM, Ticona E, Llanos EA, Fisco C, Lau W, Buell D. A randomized, double blind, comparative trial of micafungin (FK 463) vs. fluconazole for the treatment of oesophageal candidiasis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; **21**:899-907.

de Wet N, Llanos-Cuentas A, Suleiman J, Baraldi E, Krantz EF, Della Negra M, Diekmann-Berndt H. A randomized, double-blind, parallel-group, dose-response study of micafungin compared with fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis in HIV-positive patients. *Clin Infect Dis* 2004; **39**:842-9.

Dismukes WE, Cloud G, Gallis HA, Kerkering TM, Medoff G, Craven PC, Kaplowitz LG, Fisher JF, Gregg CR, Bowles CA, Shadomy S, Stamm AM, Diasio RB, Kaufman L, Soong SJ, Blackwelder WC, N. A. I. D. M. S. Group. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N Engl J Med* 1987; **317**:334-41.

Dixon DM, Polak A, Conner GW. Mel-mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: evaluation of multiple mouse and fungal strains. *J Med Vet Mycol* 1989; **27**:335-41

Dixon DM, Polak A, Szaniszlo PJ. Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin deficient *Wangiella dermatitidis*. *J Med Vet Mycol* 1987; **25**:97-106.

Doern GV, Tubert TA, Chapin K, Rinaldi MG. Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *J Clin Microbiol* 1986; **24**:507-11.

Dowell JA, Schranz J, Baruch A, Foster G. Safety and pharmacokinetics of coadministered voriconazole and anidulafungin. *J Clin Pharmacol* 2005; **45**:1373-82.

Dupont C, Duong TA, Mallet S, Mamzer-Bruneel MF, Thervet E, Bougnoux ME, Dupont B. Unusual presentation of chromoblastomycosis due to *Cladophialophora carrionii* in a renal and pancreas transplant recipient successfully treated with posaconazole and surgical excision. *Transpl Infect Dis* 2010; **12**:180-3.

Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**:415-29.

Elgart GW. Chromoblastomycosis. *Dermatol Clin* 1996; **14**:77-83.

El-Ridy MS, Abdelbary A, Essam T, El-Salam RM, Kassem AA. Niosomes as a potential drug delivery system for increasing the efficacy and safety of nystatin. *Drug Dev Ind Pharm* 2011; **37**:1491-508.

Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; **55**:809-18.

Erjavec Z, Kluin-Nelemans, Verweij PE. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**:625-33.

Espinel-Ingroff A. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Rev Esp Quimioter* 1994; **7**:20-31.

Espinel-Ingroff A. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:954-8.

Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller MA, Messer S, Rinaldi M, Fothergill A, Gibbs DL, Wang A. Multicenter

evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. J Clin Microbiol 2007; **45**:1811-20.

Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper C 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. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. J Clin Microbiol 1997, **35**:139-43.

Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, Ghannoum M, Hazen KC, Pfaller MA, Rinaldi M, Walsh TJ. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp. NCCLS collaborative evaluation. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antimicrob Agents Chemother 2001; **45**:1828-35.

Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan DJ. In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. Mycopathologia 2001; **150**:101-5.

Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. J Clin Microbiol 2002; **40**:3776-81.

Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Paetznick V, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. Antimicrob Agents Chemother 1995; **39**:314-9.

Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. J Clin Microbiol 1991; **29**:393-4.

Espinel-Ingroff A, Shadomy S. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; **8**:352-61.

Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis* 2006; **19**:148-52.

Fianchi L, Picardi M, Cudillo L, Corbata L, Mele L, Trapè G, Girmenia C, Pagano L. *Aspergillus niger* infection in patients with haematological diseases: a report of eight cases. *Mycoses* 2004; **47**:163-7.

Fica A, Diaz MC, Luppi M, Olivares R, Saez L, Baboor M, Vasquez P. Unsuccessful treatment with voriconazole of a brain abscess due to *Cladophialophora bantiana*. *Scand J Infect Dis* 2003; **35**:892-3.

Fittler A, Kocsis B, Gerlinger I, Botz L. Optimization of bioassay method for the quantitative microbiological determination of amphotericin B. *Mycoses* 2010; **53**:57-61.

Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol* 2009; **47**:41-3.

Fung SL, Chau CH, Yew WW. Cardiovascular adverse effects during itraconazole therapy. *Eur Respir J* 2008; **32**:240.

Garnica M, Nucci M, Queiroz-Telles F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. *Curr Opin Infect Dis* 2009; **22**:559-63.

Gavaldà J, Ruiz I. Guidelines for the treatment of infection due to *Aspergillus* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; **21**:571-8.

González GM, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG, Loebenberg D.

In vitro activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med Mycol* 2005; **43**:281-4.

González-López MA, Salesa R, González-Vela MC, Fernández-Llaca H,

Val-Bernal JF, Cano J. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala oligosperma* in a renal transplant recipient. *Br J Dermatol* 2007; **156**:762-4.

Graybill JR. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug resist Updat* 2000; **3**:364-83.

Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D, Luther MF.

Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:2467-73.

Graybill JR, Najvar LK, Johnson E, Bocanegra R, Loebenberg D.

Posaconazole therapy of disseminated phaeohyphomycosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:2288-91.

Greig JR, Khan MA, Hopkinson NS, Marshall BG, Wilson PO, Rahman

SU. Pulmonary infection with *Scedosporium prolificans* in an immunocompetent individual. *J Infect* 2001; **43**:15-7.

Guarro J. Lessons from animals studies for the treatment of invasive

human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**:1447-66.

Guarro J, Xavier MO, Severo LC. Differences and similarities amongst

pathogenic *Aspergillus* species. En: Pasqualotto AC, ed. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Springer, Dordrecht, 2010; pp. 7-32.

Gubler C, Wildi SM, Imhof A, Schneemann M, Müllhaupt B. Disseminated invasive aspergillosis with cerebral involvement successfully treated with caspofungin and voriconazole. *Infection* 2007; **35**:364-6.

Gupta AK, Ryder JE, Cooper EA. Naftifine: a review. *J Cutan Med Surg* 2008; **12**:51-8.

Gupta AK, Ryder JE, Skinner AR. Treatment of onychomycosis: pros and cons of antifungal agents. *J Cutan Med Surg* 2004; **8**:25-30.

Gupta AK, Taborca PR, Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol* 2002; **40**:529-34.

Hamza SH, Mercado PJ, Skelton HG, Smith KJ. An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. *J Cutan Pathol* 2003; **30**:340-3.

Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 2001; **105**:1422-32.

Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 2007; **153**:1677-92.

Hernández-Hernández F, De Bievre C, Camacho-Arroyo I, Cerbon MA, Dupont B, Lopez-Martinez R. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* in vitro and characterization of progesterone receptors. *J Med Vet Mycol* 1995; **33**:235-9.

Hodiamont CJ, Dolman KM, Ten Berge IJ. Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med Mycol* 2009; **47**:210-7.

Horré R, de Hoog GS. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Stud Mycol* 1999; **43**:176-93.

Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarraq A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW. 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; **15**:1068-76.

Hsieh SM, Hung CC, Chen MY, Hsueh PR, Chang SC. Efficacy and adverse effects of higher dose amphotericin B monotherapy for cryptococcal meningitis in patients with advanced HIV infection. *J Microbiol Immunol Infect* 1998; **31**:233-9.

Johnson LB, Kauffman CA. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 2003; **36**:630-7.

Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:693-715.

Kan VL, Bennett JE. Efficacies of four antifungal agents in experimental sporotrichosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**:1619-23.

Kan VL, Henderson DK, Bennett JE. Bioassay for SF 86-327, a new antifungal agent. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **30**:628-9.

Kantarcioğlu AS, de Hoog GS. Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of cases presented between 1999 and 2004. *Mycoses* 2004; **47**:4-13.

Karim M, Alam M, Shah AA, Ahmed R, Sheikh H. Chronic invasive aspergillosis in apparently immunocompetent hosts. *Clin Infect Dis* 1997; **24**:723-33.

Kaukonen KM, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Itraconazole increases plasma concentrations of quinidine. *Clin Pharmacol Ther* 1997; **62**:510-7.

Keating GM. Posaconazole. *Drugs* 2005; **65**:1553-67.

Kirkpatrick WR, Perea S, Coco BJ, Patterson TF. Efficacy of caspofungin alone and in combination with voriconazole in a Guinea pig model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**:2564-8.

Klont RR, Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Rijs AJ, Blijlevens NM, Donnelly JP, Verweij PE. 2006. Paradoxical increase in circulating *Aspergillus* antigen during treatment with caspofungin in a patient with pulmonary aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2006; **43**:23-5.

Koo S, Klompas M, Marty FM. *Fonsecaea monophora* cerebral phaeohyphomycosis: case report of successful surgical excision and voriconazole treatment and review. *Med Mycol* 2010; **48**:769-74.

Krause DS, Reinhardt J, Vazquez JA, Reboli A, Goldstein BP, Wible M, Henkel T; Anidulafungin Invasive Candidiasis Study Group. Phase 2, randomized, dose-ranging study evaluating the safety and efficacy of anidulafungin in invasive candidiasis and candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:2021-4.

Krishna G, Beresford E, Ma L, Vickery D, Martinho M, Yu X, Komjathy S, Tavakkol A. Skin concentrations and pharmacokinetics of posaconazole after oral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:1807-10.

Krishna G, Sansone-Parsons A, Martinho M, Kantesaria B, Pedicone L. Posaconazole plasma concentrations in juvenile patients with invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**:812-8.

Kuipers S, Brüggemann RJ, de Sévaux RG. Failure of posaconazole therapy in a renal transplant patient with invasive aspergillosis due to

Aspergillus fumigatus with attenuated susceptibility to posaconazole. Antimicrob Agents Chemother 2011; **55**:3564-6.

Kullberg BJ, Sobel JD, Ruhnke M, Pappas PG, Viscoli C, Rex JH, Clearly JD, Rubinstein E, Church LW, Brown JM, Schlamm HT, Oborska IT, Hilton F, Hodges MR. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. Lancet 2005; **366**:1435-42.

Lewis JS 2nd. Echinocandin activity against *Aspergillus* spp. and the importance of pharmacodynamics. Med Mycol 2009; **47**:376-81.

Leyden J. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. J Am Acad Dermatol 1998; **38**:S42-7.

Li DM, Li RY, de Hoog GS, Wang YX, Wang DL. *Exophiala asiatica*, a new species from a fatal case in China. Med Mycol 2009; **47**:101-9.

López-Jodra O, Torres-Rodríguez JM. Unusual fungal species causing onychomycosis. Rev Iberoam Micol 1999; **16**:S11-5.

López Martínez R, Méndez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. Clin Dermatol 2007; **25**:188-94.

Lyons MK, Blair JE, Leslie KO. Successful treatment with voriconazole of fungal cerebral abscess due to *Cladophialophora bantiana*. Clin Neurol Neurosurg 2005; **107**:532-4.

MacCallum DM, Odds FC. Influence of grapefruit juice on itraconazole plasma levels in mice and guinea pigs. J Antimicrob Chemother 2002; **50**:219-24.

MacCallum DM, Whyte JA, Odds FC. Efficacy of caspofungin and voriconazole combinations in experimental aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2005; **49**:3697-701.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock. Biología de los microorganismos. 12ª ed. Pearson Addison-Wesley, Reading, Mass, USA, 2009.

Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 2006; **44**:3251-6.

Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. Combined antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cladophialophora bantiana*. Med Mycol 2009; **47**:45-9.

Marr KA. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. Med Mycol 2008; **46**:293-302.

Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 2004; **39**:797-802.

Matsumoto T, Matsuda T, McGinnis MR, Ajello L. Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections. Mycoses 1993; **36**:145-55.

Mavridou E, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene. Antimicrob Agents Chemother 2010; **54**:860-5.

Mavridou E, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Verweij PE, Mouton JW. Impact of *cyp51A* mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2010; **54**:4758-64.

Mayanja-Kizza H, Oishi K, Mitarai S, Yamashita H, Nalongo K, Watanabe K, Izumi T, Ococi-Jungala, Augustine K, Mugerwa R, Nagatake T, Matsumoto K. Combination therapy with fluconazole and flucytosine for cryptococcal meningitis in Ugandan patients with AIDS. Clin Infect Dis 1998; **26**:1362-6.

Mayr A, Lass-Flörl C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. Eur J Med Res 2011; **16**:153-7.

McGinnis MR, Rinaldi MG. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. En: Lorian V (ed.). Antibiotic in Laboratory Medicine. 3rd ed. Williams and Wilkins Co. MD, Baltimore, USA, 1996; pp. 176-211.

Mittal V, Mittal R, Sharma PC. Voriconazole-refractory fungal infection of phacoemulsification tunnel. Indian J Ophthalmol 2010; **58**:434-7.

Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, Fridkin SK, Pappas PG, Warnock DW. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. Med Mycol 2005; **43**:49-58.

Morio F, Berre JY, Garcia-Hermoso D, Najafzadeh MJ, de Hoog S, Benard L, Michau C. Phaeohyphomycosis due to *Exophiala xenobiotica* as a cause of fungal arthritis in an HIV-infected patient. Med Mycol 2012, DOI: 10.3109/13693786.2011.648218

Murray SC, Dawber RP. Onychomycosis of toenails: orthopaedic and podiatric considerations. Australas J Dermatol 2002; **43**:105-12.

Nachman S, Alpan O, Malowitz R, Spitzer ED. Catheter-associated fungemia due to *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. J Clin Microbiol 1996; **34**:1011-3.

Nagasaki Y, Eriguchi Y, Uchida Y, Miyake N, Maehara Y, Kadowaki M, Harada M, Akashi K, Shimono N. Combination therapy with micafungin and amphotericin B for invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompromised mouse model. *J Antimicrob Chemother* 2009, **64**:379-82.

Najafzadeh MJ, Gueidan C, Badali H, Gerrits van den Ende AHG, Xi L. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med Mycol* 2009; **47**:17-25.

Negróni R, Arechavala AI. Itraconazole: pharmacokinetics and indications. *Arch Med Res* 1993; **24**:387-93.

Negróni R, Helou SH, Petri N, Robles AM, Arechavala A, Bianchi MH. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeohyphomycosis due to *Exophiala spinifera*. *Clin Infect Dis* 2004; **38**:15-20.

Negróni R, Tobón A, Bustamante B, Shikanai-Yasuda MA, Patino H, Restrepo A. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. *Rev Inst Trop Sao Paulo* 2005; **47**:339-46.

Ng AW, Wasan KM, Lopez-Berestein G. Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. *J Pharm Pharm Sci* 2003; **6**:67-83.

Nóbrega JP, Rosemberg S, Adami AM, Heins-Vaccari EM, da S. Lacaz C, de Brito T. *Fonsecaea pedrosoi* cerebral phaeohyphomycosis ("Chromoblastomycosis"). First human culture-proven case reported in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; **45**:217-20.

Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; **11**:272-9.

Odds FC, van Gerven F, Espinel-Ingroff A, Bartlett MS, Ghannoum MA, Lancaster MV, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, and Walsh TJ. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of

filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:282-8.

Okamoto J, Fukunami M, Kioka H. Frequent premature ventricular contractions induced by itraconazole. *Circ J* 2007; **71**:1323-5.

Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **50**:247-51.

Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra ME, Melillo L, Aversa F, Van Lint MT, Falcucci P, Valentini CG, Girmenia C, Nosari A. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006, **91**:1068-75.

Paniz-Mondolfi AE, Reyes Jaimes O, Dávila Jones L. Lobomycosis in Venezuela. *Int J Dermatol* 2007; **46**:180-5.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America Clinical Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 2009; **48**:503-35.

Pastor FJ, Guarro J. In vitro activity of the echinocandins. How should it be evaluated? *Rev Iberoam Micol* 2005; **22**:133-40.

Pastor FJ, Guarro J. Anidulafungin: experimental therapy of fungal infections in animal models. *Rev Iberoam Micol* 2008; **25**:119-23.

Pedroso A, Gomez JM. Sobre quatro casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia 1920; **11**:53-61.

Perea S, Gonzalez G, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, Patterson TF. In vitro interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. Antimicrob Agents Chemother 2002; **46**:3039-41.

Perkhofer S, Jost D, Dierich MP, Lass-Flörl C. Susceptibility testing of anidulafungin and voriconazole alone and in combination against conidia and hyphae of *Aspergillus* spp. under hypoxic conditions. Antimicrob Agents Chemother 2008; **52**:1873-5.

Perkhofer S, Lass-Flörl C. Anidulafungin and voriconazole in invasive fungal disease: pharmacological data and their use in combination. Expert Opin Investig Drugs 2009; **18**:1393-404.

Person AK, Chudgar SM, Norton BL, Tong BC, Stout JE. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. J Med Microbiol 2010; **59**:834-8.

Petraitis V, Petraitiene R, Groll AH, Bell A, Callender DP, Sein T, Schaefele RL, McMillian CL, Bacher J, Walsh TJ. Antifungal efficacy, safety, and single-dose pharmacokinetics of LY303366, a novel echinocandin B, in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. Antimicrob Agents Chemother 1998; **42**:2898-905.

Petraitis V, Petraitiene R, Hope WW, Meletiadis J, Mickiene D, Hughes JE, Cotton MP, Stergiopoulou T, Kasai M, Francesconi A, Schaefele RL, Sein T, Avila NA, Bacher J, Walsh TJ. Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: in vitro and in vivo correlations of the concentration- and dose- dependent interactions between anidulafungin and voriconazole by Bliss independence drug interaction analysis. Antimicrob Agents Chemother 2009; **53**:2382-91.

Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; **125**:S3-S13.

Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, Diekema D. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the triazoles. *J Clin Microbiol* 2011; **49**:586-90.

Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, Rex JH, Alexander BD, Andes D, Brown SD, Chatuverdi V, Espinel-Ingroff A, Fowler CL, Johnson EM, Knapp CC, Motyl MR, Ostrosky-Zeichner L, Sheehan DJ, Walsh TJ; Clinical and Laboratory Standards Institute Antifungal Testing Subcommittee. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2009; **47**:3142-6.

Pfaller MA, Rinaldi MG. In vitro testing of susceptibility of fluconazole. En: Powderly WB, Vant Wout JW. (eds.). *The antifungal agents. Fluconazole.* Marius Press, Lancashire, United Kingdom. 1992; pp.10-22.

Philip A, Odabasi Z, Rodriguez J, Paetznick VL, Chen E, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. In vitro synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:3572-4.

Pitisuttithum P, Negroni R, Graybill JR, Bustamante B, Pappas P, Chapman S, Hare RS, Hardalo CJ. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**:745-55.

Poirriez, J, Breuillard F, Francois N, Fruit J, Sendid B, Gross S, Deic-Cas E. A case of chromoblastomycosis treated by a combination of

cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine and oral amphotericin B. *Am J Trop Med Hyg* 2000; **63**:61-3.

Pradeepkumar NS, Joseph NM. Chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii* in a child from India. *J Infect Dev Ctries* 2011; **5**:556-60.

Pradinaud R, Bolzinger T. Treatment of chromoblastomycosis. *J Am Acad Dermatol* 1991; **25**:869-70.

Pujol I, Guarro J, Sala J, Riba MD. Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against *Fusarium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:808-11.

Queiroz-Telles F, Esterre P, Pérez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2009; **47**:3-15.

Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2011; **49**:225-36.

Quindós G, Eraso E. Importancia actual de la aspergilosis invasora. En: Pontón J. (ed.). *Aspergilosis invasora*. 2ª ed. Revista Iberoamericana de Micología-Asociación Española de Micología, Bilbao, España. 2008; pp. 3-6.

Raad II, Graybill JR, Bustamante AB, Cornely OA, Gaona-Flores V, Afif C, Graham DR, Greenberg RN, Hadley S, Langston A, Negrón R, Perfect JR, Pitisuttithum P, Restrepo A, Schiller G, Pedicone L, Ullmann AJ. Safety of long-term oral posaconazole use in the treatment of refractory invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 2006; **15**:1726-34.

Revankar SG. Phaeohyphomycosis. *Infect Clin Dis North Am* 2006; **20**:609-20.

Revankar SG, Graybill JR. Antifungal therapy. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds.) Clinical Mycology. Elsevier Science, USA. 2003; pp. 157-92.

Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, Pullen R, Rinaldi MG. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. Clin Infect Dis 2002; **34**:467-76.

Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. 2010; Clin Microbiol Rev **23**:884-928.

Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 1993; **6**:367-81.

Richardson MD, Warnock DW. Fungi as human pathogens. A: Richardson MD, Warnock DW (eds.): Fungal infection. Diagnosis and management. 3rd edn. Wiley-Blackwell. Oxford, 2003; pp. 4-6.

Roberts J, Schock K, Marino S, Andriole VT. Efficacies of two new antifungal agents, the triazole ravuconazole and the echinocandin LY-303366, in an experimental model of invasive aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2000; **44**:3381-8.

Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. Clin Infect Dis 2005; **41**:634-53.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Calvo E, Salas V, Sutton DA, Guarro J. Correlation of in vitro activity, serum levels, and in vivo efficacy of posaconazole against *Rhizopus microsporus* in a murine disseminated infection. Antimicrob Agents Chemother 2009; **53**:5022-5.

Rodríguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:2468-72

Rogers TR. Treatment of zygomycosis: current and new options. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**:35-40.

Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifúngicos para uso sistémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27**:353-62.

Safdar A, Papadopoulos EB, Young JW. Breakthrough *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) brain abscess during therapy for invasive pulmonary aspergillosis following high-risk allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Scedosporiasis and recent advances in antifungal therapy. Transpl Infect Dis* 2002; **4**:212-7.

Salas V, Pastor FJ, Rodríguez MM, Calvo E, Mayayo E, Guarro J. In vitro activity and in vivo efficacy of posaconazole in treatment of murine infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**:676-9.

Samson RA, Varga J, Frisvad JC. Taxonomic studies of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 2011; **69**:1-97.

Sánchez Carazo JL, Obón Losada L, Pont Sanjuan V. Current treatment of superficial mycosis. *Rev Iberoam Micol* 1999; **16**:S26-30.

Schuster F, Moelter C, Schmid I, Graubner UB, Kammer B, Belohradsky BH, Führer M. Successful antifungal combination therapy with voriconazole and caspofungin. *Pediatr Blood Cancer* 2005; **15**:682-5.

Serrano MC, Valverde-Conde A, Chávez M M, Bernal S, Claro RM, Pemán J, Ramirez M, Martín-Mazuelos E. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366)

and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; **45**:131-5.

Shadomy S, Shadomy HJ. Comparative in vitro antifungal susceptibility studies with 30 serotype A and B isolates of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991; **14**:21-2.

Shalit I, Shadkchan Y, Samra Z, Osherov N. In vitro synergy of caspofungin and itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus minimal effective concentration end points. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:1416-8.

Shao PL, Huang LM, Hsueh PR. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **30**:487-95.

Shimoni Z, Goldenberg A, Niven M. Fatal invasive pulmonary aspergillosis presenting as profound hypoglycemia in a patient with anorexia nervosa. *Eur J Inter Med* 2006; **17**:295-7.

Siebenhaar F, Syska W, Weller K, Magerl M, Zuberbier T, Metz M, Maurer M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* skin infections in mice is mast cell-dependent. *Am J Pathol* 2007; **170**:1910-6.

Singh N, Limaye AP, Forrest G, Safdar N, Muñoz P, Pursell K, Houston S, Rosso F, Montoya JG, Patton P, del Busto R, Aguado JM, Fisher RA, Klintmalm GB, Miller R, Wagener MM, Lewis RE, Kontoyiannis DP, Husain S. Combination of voriconazole and caspofungin as primary therapy for invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients: a prospective, multicenter, observational study. *Transplantation* 2006; **81**:320-6.

Sionov E, Mendlovic S, Segal E. Efficacy of amphotericin B or amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis. *J Infect* 2006; **53**:131-9.

Sucher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother* 2009; **43**:1647-57.

Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med Mycol* 2000; **38**:209-12.

Sugar AM, Liu XP. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**:601-4.

Surash S, Tyagi A, de Hoog GS, Zeng JS, Barton RC, Hobson RP. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. *Med Mycol* 2005; **43**:465-72.

Takei H, Goodman JC, Powell SZ. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora bantiana* and *Fonsecaea monophora*: Report of three cases. *Clin Neuropathol* 2007; **26**:21-7.

Taylor JW, Spatafora J, O'Donnell K, Lutzoni F, James T, Hibbett DS, Geiser D, Bruns TD, Blackwell M. The Fungi. En: Cracraft J, Donoghue MJ (eds.). *Assembling the tree of life*. 1st ed. Oxford University Press, United Kingdom. 2004; pp. 171-94.

Theuretzbacher U. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of echinocandins. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2004; **23**:805-12.

Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis* 1999; **1**:273-83.

Thomas A, Korb V, Guillemain R, Caruba T, Boussaud V, Baillaud E, Prognon P, Begué D, Sabatier B. Clinical outcomes of lung-transplant recipients treated by voriconazole and caspofungin combination in aspergillosis. *J Clin Pharm Ther* 2010; **35**:49-53.

Tintelnot K, de Hoog GS, Thomas E, Steudel WI, Huebner K, Seeliger HP. Cerebral phaeohyphomycosis caused by an *Exophiala* species. *Mycoses* 1991; **34**:239-44.

Trifilio S, Ortiz R, Pennick G, Verma A, Pi J, Stosor V, Zembower T, Mehta J. Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**:509-13.

van de Sande WW, Mathotten RA, ten Kate MT, van Vianen W, Tavakol M, Rijnders BJ, Bakker-Woudenberg IA. Combination therapy of advanced invasive pulmonary aspergillosis in transiently neutropenic rats using human pharmacokinetic equivalent doses of voriconazole and anidulafungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:2005-13.

Vazquez JA. The safety of anidulafungin. *Expert Opin Drug Saf* 2006, **5**:751-8.

Vazquez JA, Sobel JD. Anidulafungin: a novel echinocandin. *Clin Infect Dis* 2006; **43**:215-22.

Verweij PE, Howard SJ, Merchers WJ, Denning DW. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009; **12**:141-7.

Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007; **356**:1481-3.

Verweij PE, Oakley KL, Morrissey J, Morrissey G, Denning DW. Efficacy of LY303366 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:873-8.

Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009; **9**:789-95.

Vitale RG, Pérez-Blanco M, de Hoog GS. In vitro activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med Mycol* 2009; **47**:35-40.

Viudes A, Pemán J, Cantón E, Ubeda P, Gobernado M. Update on the pharmacological interactions of systemic antifungal agents *Rev Esp Quimioter* 1999; **12**:107-15.

Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF; Infectious Diseases Society of America. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; **46**:327-60.

Warn PA, Sharp A, Mosquera J, Spickermann J, Schmitt-Hoffmann A, Heep M, Denning DW. Comparative in vivo activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**:1198-207.

Warris A, Weemaes CM, Verweij PE. Multidrug resistance in *Aspergillus fumigatus*. *N Engl J Med* 2002; **347**:2173-4.

Whittaker RH. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 1969; **163**:150-60.

Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Chi J, Prince RA, Tam VH, Lewis RE. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: evidence of concentration-dependent activity. *J Infect Dis* 2004; **15**:1464-71.

Wiederhold NP, Lewis RE. The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; **12**:1313-33.

Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, Graybill JR, Patterson TF. Efficacy of posaconazole as treatment and prophylaxis against *Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **54**:1055-9.

Xavier MO, Sales P Mda, Camargo Jde J, Pasqualotto AC, Severo LC. *Aspergillus niger* causing tracheobronchitis and invasive pulmonary aspergillosis in a lung transplant recipient: case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; **41**:200-1.

Xi L, Lu C, Sun J, Li X, Liu H, Zhang J, Xie Z, de Hoog GS. Chromoblastomycosis caused by a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora*. *Med Mycol* 2009; **47**:77-80.

Xi L, Sun J, Lu C, Liu H, Xie Z, Fukushima K, Takizawa K, Najafzadeh MJ, de Hoog GS. Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in southern China. *Med Mycol* 2009; **47**:27-33.

Zeng JS, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Harrak MJ, de Hoog GS. Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:3713-20.

Zhang J, Xi L, Lu C, Li X, Xie T, Zhang H, Xie Z, de Hoog GS. Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. *Mycoses* 2009; **52**:176-81.