



TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

ISBN: 978-84-694-1251-0
Dipòsit Legal: T-316-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

M^a del Mar Rodríguez Peña

**TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE
MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR
HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS**

TESIS DOCTORAL

**Dirigida por los Dres. Josep Guarro Artigas y
Francisco Javier Pastor Molas**

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat Rovira i Virgili

Josep Guarro Artigas, Catedràtic de Microbiologia de la Facultat de Medicina y Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili y Francisco Javier Pastor Molas, Professor Titular de la Facultat de Medicina y Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili

CERTIFICAN QUE:

La Tesis Doctoral titulada "TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS", presentada por M^a del Mar Rodríguez Peña, 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, 9 de desembre de 2009

Dr. Josep Guarro Artigas

Dr. Francisco Javier Pastor Molas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

A Jose

“Puedes ser solamente una persona para el mundo, pero para una persona tú eres el mundo”. G.G.Márquez.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

AGRADECIMIENTOS

Durante estos cuatro años he aprendido muchas cosas que me han ayudado a crecer como persona y como profesional. Este apartado está dedicado a todas aquellas personas que han compartido conmigo todo este tiempo y que han sido partícipes de esta tesis.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Josep Guarro y el Dr. Francesc Xavier Pastor por su inestimable labor en esta tesis doctoral.

Concretamente, al Dr. Josep Guarro por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a un gran equipo de científicos de prestigio, y por haberme enseñado a ser constante y exigente en mi trabajo con su ejemplo. Muchas gracias por haberme dedicado parte de tu tiempo.

Al Dr. Francesc Xavier Pastor, muchas gracias por tu paciencia, tus conocimientos, tus consejos, tu apoyo, tu cercanía y por estar siempre que te necesitamos.

A los doctores Josepa Gené, María José Figueres, Josep Cano, Alberto Stchigel, Emili Mayayo, Isabel Pujol, Javier Capilla y Dania García, por su incondicional ayuda y apoyo durante este tiempo.

Muy especialmente, quisiera agradecer a mi amiga la Dra. Carolina Serena, por ser mi profesora y mi apoyo en los primeros años. Te he echado mucho de menos, pero sé que siempre podré contar contigo allí donde estemos.

A los Doctores Félix Gilgado, Rita Marimón y Mónica Azor, con los que he compartido muchos buenos momentos y a los que he echado mucho de menos estos últimos tiempos, siempre os llevaré en mi corazón. Muchas gracias Félix por tu valiosa amistad.

A mis compañeros de trabajo, en especial a Cati, y a Enrique, por ser más amigos que compañeros, muchas gracias por vuestro apoyo, por las risas y por los buenos momentos que hemos pasado, os echaré mucho de menos. A Valentina, por su amistad y por darme aliento cuando lo he necesitado. A Marçal, por su buena disponibilidad a ayudarme siempre que lo he necesitado. A Anabel, a Carolina, a Eduardo, a Haybrig, a Hugo, a Ingrid, a Luis, a Mabel, a Ester, a Núria, a Carme, a Fabiola, a Sara, a Margarita, a Alexandra, a Roxana, a Kendra, y a todos los investigadores que han pasado por nuestro laboratorio, muchas gracias por los momentos compartidos, os echaré de menos.

A mi hermana Susanna, mi protectora a la que quiero un montón, a mi cuñado, a mi Alexia y mi Jose mari, a mi Messi, a mis suegros (mis segundos padres), a mis primas a las que adoro (Elena, Yoli, Isa, Jessi y Merche), y a toda mi gran familia de la que tengo la suerte de formar parte.

A Jose, mi “moxuelo”, por aguantarme, por apoyarme siempre en todo y por hacer mi vida un poquito más feliz cada día. Te quiero.

Y muy especialmente a mis padres, mis mejores amigos y consejeros, sin vuestro apoyo incondicional yo nunca habría llegado a ser la persona que soy. Os quiero.

Índice

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Siglas y símbolos	V
1. Introducción	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Micosis causadas por hongos filamentosos	3
1.2.1 Micosis superficiales.....	4
1.2.2 Micosis cutáneas.....	4
1.2.3 Micosis subcutáneas.....	5
1.2.4 Micosis sistémicas.....	7
1.2.4.1 Zigomicosis.....	9
1.2.4.2 Escedosporiosis.....	12
1.2.4.3 Paecilomicosis.....	14
1.3 Antifúngicos	15
1.4.1 Polienos	16
1.4.2 Azoles	18
1.4.3 Análogos de precursores de ácidos nucleicos	20
1.4.4 Equinocandinas	21
1.4.5 Alilaminas	21
1.4 Nuevas estrategias terapéuticas	22
1.4.1 Terapias antifúngicas combinadas.....	22
1.4.2 Inmunomoduladores.....	23
1.5 Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos	24
1.5.1 Métodos <i>in vitro</i>	25
1.5.2 Métodos <i>in vivo</i> . Modelos experimentales	28
2. Interés y objetivos del estudio	31
3. Materiales y Métodos	39

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	43
3.1.4.1 Preparación de las microplacas de antifúngicos	43
3.1.4.2 Preparación de microplacas de combinaciones antifúngicas	45
3.1.4.2.1 Combinaciones dobles.....	45
3.1.4.2.2 Combinaciones triples.....	46
3.1.4.3 Preparación de los inóculos para los estudios <i>in vitro</i>	48
3.1.4.4 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	52
3.2.5 Fármacos.....	52
3.2.5.1 Antifúngicos.....	52
3.2.5.2 Citocinas.....	53
3.2.6 Tratamientos, dosis y vías de administración	53
3.2.7 Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado	55
3.2.8 Análisis estadístico	55
3.2.9 Bioensayo.....	56
3.2.10 Histopatología	58

4. Resultados	61
4.1 Posaconazole combined with amphotericin B, an effective therapy for a murine disseminated infection caused by <i>Rhizopus oryzae</i>.	63
Rodríguez MM, Serena C, Mariné M, Pastor FJ, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008, 52:3786-3788.	
4.2 Posaconazole efficacy in a murine disseminated infection caused by <i>Paecilomyces lilacinus</i>.	69
Rodríguez MM, Pastor FJ, Serena C, and Guarro J. Journal of Antimicrobial Agents. 2009, 63:361-364.	
4.3 Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by <i>Scedosporium prolificans</i>.	75
Rodríguez MM, Calvo E, Serena C, Marine M, Pastor FJ, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53:2153-2155.	
4.4 Efficacy of liposomal amphotericin B combined with gamma interferon or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of systemic zygomycosis in mice.	81
Rodríguez MM, Calvo E, Mariné M, Pastor FJ, Fernández-Ballart J, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53:3569-3571.	
4.5 Correlation of in vitro activity, serum levels, and in vivo efficacy of posaconazole against <i>Rhizopus microsporus</i> in a murine disseminated infection.	87
Rodríguez MM, Pastor FJ, Calvo E, Salas V, Sutton DA, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53:5022-5025.	
4.6 Efficacy of voriconazole in a murine model of invasive paecilomycosis.	93
Rodríguez MM, Pastor FJ, Serena C, and Guarro J. International Journal of Antimicrobial Agents. 2009. Aceptado.	
4.7 Correlation between in vitro activity of posaconazole and in vivo efficacy against <i>Rhizopus oryzae</i> infection in mice.	109
Rodríguez MM, Pastor FJ, Sutton DA, Calvo E, Fothergill AW, Salas V, Rinaldi MG, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009. En revisión.	
4.8 Experimental murine scedosporiosis: histopathology and azole treatment.	129
Rodríguez MM, Pastor FJ, Salas V, Calvo E, Mayayo E, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009. Enviado.	
5. Discusión	151
5.1 Zigomicosis	153
5.2 Escedosporiosis	158

Índice

5.3 Paecilomicosis.....	161
6. Conclusiones	165
7. Bibliografía	173

ANEXO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CLSI	<i>Clinical and laboratory standards institute</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetil sulfóxido
FICI	Índice de concentración inhibitoria concentrada
FMR	<i>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus</i>
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GMS	Nitrato de metenamina argéntica de Grocott
H-E	Hematoxilina-eosina
IFN-γ	Interferón gamma
IHEM	<i>Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institutue</i>
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
ml	Mililitro
PAS	Ácido periódico de Schiff
PDA	Agar patata dextrosa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TMS	Tiempo medio de supervivencia
UFC	Unidades formadoras de colonias
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrometro

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Introducción

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

1. Introducción

1.1. Generalidades

El reino de los hongos está constituido por un grupo muy numeroso de organismos. Se estima que pueden existir entre 1 y 1.5 millones de especies, de las que, hasta el momento, sólo se han descrito aproximadamente unas 500.000. De las especies descritas actualmente, sólo unas 200 aproximadamente, se asocian a enfermedades humanas (Richardson y Warnock, 1997).

El Reino *Fungi* se divide en cuatro phyla: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y Chytridiomycota (Taylor *et al.*, 2004). El phylum Ascomycota es el más extenso, comprendiendo el 50% de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos (Pontón *et al.*, 2002). Actualmente todos los niveles taxonómicos del reino de los hongos se encuentran en un estado de constante modificación debido a las recientemente incorporadas técnicas de biología molecular en micología.

Los hongos son organismos eucariotas que se desarrollan en lugares húmedos y con poca luz. Su nutrición es heterótrofa, lo que significa que degradan la materia orgánica hasta convertirla en sustancias nutritivas asimilables, que son acumuladas en forma de glucógeno. A los hongos se les consideraba erróneamente desde la antigüedad como vegetales, por la inmovilidad y la presencia de pared celular. Actualmente se sabe que los hongos son más cercanos al reino animal (*Animalia*) que al reino vegetal (*Plantae*) (Pontón *et al.*, 2002). En cuanto a su estructura, los hongos se diferencian de las plantas en que carecen de cloroplastos y clorofila y en que la pared celular está compuesta principalmente por polisacáridos como la quitina y el glucano y por diversas proteínas. Por otro lado, a diferencia de los animales que ingieren el alimento, los hongos lo absorben, y sus células tienen pared celular.

La mayoría de hongos, incluso la mayoría de los patógenos para el hombre, se encuentran libremente distribuidos en la naturaleza debido a su actividad metabólica adaptada a la degradación y reciclaje de la materia orgánica, particularmente la vegetal. Los hongos que descomponen organismos muertos

que contienen celulosa o almidón se denominan saprobios. A los hongos que pueden estar en simbiosis asociados con plantas en forma de micorrizas (Clay, 1988), donde viven asociados a las raíces de éstas ayudándolas a absorber nutrientes del suelo, se les conoce como mutualistas. Otros hongos producen infecciones en plantas y animales, incluyendo al hombre, y se consideran patógenos.

A los procesos infecciosos por hongos se les conoce con el nombre de micosis. El establecimiento de una micosis implica la capacidad del microorganismo de crecer en las condiciones de pH, temperatura y potencial redox presentes en tejidos del huésped, siendo dichas condiciones generalmente poco favorables para el crecimiento y desarrollo de los hongos. Los patógenos deben poseer, por tanto, ciertas características que les permitan sobrevivir en tal ambiente así como mecanismos para evadir las defensas del huésped (Clemons y Stevens, 2000; Casadevall y Pirofski, 2001). La mayoría de hongos poseen escaso poder patógeno, sin embargo algunas especies han logrado adaptarse a las condiciones desfavorables impuestas por el huésped y desarrollarse en sus tejidos. De todas formas la virulencia de un microorganismo depende tanto de las características del microorganismo como del factor propio del huésped (Casadevall y Pirofski, 2001), por lo que el establecimiento de una enfermedad infecciosa depende del estrecho equilibrio entre el huésped y el microorganismo.

Los hongos tienen un gran impacto económico, no tan sólo por su utilidad, sino también por el daño que pueden causar. Los hongos son de gran importancia clínica debido a su capacidad de provocar enfermedades a seres humanos y animales. En cuanto a su utilidad industrial éstos intervienen en la producción de alimentos (pan, queso, vino, cerveza...), vitaminas, y también fuente de muchas enzimas comerciales, ácidos orgánicos, antibióticos (cefalosporinas, penicilina...) y antifúngicos (griseofulvina y caspofungina) (Carlile *et al.*, 2001).

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme.

Las levaduras están constituidas por células aisladas, ovals. Su crecimiento en medios de cultivo sólidos da lugar a colonias lisas que recuerdan a las

bacterianas. Se reproducen generalmente por gemación, aunque algunas lo hacen por fisión binaria. Este grupo de hongos comprende a géneros como *Candida*, *Saccharomyces* o *Cryptococcus*, incluyendo representantes patógenos primarios y patógenos oportunistas (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) así como otros de gran importancia en la industria alimentaria (*Saccharomyces cerevisiae*).

Los hongos filamentosos son multicelulares y al microscopio óptico presentan unas estructuras tubulares, formadas por múltiples células, denominadas hifas que pueden alcanzar varios centímetros de longitud. Las hifas crecen por elongación de su extremo distal, y de las porciones viejas emergen ramificaciones laterales. Los diferentes géneros y especies de hongos filamentosos, en su fase asexual, se diferencian principalmente por la conidiogénesis, y por las características morfológicas observadas en los conidios y en las células conidiógenas, datos que son los que nos permiten su clasificación (Alexopoulos *et al.*, 1996). Entre los hongos filamentosos los géneros de mayor interés en clínica son: *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Scedopsporium* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp., etc.

Algunos hongos, entre ellos varios patógenos para el hombre, son dimórficos; presentándose como levadura en la forma parasitaria (Rippon *et al.*, 1988) en los tejidos, y como moho en su hábitat natural o al revés. La transición levadura-moho o viceversa, esta influenciada por múltiples factores, como la temperatura, el potencial redox, la tensión parcial de CO₂, los nutrientes, y otros, y pueden ser obtenidas *in vitro* en condiciones especiales de cultivo. Los principales representantes con importancia médica de este grupo son: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* y *Sporothrix schenckii*.

1.2. Micosis causadas por hongos filamentosos

Hasta hace unas décadas en nuestro país, las técnicas de laboratorio se aplicaban en el diagnóstico de micosis superficiales como tiñas, infecciones muco-cutáneas, etc. La pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en los años ochenta, los avances en la cirugía de trasplantes de

órganos y de médula ósea, las nuevas terapias anticancerosas, etc., que condicionan un estado de inmunodepresión severa en los pacientes, han favorecido el aumento de la incidencia de las micosis invasoras. Los hongos pueden originar procesos infecciosos muy variados que pueden ser clasificados de acuerdo a su localización anatomoclínica. Según este criterio las micosis se pueden clasificar en: superficiales, cutáneas, subcutáneas, profundas o sistémicas.

1.2.1. Micosis superficiales

Son aquellas adquiridas por contacto y que afectan a la capa córnea de la piel y a la porción suprafolicular del pelo. Este tipo de micosis afecta tejidos inertes por lo que no tiene lugar una respuesta inmunitaria detectable en el huésped. El diagnóstico de las infecciones superficiales es relativamente sencillo y la terapia específica suele proporcionar buena respuesta clínica.

Las micosis superficiales conocidas como piedras afectan a la porción extrafolicular del pelo con presencia de nódulos duros e irregulares formados por agregados fúngicos. La piedra negra está producida por el ascomiceto *Piedraia hortae*. La piedra blanca es producida por *Trichosporon* spp., *Trichophyton mentagrophytes*, *Acremonium* spp., *Scopulariopsis* spp., y *Fusarium* spp. pueden producir onicomycosis, que es la infección por hongos de la uña, tanto de la placa como del lecho ungueal (Torres-Rodríguez y López-Jodra, 2000).

1.2.2. Micosis cutáneas

Este tipo de infecciones conocidas como dermatomicosis incluye una gran variedad de procesos en los que la piel y sus anejos (pelos y uñas) pueden estar afectados. Difieren de las micosis superficiales en que pueden afectar a capas más profundas de la piel provocando la respuesta inmunitaria del huésped. Los hongos dermatofitos son los principales causantes de este tipo de infecciones cutáneas siendo *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*

los géneros más frecuentemente implicados (de Hoog *et al.*, 2000). En estos casos hablamos de dermatofitosis por estar causado por hongos dermatofitos. Según la zona anatómica a la que afecta 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) y *Tinea pedis* (planta y espacios interdigitales de los pies). Las dermatofitosis se encuentran entre las infecciones de mayor prevalencia en el mundo y su presencia en el ser humano ha sido documentada a lo largo de la historia (Rubio *et al.*, 2001). Epidemiológicamente su incidencia varía según el país y la especie que la produce, pudiendo ser además antropofílicas, zoofílicas y geofílicas, según su hábitat preferente: el ser humano, los animales o el suelo.

La etiología de las infecciones cutáneas no se encuentra limitada a este grupo de hongos ya que algunos hongos no dermatofitos pueden también estar implicados en dichas infecciones. Existen varios ejemplos de dermatomicosis: *Syctalidium dimidiatum* y *S. hyalinum*, clínicamente parecidos a *T. pedis* y *T. manum* ya que afectan a la piel de las palmas de las manos, las plantas de los pies y los espacios interdigitales, *Scopulariopsis brevicaulis* como causante de onicomycosis y *Nattractasia mangiferae* de hiperqueratosis en manos y pies. Las micosis cutáneas pueden evolucionar hacia la producción de lesiones subcutáneas (Erbagci, 2002; Smith *et al.*, 1991).

1.2.3. Micosis subcutáneas

Son infecciones del tejido subcutáneo afectando a las capas profundas de la dermis y tejido celular subcutáneo pudiéndose extender a músculo y hueso. La infección se produce frecuentemente por inoculación traumática de material punzante contaminado por lo que también se les conoce como micosis por implantación. Tienden a ser localizadas y rara vez diseminan por vía hematogena. En nuestro país la micosis subcutánea más importante es la esporotricosis seguida de la feohifomicosis subcutánea.

La esporotricosis esta causada por la inoculación traumática de *S. schenckii*. Este hongo habita asociado a la vegetación por lo que la incidencia de la

infección es mayor en trabajadores agrícolas, siendo una enfermedad profesional de guardabosques, horticultores, jardineros y personal agrícola. Se trata de un proceso crónico con afectación nodular del tejido cutáneo y subcutáneo acompañado de linfangitis. La esporotricosis linfocutánea representa más del 75% de las distintas formas clínicas que puede presentar esta infección. La infección cursa con formación de úlceras purulentas con márgenes enrojecidos, siendo frecuente la afectación de los ganglios linfáticos regionales (Lyon *et al.*, 2003). Así mismo puede producirse la afectación osteoarticular y visceral tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos (Morris-Jones, 2002). Una forma clínica de la enfermedad más limitada y menos progresiva consiste en la esporotricosis dermoepidérmica, donde aparece una única lesión y los vasos linfáticos adyacentes no suelen estar infectados.

La cromoblastomicosis se caracteriza por lesiones ulceradas no exudativas, poco extensas, de evolución crónica que suelen localizarse preferentemente en las extremidades. Pueden diseminarse vía linfática. Los principales agentes causantes de la cromoblastomicosis son: *Cladophialophora carrioni*, *Fonsecaea* spp. (de Hoog *et al.*, 2000), *Phialophora verrucosa* (Sharma *et al.*, 2002) o *Exophiala dermatitidis* (Clancy *et al.*, 2000)

La feohifomicosis cutánea es una infección cutánea o subcutánea producida por implante traumático del agente causal. Los agentes etiológicos principales son: *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvalaria geniculata*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala moniliae*, *Wangiella dermatitidis* y *Pleurostomophora richarsidae*. Estos hongos son dematiáceos, lo que significa que tienen como característica la pigmentación oscura de las hifas y/o los conidios.

Otro tipo de proceso es el micetoma, clínicamente caracterizado por la presencia de nódulos persistentes localizados en tejido subcutáneo que terminan fistulizando en la piel. Por contigüidad se van formando nuevas lesiones similares. Son lesiones granulomatosas supurativas que drenan abundante pus con gránulos claros o negros. Los micetomas de grano claro están causados principalmente por *Acremonium* spp., *Neotestudina rossatii* y *Pseudallescheria boydii*, mientras que los de grano oscuro están causados por *Exophiala* spp. (de Hoog *et al.*, 2000; Padhye *et al.*, 1984), *Madurella* spp

(McGinnis, 1996), *Leptosphaeria* spp., *S. schenckii* (Pelzer *et al.*, 2000), *Curvularia* sp. (Subramanyam *et al.*, 1993) y *Scytalidium* spp. (Dhindsa *et al.*, 1998).

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

La rinosporidiosis, causada por *Rhinosporidium seeberi*, es una infección primaria de la mucosa nasal caracterizada por la formación de granulomas inflamatorios que pueden llegar a convertirse en pólipos (de Hoog *et al.*, 2000; Van Der Coer *et al.*, 1992). Otros agentes como *Rhizopus* spp. también pueden afectar a la mucosa nasal provocando en este caso una rinitis zigomicótica que puede llegar a invadir los vasos sanguíneos debido al rápido crecimiento del hongo y llegar a afectar al sistema nervioso central originando infartos y meningitis (Chayakulkeeree *et al.*, 2006).

1.2.4. Micosis sistémicas

En las micosis sistémicas se produce la afectación de dos o más órganos no adyacentes, o de un órgano y sangre (Rubio *et al.*, 2001). 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 usualmente no causan infección en el huésped sano. En su etiología están implicadas especies ubicuas, de distribución mundial, colonizadores de diferentes tipos de sustratos vegetales y frecuentes en el ambiente que rodea al hombre.

Los hongos dimórficos se desarrollan como saprótrofos en el suelo, donde presentan una fase de crecimiento filamentoso con producción de conidios. Tras la penetración de estos conidios en los tejidos animales, se producen importantes cambios en la morfología, metabolismo, pared celular y sistema

enzimático del microorganismo que facilitan su diseminación. A pesar de su capacidad invasora el pronóstico es variable, siendo la infección especialmente grave en el caso de pacientes inmunocomprometidos. Por su capacidad de provocar infecciones muy graves destacan *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis* y *C. immitis*. Todos ellos se hallan limitados geográficamente a regiones áridas de América.

Reciben el nombre de hongos filamentosos oportunistas un grupo heterogéneo de hongos saprofitos del suelo, que presentan una distribución geográfica amplia y que tradicionalmente han sido considerados erróneamente como no patógenos. Se ha demostrado reiteradamente que muchos de estos hongos pueden causar micosis sistémicas en determinadas circunstancias generalmente relacionadas con alteraciones inmunitarias del huésped. Suelen afectar a pacientes con alteraciones en la respuesta inmunitaria inespecífica, como la neutropenia, o a aquellos en los que la afectación inmunitaria incluye también la respuesta adaptativa, como es el caso de individuos sometidos a tratamientos sistémicos con corticoides o radioterapia y/o quimioterapia antineoplásica (Spellberg y Edwards, 2001). Si bien las infecciones oportunistas fueron consideradas antaño como afectaciones exóticas o raras, debido a su baja incidencia, a partir de las últimas décadas del siglo XX se ha producido un aumento simultáneo al aumento de población susceptible: pacientes oncológicos, transplantados y con enfermedades autoinmunes. Este incremento en la incidencia de las infecciones por hongos filamentosos oportunistas ha evolucionado paralelamente con el desarrollo de tratamientos antineoplásicos y con los avances en la cirugía de trasplantes de órganos y de médula ósea que, aunque permiten prolongar la vida de pacientes con enfermedades malignas, condicionan un estado de inmunodepresión severa que predispone al establecimiento de este tipo de infecciones. La aparición del SIDA a finales de la década de los 70 como enfermedad inmunosupresiva, ha contribuido también en gran parte a incrementar el desarrollo de infecciones oportunistas, entre las cuales las micosis ocupan un importante lugar. Por otro lado no puede excluirse la posibilidad, aunque rara, de la infección por hongos oportunistas en individuos inmunocompetentes (Greig *et al.*, 2001; Karim *et al.*,

1997), aunque actualmente se conocen como hongos oportunistas a aquellos que sólo producen patología en inmunodeficientes.

Tal y como se ha citado anteriormente en los últimos 20 años se ha observado un importante aumento de la incidencia y prevalencia de las micosis invasoras producidas por hongos filamentosos en patología humana (Enoch *et al.*, 2006; Warnock, 2007). A pesar de los tratamientos con nuevos fármacos o con antifúngicos ya establecidos, las infecciones fúngicas continúan causando una alta mortalidad y morbilidad, especialmente en pacientes inmunodeficientes. Clásicamente se conoce al género *Aspergillus* spp. como el género causante de la mayoría de las infecciones por hongos filamentosos y aunque actualmente este hongo sigue siendo el más frecuentemente aislado, se ha observado un incremento en la incidencia de otros géneros menos estudiados tales como *Rhizopus* spp., *Scedosporium* spp. y *Paecilomyces* spp. entre otros, que son conocidos como hongos oportunistas emergentes (Enoch *et al.* 2006; Warnock, 2007; Chandrasekar, 2009). Al contrario de lo que ocurre con el bien documentado género *Aspergillus* spp., aún se conoce muy poco acerca de la epidemiología, la evolución y la terapia de las infecciones fúngicas causadas por estos hongos oportunistas emergentes, por lo que su estudio conlleva un gran interés.

1.2.4.1. Zigomicosis

A aquellas infecciones causadas por especies de hongos de la división Zygomycota se les conoce como zigomicosis. Estos hongos fueron descritos por primera vez como causantes de enfermedad en 1885 (Torres-Narbona *et al.*, 2007). A este tipo de infecciones también se les conoce como mucormicosis, lo que deriva de la palabra *Mucor*, ya que antiguamente se consideraba erróneamente a este género como el más frecuente involucrado en este tipo de infecciones.

Recientemente estudios moleculares han demostrado que la división Zygomycota debe considerarse obsoleta al no constituir un grupo monofilético (Gené y Guarro, 2008). Los antiguos miembros de la división Zygomycota se distribuyen en la nueva división Glomeromycota, sin importancia desde el punto

de vista clínico, y en las nuevas subdivisiones: Mucormycotina que incluye los órdenes Mucorales, Endogonales y Mortierellales, y Entomophthoromycotina que comprende el orden Entomophthorales entre otros (Gené y Guarro, 2008). Debido a estos cambios se desconoce como denominar correctamente a este tipo de infecciones. Aún así, hemos utilizado a lo largo de esta tesis la denominación tradicional, zigomicosis. Los dos únicos órdenes importantes desde un punto de vista clínico son los Mucorales y los Entomophthorales. Casi todas las especies patógenas para el hombre se incluyen dentro del orden de los Mucorales, que a su vez engloba seis familias diferentes. De estas seis familias, los géneros y especies de la familia *Mucoraceae* son los principales causantes de zigomicosis, destacando a *Rhizopus oryzae* en primer lugar y seguido de *Rhizopus microsporus* como los principales agentes causantes de estas infecciones (Alvarez *et al.*, 2009; Chayakulkeeree *et al.*, 2006; Roden *et al.*, 2005). Uno de los problemas inherentes a las zigomicosis, y que han contribuido durante muchos años a un gran desconocimiento de la etiología y la epidemiología de dichas infecciones, radica en el hecho de que en muchos de los casos clínicos descritos no se ha identificado al agente causal como especie y simplemente se ha referenciado como *Mucor* sp. o *Rhizopus* sp., sin investigar si realmente pertenecían a alguno de dichos géneros. Esto ocurría debido a la creencia equivocada de que, independientemente de la especie que causaba la infección, el tratamiento era el mismo (Bal, 2006).

Los zigomicetos son hongos filamentosos ubicuos oportunistas de distribución universal. Forman parte de la microbiota de piel y mucosas y sus esporas se distribuyen ampliamente en el ambiente. La vía principal de transmisión es la vía aérea mediante inhalación de esporas, o a través de la piel (catéteres intravenosos, venopunción en drogodependientes, tatuajes, mordeduras de animales y picaduras de insectos) (Torres-Narbona *et al.*, 2007). Una vía menos común es la digestiva mediante la ingestión de esporas, descrita como causa de algunos brotes en pacientes oncohematológicos, relacionados con el uso de depresores linguales contaminados (Torres-Narbona *et al.*, 2007). Los factores de riesgo subyacentes más frecuentes para desarrollar una zigomicosis invasora son la neutropenia profunda y persistente, la administración de corticoides a altas dosis en trasplantes de progenitores

hematopoyéticos o en transplantes de órganos sólidos, la diabetes mellitus mal controlada y la acidosis metabólica, las quemaduras extensas y traumatismos penetrantes, trastornos oncohematológicos como leucemias o linfomas y otras enfermedades hematológicas malignas, y la terapia con desferroxiamina (Roden *et al.*, 2005, Torres-Narbona *et al.*, 2007, Rogers, 2008). La neutropenia es un factor de riesgo presente en el 40-100% de los pacientes con enfermedades hematológicas malignas que desarrollan zigomicosis. Las principales formas clínicas que presenta son: orbitorinocerebral, broncopulmonar, cutánea y subcutánea, gastrointestinal y diseminada (Chayakulkeeree *et al.*, 2006).

Aunque hasta hace pocos años la zigomicosis era considerada una micosis poco frecuente, actualmente se le considera la segunda infección fúngica invasora en importancia tras la aspergilosis dentro de las micosis sistémicas causadas por hongos filamentosos (Torres-Narbona *et al.*, 2007). En los últimos años se ha descrito un incremento importante en la incidencia de esta enfermedad en centros hospitalarios europeos y americanos con una gran población de enfermos inmunodeprimidos (Salavert y Pemán, 2009; Gené y Guarro, 2008; Spellberg *et al.*, 2005; Torres-Narbona *et al.*, 2007). En un estudio poblacional multicéntrico llevado a cabo en 50 hospitales españoles que recoge datos del año 2005, la incidencia de zigomicosis fue de 0.62 casos /100.000 ingresos hospitalarios (Torres-Narbona *et al.*, 2007).

Las zigomicosis son infecciones oportunistas, progresivas y devastadoras, en las que la adhesión del hongo a las células endoteliales y el daño producido a las mismas permite los fenómenos de angioinvasión y trombosis venosa fúngica con posterior necrosis tisular y diseminación de la infección (Torres-Narbona *et al.*, 2007). La tasa de mortalidad varía según el género y especie causante de la infección, la forma de presentación clínica, la enfermedad de base y la extensión de la enfermedad. La mortalidad global de los pacientes con zigomicosis es de aproximadamente el 40%, aunque en pacientes oncohematológicos la mortalidad puede superar el 60% y en pacientes con transplante de hígado o corazón es del 100% (Salavert y Pemán, 2009; Greenberg *et al.*, 2006; Husain *et al.*, 2003). El tratamiento de la zigomicosis se basa en cuatro aspectos esenciales: rapidez diagnóstica, eliminación de los

factores predisponentes, resección quirúrgica y tratamiento antifúngico (Rogers, 2008). La elección del antifúngico adecuado debe basarse en estudios clínicos prospectivos, en los datos de la actividad antifúngica *in vitro* y en su comportamiento en modelos experimentales animales.

1.2.4.2. Escedosporiosis

La escedosporiosis incluye un amplio espectro de procesos infecciosos producidos por los hongos del complejo *Pseudallescheria/Scedosporium*. Las especies responsables de estas infecciones son hongos ascomicetos ubicuos, presentes en el suelo, aguas residuales y vegetación en descomposición. Se suelen aislar frecuentemente en áreas industriales, siendo menor su presencia en áreas urbanas y agrícolas (Grenouillet *et al.*, 2009; Kaltseis *et al.*, 2009). Algunas especies de este complejo, en un mismo cultivo pueden presentar las dos formas de reproducción sexual (teleomorfo) y asexual (anamorfo). Tradicionalmente el género anamórfico *Scedosporium* comprendía dos especies de relevancia clínica, *S. apiospermum* (teleomorfo *Pseudallescheria boydii*) y *S. prolificans*. Recientemente, gracias a estudios filogenéticos multilocus se ha demostrado que *S. apiospermum/P. boydii* es un complejo constituido por al menos ocho especies filogenéticas, siendo además *S. apiospermum* y *P. boydii* suficientemente distintos para ser considerados como dos especies diferentes (Gilgado *et al.*, 2005; Gilgado *et al.*, 2008). Las especies de mayor incidencia en patología humana son *S. apiospermum* (teleomorfo *P. apiosperma*), *S. boydii* (teleomorfo *P. boydii*) y *S. prolificans*, mientras que la recientemente descrita *S. aurantiacum* se aísla con menor frecuencia, preferentemente en Australia (Delhaes *et al.*, 2008; Kaltseis *et al.*, 2009).

Desde la década de los 90, hongos emergentes en patología humana como *Scedosporium* spp. han ido adquiriendo protagonismo como causantes de infecciones invasoras en pacientes con enfermedades hematológicas graves (de Hoog *et al.*, 1994). Publicaciones recientes consideran que la scedosporiosis representa aproximadamente el 25% de todas las infecciones fúngicas causadas por hongos filamentosos distintos a *Aspergillus* spp. en

receptores de transplante de órgano sólido y el 29% en receptores de transplante de médula ósea (Hussain *et al.*, 2003; Husain *et al.*, 2005). La gran importancia clínica de estos hongos filamentosos emergentes radica en su gran resistencia a los antifúngicos, y en su capacidad de causar infecciones severas tanto en pacientes inmunocomprometidos como en pacientes inmunocompetentes (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

Las especies del complejo *P. boydii/S. apiospermum* junto con *S. prolificans* son agentes causales de una gran variedad de cuadros clínicos, dando lugar a infecciones diseminadas casi exclusivamente en pacientes con inmunodepresión severa. El tipo de manifestación clínica y la topografía de la infección están en relación con la enfermedad de base, siendo el estado inmunitario de los pacientes los que determinan el tipo y gravedad de la infección, produciéndose los cuadros diseminados en situaciones de neutropenia profunda.

Existen diferencias epidemiológicas en la distribución geográfica de las especies. En contraste con la distribución universal del complejo *P. boydii/S. apiospermum*, las infecciones diseminadas causadas por *S. prolificans* predominan casi exclusivamente en España y Australia, y las localizadas, como es el caso de las infecciones osteoarticulares, se producen preferentemente en el sur de EE.UU. y California (Cortez *et al.*, 2008). *S. aurantiacum* presenta una importante incidencia en Australia (Heath *et al.*, 2009). La incidencia de infecciones por *P. boydii/S. apiospermum* es de 1:1000 en receptores de trasplantes. Las infecciones causadas por *P. boydii/S. apiospermum* son más frecuentes en receptores de transplante de órgano sólido y de médula ósea y en los inmunodeficientes por causas distintas a las hemopatías malignas. En los pacientes con hemopatías malignas se produce una mayor incidencia de las infecciones producidas por *S. prolificans* (Cortez *et al.*, 2008; Husain *et al.*, 2005, Guarro y Pastor, 2009).

Estas infecciones son difíciles de tratar y suelen ser fatales. Actualmente el tratamiento de las escedosporiosis debe contemplar varios puntos críticos. En primer lugar se ha de llevar a cabo si es posible la resolución de los factores predisponentes, fundamentalmente la neutropenia. La cirugía puede mejorar las expectativas terapéuticas, especialmente en el tratamiento de algunos

procesos como la sinusitis, queratitis, artritis, osteomielitis y abscesos cerebrales. Por otro lado, también es importante la terapia con antifúngicos, aunque actualmente se desconoce cuál es el tratamiento de elección para este tipo de infecciones. En general, las especies del género *Scedosporium* presentan una elevada resistencia *in vitro* a muchos de los antifúngicos convencionales (Carrillo-Muñoz y Guarro, 2001; Gilgado *et al.*, 2006). Los nuevos azoles, voriconazol y posaconazol, son los antifúngicos que han mostrado los resultados más esperanzadores tanto en trabajos *in vitro* (Gilgado *et al.*, 2006; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2007) como en algunos casos clínicos (Apostolova *et al.*, 2005; Porte *et al.* 2006; Mellinghoff *et al.* 2002). Aún así, debido a la ineficacia mostrada por la monoterapia en muchos casos, especialmente frente a las especies más resistentes como *S. prolificans*, varios estudios han señalado la combinación de varios antifúngicos como una posible alternativa terapéutica. (Meleatidis *et al.*, 2003; Polack, 1999).

1.2.4.3. Paecilomicosis

Se conoce como paecilomicosis a la infección causada por las especies del género *Paecilomyces* spp. Este género que incluye especies con características muy diversas, es un hongo de distribución mundial, aislado en suelo y aire, y es un potencial contaminante de la comida, del grano y del papel. *Paecilomyces* spp. es un hongo patógeno oportunista emergente de interés clínico debido a su patogenicidad y a su resistencia a ciertos antifúngicos y, aunque con escasa incidencia, puede ser responsable de graves infecciones en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes. *P. lilacinus* y *P. variotii* son las dos especies del género más frecuentemente involucradas en este tipo de infecciones, siendo la primera la más importante en clínica. Otras especies como *P. marquandii* y *P. javanicus* han sido ocasionalmente descritas como agentes causantes de infección en humanos. Este hongo es potencialmente resistente a los métodos de esterilización, contaminando con frecuencia cremas y lociones de uso clínico y colonizando material clínico como catéteres, implantes, etc, por lo que se le ha relacionado con diversos brotes hospitalarios y con la utilización de lociones y soluciones

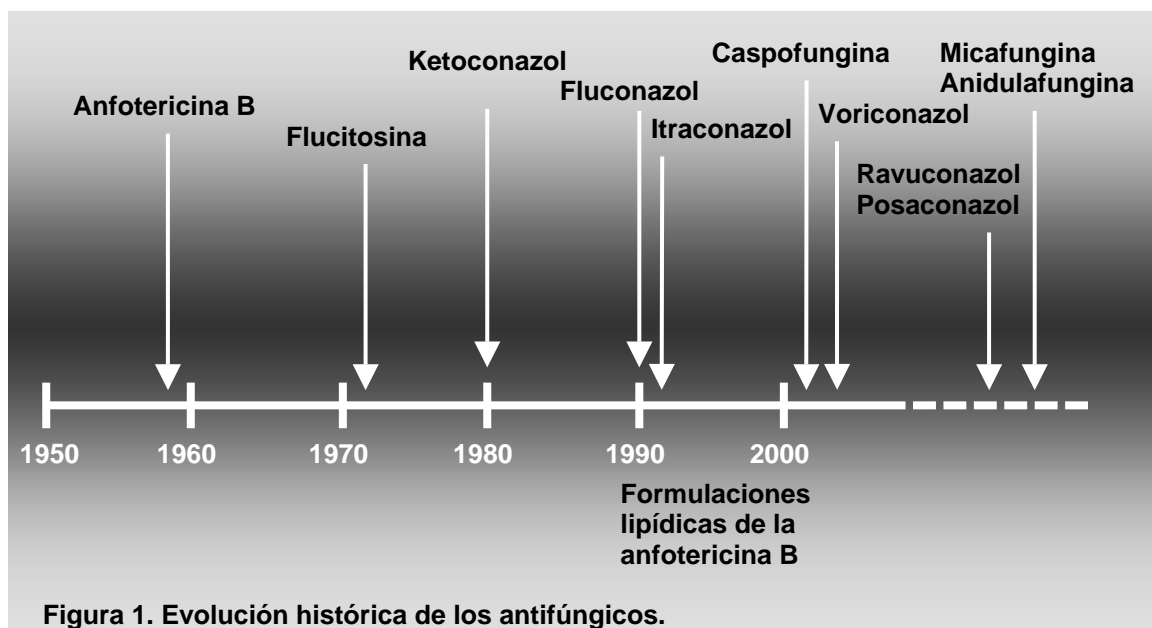
contaminadas por estos mismos. Las infecciones causadas por *P. lilacinus* y *P. variotii* tienen puntos en común ya que ambas se relacionan con la implantación de prótesis tales como válvulas cardíacas, lentes intraoculares, catéteres y prótesis mamarias, produciendo normalmente infecciones localizadas, excepto en los pacientes con neutropenia profunda en los que suele producir infecciones diseminadas.

Debido a las diferencias de sensibilidad a los antifúngicos entre las diferentes especies del género *Paecilomyces* (*P. variotii* es sensible a los polienos mientras que *P. lilacinus* muestra una resistencia intrínseca a estos antifúngicos) es importante la correcta identificación de éstas para poder instaurar un tratamiento antifúngico adecuado (Summerbell, 2003). El tratamiento óptimo para la paecilomicosis aún no ha sido establecido. La anfotericina B convencional, el fluconazol, el itraconazol, la terbinafina, el miconazol y la flucitosina, solos y en combinación, y la cirugía han sido ampliamente utilizadas como opciones terapéuticas hasta la fecha (Pastor y Guarro, 2006). Los nuevos azoles, voriconazol y posaconazol, han mostrado buena actividad *in vitro* frente a estos hongos y parecen ser efectivos para el tratamiento de esta infección, aunque aún existen pocos datos clínicos (Pastor y Guarro, 2006; Van Schooneveld *et al.*, 2008).

1.3. Antifúngicos

El término antibiótico antifúngico o antimicótico incluye aquellas sustancias que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo o alterando su viabilidad y produciendo las mínimas alteraciones posibles en las células del huésped (Kerridge y Vanden-Bossche, 1990). La similitud de los blancos de acción de algunos antifúngicos con estructuras o rutas metabólicas de las células humanas determina el escaso número de estos fármacos en comparación con los antibióticos antibacterianos existentes, así como la mayor posibilidad de aparición de efectos secundarios y/o tóxicos, por lo que su margen terapéutico es estrecho, limitando su uso (Graybill *et al.*, 2003; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). Las primeras sustancias utilizadas en el tratamiento de las infecciones fúngicas fueron metales

pesados como el yoduro potásico, metaloides, derivados del azufre y las sulfonamidas. Posteriormente, el tratamiento de las micosis ha sufrido una evolución, desde los primeros antifúngicos considerados de “primera generación”, derivados de productos o de la actividad metabólica de determinados microorganismos, hasta los de “segunda generación”, en los que predomina la obtención por síntesis química (Figura 1). En los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas que han ayudado a mejorar la supervivencia de las infecciones fúngicas invasoras. La aparición de nuevas moléculas antifúngicas y la existencia de diferentes alternativas terapéuticas ha modificado el mundo de la infección fúngica, permitiendo tratar individualmente cada caso lo que ha añadido valor a los estudios de sensibilidad antifúngica y a la correcta identificación de la especie causante. Por tanto, en la clínica es imprescindible el conocimiento de las propiedades, del mecanismo de acción y del perfil de sensibilidad de los diferentes antifúngicos.



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

1.3.1. Polienos

Son moléculas macrólidas con cadenas insaturadas. Existen varias de estas sustancias, de las cuales, la anfotericina B es la más utilizada. A pesar de ser el compuesto de referencia para el tratamiento de las micosis sistémicas, su nefrotoxicidad limita su dosificación y administración (Hsiesh *et al.*, 1998). El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en su unión a los esteroides de la membrana. Tienen mayor afinidad por el ergosterol de las membranas de los hongos que por el colesterol de las células de mamíferos. Esta unión genera la formación de poros por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas carbonadas.

La **anfotericina B** es producida por el actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Fue descubierta en el valle del Río Orinoco, Venezuela. En 1957 se licenció como fármaco de uso clínico, convirtiéndose entonces en el primer y casi único tratamiento eficaz de las infecciones fúngicas, pero su toxicidad llevó a la necesidad de desarrollar alternativas capaces de aumentar la dosis de fármaco disminuyendo los efectos adversos. Esto se consiguió gracias a las formulaciones lipídicas de los polienos. Actualmente existen; AmBisome, **anfotericina B liposomal**; Abelcet, **anfotericina B en complejo lipídico**; Amphocil o Amphotec, **anfotericina B en dispersión coloidal**, y Nyotran, **nistatina liposomal**. La formulación liposomal (AmBisome) se ha consolidado como la mejor alternativa a la formulación convencional aunque es la más costosa de todas (Gavaldà y Ruiz, 2003; Pachón *et al.*, 2006; Rüping *et al.*, 2008). El perfil de actividad de estos compuestos es muy amplio, pocas especies muestran resistencia intrínseca y pocas desarrollan resistencia secundaria. La presentación convencional está indicada frente a infección fúngica progresiva causada por especies sensibles de *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Conidiobolus*, *Basidiobolus*, y *Sporothrix*, en mucormicosis producidas por agentes sensibles tales como *Absidia*, *Mucor* y *Rhizopus*, y en pacientes inmunocomprometidos con fiebre persistente cuando el tratamiento con antibióticos antibacterianos fracasa. La formulación liposomal y las otras formulaciones lipídicas están indicadas frente a candidiasis invasiva grave, micosis sistémicas graves (aspergilosis,

criptococosis, fusariosis, zigomicosis, blastomicosis y coccidioidomicosis) en pacientes que no responden al tratamiento con anfotericina B convencional o con otros agentes antifúngicos sistémicos, o que presentan insuficiencia renal u otras contraindicaciones a su uso, o nefrotoxicidad causada por anfotericina B convencional. También están indicadas contra la leishmaniasis visceral y su profilaxis. Aun así, 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).

La **Nistatina** es únicamente de uso tópico debido a sus graves efectos tóxicos.

1.3.2. Azoles

Los azoles constituyeron uno de los principales avances terapéuticos de la micología como alternativa a la anfotericina B convencional. Su estructura química se basa en anillos heteropentacíclicos con dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno unidos por átomos de hidrógeno a otros anillos aromáticos. Los azoles son antifúngicos que actúan inhibiendo la actividad del citocromo P450 del hongo, también denominado lanosterol 14-alfa-desmetilasa o CYP51. Esta enzima cataliza la eliminación del grupo 14-metileno (C-32) de lanosterol. Este sistema enzimático está presente en un gran número de seres vivos y su función es la síntesis de ergosterol (hongos) o colesterol (mamíferos). Los azoles se unen al grupo hemo del citocromo y bloquean la desmetilación de lanosterol a ergosterol, compuesto esencial de la membrana celular de los hongos que regula su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las enzimas unidas a ella. Como consecuencia de la inhibición de ésta síntesis se altera la membrana del hongo y se acumulan algunos compuestos no desmetilados, que inhiben el crecimiento de los hongos. La acción fungicida requiere concentraciones muy elevadas, por ello si se administran dosis fungistáticas se deben administrar durante un tiempo adecuado para evitar recaídas.

En la actualidad el uso de los imidazoles se limita al tratamiento de las micosis superficiales debido a que su toxicidad es superior a la de los triazoles, siendo

los más utilizados el **ketoconazol**, el **clotrimazol**, el **miconazol** y el **sertaconazol**. Los triazoles son moléculas con un amplio espectro de acción, siendo de menor toxicidad y más estables metabólicamente que los imidazoles. Están indicadas en el tratamiento de las micosis tanto superficiales como sistémicas. Los representantes principales de este grupo son el **fluconazol**, el **itraconazol**, el **voriconazol**, el **ravuconazol** y el **posaconazol**.

El **fluconazol** se usa desde finales de los años 80. Es soluble en agua y puede administrarse por vía oral y parenteral. Presenta pocos problemas de toxicidad. Aunque genera resistencias en caso de tratamientos prolongados, sigue siendo el tratamiento de primera elección frente a las infecciones por *Candida*, también esta indicado en profilaxis en pacientes con enfermedades hematológicas, así como tratamiento de mantenimiento o refuerzo en el caso de la cryptococosis (Gavaldà y Ruiz, 2003; Gómez-lópez *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2008; Böhme *et al.*, 2009). Es inactivo frente a los hongos filamentosos. Su dosis de administración en clínica es de 200-800 mg/día, vía oral o intravenosa (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

El **itraconazol** tiene un espectro de acción más amplio. Está indicado en Pitiriasis versicolor, dermatofitosis, queratitis fúngica, onicomycosis por dermatofitos y *Candidas*, candidiasis oral, esofágica, vulvovaginal y sistémica, aspergillosis y criptococosis sistémica, histoplasmosis, esporotricosis, paracoccidiomycosis, blastomycosis y cromomycosis. Las cepas de *Candida* resistentes al fluconazol suelen desarrollar resistencia cruzada al itraconazol. Este antifúngico se administra en cápsulas, solución oral e intravenosa. Hasta la aparición de la solución oral este fármaco se administraba por vía oral en cápsulas, cuya absorción era muy limitada, lo que influyó en su poco uso para el tratamiento de micosis sistémicas. El itraconazol se utiliza a dosis de 200 mg/día, aunque pueden llegar a administrarse 600 mg/día (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009; Walsh *et al.*, 2008).

El **voriconazol** se desarrolló a partir del fluconazol con el objetivo de aumentar su espectro de acción. Puede atravesar la barrera hematoencefálica. Esta indicado en aspergilosis invasiva, candidemia en no neutropénicos, infecciones invasivas graves por *Candida* (incluyendo *C. krusei*) resistentes a fluconazol, infecciones graves por *Scedosporium* spp. y *Fusarium* spp. Aunque ha mostrado

eficacia en el tratamiento de infecciones causadas por *Candida* spp. no se usa como tratamiento de primera línea en las infecciones profundas por *Candida*, ya que no ha mostrado ventajas sobre el fluconazol (Kullberg *et al.*, 2005). Los mucorales presentan resistencia intrínseca a este fármaco. Además varios trabajos han advertido del aumento en la incidencia de mucormicosis relacionado con el uso del voriconazol (Walsh *et al.*, 2002; Roden *et al.*, 2005). Existe una presentación oral y otra parenteral, y se administra a dosis de 200-400 mg/12 h (4-6 mg/kg) (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

El **posaconazol** es el último triazol comercializado hasta la fecha. Su espectro de actividad es muy amplio, el mas amplio de todos los azoles e incluye aspergilosis invasiva, fusariosis, cromoblastomicosis y micetoma, coccidioidomicosis y levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*, mostrando una buena actividad frente a cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2005). También es activo frente a los Mucorales (Roden *et al.*, 2005; Rogers, 2008). Este antifúngico se encuentra disponible como formulación oral actualmente y no existe presentación parenteral. Su absorción gástrica es variable y mejora si se administra junto a una comida rica en grasas. En clínica se utiliza a dosis de 200 mg/8 h y ha demostrado una mayor eficacia en la prevención de la infección fúngica comparado con 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

El compuesto más representativo de este reducido grupo de antifúngicos es la **5-fluorocitosina** o **flucitosina**. Este compuesto es una pirimidina fluorada. 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 dematiaceos causantes de

cromoblastomycosis (Mauceri *et al.*, 1974), su uso se encuentra limitado a la administración en combinación con anfotericina B o itraconazol en la meningitis por *Cryptococcus* (Dismukes *et al.*, 1987; Mayanja-Kizza *et al.*, 1998).

1.3.4. Equinocandinas

Las equinocandinas son polipéptidos cíclicos que bloquean la síntesis de glucano, que es el polímero que constituye el principal componente de la pared fúngica manteniendo la morfología de la célula y protegiéndola de los cambios osmóticos ambientales. El mecanismo de acción de las equinocandinas es la inhibición de la enzima (1,3)- β -D-glucan sintasa, que es la encargada de formar los polímeros de glucano de la pared fúngica. Esta enzima no se encuentra en las células animales y por este motivo constituye una buena diana.

Esta familia de antifúngicos se comenzó a desarrollar en 1974, pero hasta el 2001 no se aprobó para uso humano la primera equinocandina, la caspofungina. Actualmente se dispone de 3 equinocandinas con indicaciones clínicas: **caspofungina**, **micafungina** y **anidulafungina**. La principal innovación de estos antifúngicos es su mecanismo de acción ya que actúan sobre la pared fúngica. Debido a que actúan sobre una diana diferente al resto de antifúngicos comercializados no existe resistencia cruzada entre ellos.

Las equinocandinas no se absorben por vía oral, por lo que sólo existe una formulación parenteral. Todas ellas presentan buena actividad frente a *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis carinii* 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 1,6- β -glucano en su pared como *Cryptococcus* spp., otros Basidiomycetos y los Mucorales. También son inactivas frente a *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp (Ruíz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

1.3.5. Alilaminas

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

reducción del contenido del ergosterol de la membrana celular y a la acumulación de escualeno en el espacio plasmático. El representante más importante de esta familia es la **terbinafina**. Debido a la naturaleza altamente lipofílica de este antifúngico, se distribuye principalmente en tejidos tales como la piel, uñas y tejido adiposo (Elewski, 1998) con lo cual su uso terapéutico se dirige principalmente al tratamiento de las dermatomicosis.

1.4. Nuevas estrategias terapéuticas

A pesar de la aparición de nuevos antifúngicos y nuevos métodos diagnósticos la mortalidad de las infecciones fúngicas invasoras continua siendo muy elevada. Por ello es necesario seguir investigando nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de las infecciones fúngicas como la terapia antifúngica combinada y el uso de inmunomoduladores.

1.4.1. Terapia antifúngica combinada

Actualmente existen nuevos fármacos y nuevos métodos de diagnóstico temprano en la terapia antifúngica, sin embargo, la mortalidad de las infecciones fúngicas invasoras continúa siendo muy elevada. Por ello, son objeto de estudio nuevas estrategias terapéuticas, entre las cuales se encuentra la terapia combinada.

La administración combinada de antifúngicos como estrategia terapéutica 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 reducir las dosis administradas (Enoch *et al.*, 2006; Ruíz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). Conseguir un efecto sinérgico con la asociación de antifúngicos es una de las justificaciones teóricas más importantes para emplear la terapia combinada.

Los fármacos pueden interaccionar entre sí de forma sinérgica, indiferente o antagónica. Se podría definir 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 tenga 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 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 solos y administrados conjuntamente y así aproximarnos a lo que sucederá en la clínica.

Varias combinaciones de dos antifúngicos han sido utilizadas con éxito en clínica como por ejemplo; anfotericina B más fluconazol en enfermos con candidiasis, azoles más 5-fluorocitosina en criptococosis, terbinafina más voriconazol asociada a cirugía en infecciones profundas causadas por *S. prolificans*, caspofungina más voriconazol en aspergilosis invasiva, etc. (Safdar, 2007; Enoch *et al.*, 2006; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). Aunque las combinaciones de mas de dos fármacos han sido poco estudiadas en las micosis sistémicas, las combinaciones de anfotericina B, caspofungina y voriconazol (O' Shaughnessy *et al.*, 2006) o flucitosina, anfotericina B y caspofungina (Dannaoui *et al.*, 2004) mostraron sinergia *in vitro* para cepas de *Aspergillus* spp.

1.4.2. Inmunomoduladores

La respuesta inmunitaria innata o inespecífica representa el mecanismo inicial de defensa contra los agentes patógenos. Neutrófilos y monocitos-macrófagos son el componente celular más importante de este sistema. La capacidad de aumentar la actividad de la respuesta inmunitaria ha sido objeto de estudio durante las últimas décadas, con el descubrimiento y desarrollo de las citocinas. Numerosos autores coinciden en la necesidad de revertir el déficit inmunitario de los pacientes inmunodeprimidos con infecciones por hongos oportunistas, mediante la aplicación de terapias inmunomoduladoras con

citocinas. La eficacia de la inmunoterapia con las citocinas en combinación con los antifúngicos en el tratamiento de las micosis diseminadas ha sido objeto de estudio en los últimos años (Hübel *et al.*, 2002; Chayakulkeeree *et al.*, 2006; Safdar, 2007). Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular producidas durante las respuestas inmunes natural y específica (Safdar, 2007). Estos mediadores solubles controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos (Hübel *et al.*, 2002; Safdar, 2007). La terapia con inmunomoduladores incluye la administración de factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón gamma o interleucinas tales como la IL-12. Estudios experimentales con modelos animales han demostrado la utilidad de las citocinas como coadyuvantes en el tratamiento de micosis diseminadas (Hübel *et al.*, 2002; Clemons *et al.*, 2001; Deepe y Gibbons, 2000). Desafortunadamente, los buenos resultados obtenidos en los estudios preclínicos con modelos animales no siempre se han reproducido en la práctica clínica (Hübel *et al.*, 2002).

1.5. Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos

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, y su diseño sigue las mismas directrices (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 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. Así se puede evaluar la sensibilidad *in vitro* de un hongo a uno o más antifúngicos, correlacionar estos resultados con la actividad de los fármacos en estudios *in vivo* y predecir el éxito terapéutico. Es útil también para detectar el desarrollo 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 Rinadi, 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. 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 levaduras hasta el año 1997 (CLSI M27-A) y en el caso de hongos filamentosos hasta el año 2002 (CLSI M38-A).

1.5.1. Métodos *in vitro*

Hongos filamentosos

El año 1982 el NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) actualmente CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 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 M27-A, el subcomité del CLSI formó un grupo para realizar estudios, 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 constitúan el inóculo en el caso de los hongos filamentosos (Espinel 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 % 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 por 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.

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 y Kerkering (Espinel y Kerkering, 1991), y por otro lado, 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 *Aspergillus 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 excepción del itraconazol.

En estudios posteriores se estudió 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* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallescheria boydii*, y la forma filamentosa del hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*), no incluyendo a los hongos dermatofitos, *Chaetomium* spp., *Paecilomyces* spp., ni a *Scedosporium* spp., 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 controles de calidad de los aislados fúngicos y las guías para testar las equinocandinas, ya que

anteriormente no habían sido descritas. Además también se incluyen métodos para ensayar dermatofitos.

1.5.2. 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 y/o la reducción de la carga fúngica detectable en los órganos, así como con el estudio histopatológico (Graybill *et al.*, 1986). 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).

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 sirven 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.

Existen pocos estudios que correlacionen los resultados obtenidos *in vitro* con la respuesta terapéutica *in vivo*. Se acepta, sin embargo, que el hecho de que una cepa sea sensible *in vitro* no es suficiente para predecir el éxito terapéutico, pero un valor elevado de concentración mínima inhibitoria de un determinado antifúngico puede predecir con mayor exactitud un posible fallo terapéutico. Por tanto aunque es difícil poder predecir con acierto el resultado en clínica a partir de los estudios experimentales, éstos pueden guiar al clínico hacia el tratamiento más efectivo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Interés y objetivos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

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 en clínica. A pesar de la terapia antifúngica y el tratamiento quirúrgico agresivo, las infecciones fúngicas continúan causando una alta mortalidad y morbilidad, especialmente en pacientes inmunodeficientes. Aunque *Aspergillus* es el género que causa la mayoría de las infecciones por hongos filamentosos, se ha observado un incremento en la incidencia de otros géneros tales como *Rhizopus*, *Scedosporium* y *Paecilomyces* entre otros. Las terapias utilizadas actualmente para el tratamiento de estas infecciones fúngicas están lejos de ser las óptimas, siendo necesario, por tanto, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones. Por ello, el objetivo principal de esta tesis ha sido **contribuir al desarrollo experimental de nuevos tratamientos frente a infecciones invasoras causadas por hongos filamentosos oportunistas emergentes.**

El tratamiento empírico en la mayoría de las infecciones causadas por este grupo de hongos emergentes, antes mencionado, se basa en el uso de la anfotericina B, a pesar de que su toxicidad ha limitado su administración en tratamientos prolongados. En los últimos años, la aparición de nuevos antifúngicos y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas han abierto nuevas expectativas para el tratamiento más seguro y eficaz de las infecciones fúngicas. Dentro de este contexto, en esta tesis se han ensayado *in vitro* e *in vivo* la actividad de algunos de estos nuevos antifúngicos tales como el voriconazol, el posaconazol o la micafungina y de nuevas formulaciones de la anfotericina B, así como de combinaciones de los mismos y también con inmunomoduladores como las citocinas, frente a hongos filamentosos oportunistas emergentes.

Las infecciones causadas por especies del género *Rhizopus*, principales agentes causales de las zigomicosis invasoras, consideradas como las micosis por hongos filamentosos más frecuentes después de la aspergilosis, afectan

principalmente a pacientes inmunodeficientes, caracterizándose por su gravedad y difícil tratamiento.

En el tratamiento de las zigomicosis, son fundamentales cuatro aspectos: rapidez en el diagnóstico, eliminación si es posible de los factores predisponentes, resección quirúrgica y tratamiento antifúngico. La neutropenia profunda es un factor de riesgo que está presente en la mayoría de los pacientes que desarrollan zigomicosis, y por tanto, para que el tratamiento tenga éxito es fundamental revertir o evitar este factor de riesgo. Las citocinas son un grupo de proteínas que tienen un papel mediador en la respuesta inmunológica e inflamatoria, por lo que teóricamente podrían utilizarse como coadyuvantes para mejorar la efectividad del tratamiento antifúngico. Tradicionalmente, la anfotericina B y recientemente su formulación liposomal han sido considerados los antifúngicos de elección para estas micosis invasivas. En general los zigomicetos muestran resistencia intrínseca a los azoles, con la excepción del posaconazol, un nuevo azol de amplio espectro, que ha mostrado buena actividad *in vitro* frente a la mayoría de estos hongos. La toxicidad de la anfotericina B y el hecho de que la mortalidad asociada a las zigomicosis continúe siendo elevada, evidencia la necesidad de nuevas terapias. Por todo ello, un objetivo de la presente tesis ha sido **evaluar experimentalmente la eficacia de nuevos tratamientos frente a las especies de *Rhizopus* de mayor relevancia en clínica.**

Los aspectos concretos que con este objetivo se pretenden alcanzar son:

- ❖ Determinar la actividad *in vitro* de la anfotericina B y del posaconazol frente a *R. oryzae* y *R. microsporus*, así como de la combinación de ambos antifúngicos frente a *R. oryzae*.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos utilizando los métodos de microdilución, de disco difusión y la determinación de la concentración mínima fungicida en la determinación de la sensibilidad *in vitro* de *R. oryzae* frente al posaconazol.

- ❖ Desarrollar un modelo de infección diseminada por *R. oryzae* en el ratón neutropénico para utilizarlo en la evaluación de la eficacia del tratamiento con la anfotericina B, con el posaconazol, y con la combinación de ambos antifúngicos.
- ❖ Evaluar la eficacia de dos citocinas, el interferón gamma y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, y de la combinación de cada una de ellas con la anfotericina B liposomal, en el tratamiento de la zigomicosis sistémica en el ratón neutropénico causada por *R. oryzae*.
- ❖ Evaluar el valor predictivo de los resultados *in vitro* obtenidos con el posaconazol, comparando los valores de CMI obtenidos con el grado de la eficacia *in vivo* de dicho antifúngico en el tratamiento de infecciones en ratón con diferentes cepas de *R. oryzae* que hayan mostrado diferentes grados de sensibilidad a dicho antifúngico.
- ❖ Desarrollar un modelo experimental de infección diseminada por *R. microsporus* en el ratón y evaluar en él la eficacia de la anfotericina B liposomal y del posaconazol.

Las escedosporiosis son infecciones producidas por hongos del género anamórfico *Scedosporium*. Dichas infecciones pueden presentar una gran variedad de cuadros clínicos, siendo las más graves las infecciones diseminadas que afectan a pacientes con inmunodepresión severa y que suelen estar asociadas a una elevada tasa de mortalidad. Las especies de *Scedosporium* suelen presentar una baja sensibilidad a la anfotericina B y algunas de ellas como *S. prolificans* son altamente resistentes a todos los antifúngicos conocidos. Ello ha motivado que otro objetivo de esta tesis haya sido **evaluar experimentalmente la eficacia de nuevas terapias frente a las infecciones causadas por especies de *Scedosporium* de interés clínico.**

Los aspectos particulares que se pretenden alcanzar en este objetivo son:

- ❖ Determinar la actividad *in vitro* de representantes de las clases de antifungicos más conocidos, polienos, azoles y equinocandinas como son la anfotericina B, el voriconazol y la micafungina, respectivamente, así como de combinaciones de ellos frente a *S. prolificans*.
- ❖ Determinar la actividad *in vitro* de la anfotericina B, y de los dos triazoles recientemente comercializados, el voriconazol y el posaconazol frente a las tres especies del complejo *Pseudallescheria boydii* de mayor interés clínico: *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. boydii*.
- ❖ Desarrollar un modelo de infección diseminada por *S. prolificans* en el ratón neutropénico para evaluar *in vivo* la eficacia de la anfotericina B, el voriconazol y la micafungina, así como de la terapia combinada utilizando dos o tres de estos antifúngicos.
- ❖ Desarrollar un modelo de infección diseminada para cada una de las especies *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. boydii* en el ratón neutropénico para poder evaluar en él la eficacia de la anfotericina B, el voriconazol y el posaconazol.

La principal especie responsable de las paecilomicosis invasoras es *P. lilacinus*. En general, las manifestaciones clínicas de las paecilomicosis corresponden a oculomicosis, infecciones cutáneas y subcutáneas. Sin embargo, en los pacientes con inmunodepresión severa, este hongo puede provocar una afectación sistémica, debido a su capacidad para esporular en los tejidos infectados, pasar a sangre y diseminarse por todo el organismo. *P. lilacinus* muestra una alta resistencia *in vitro* a los antifúngicos convencionales. El tratamiento óptimo de las infecciones invasoras por *P. lilacinus* aún no ha sido establecido, y además no se han desarrollado modelos experimentales de infección diseminada que puedan ser útiles para evaluar las terapias más adecuadas. Es por ello que otro objetivo de la presente tesis ha sido **desarrollar un modelo animal estandarizado de infección diseminada por *P. lilacinus* y evaluar en él la eficacia de nuevas estrategias de tratamiento.**

Con este objetivo se pretende:

- ❖ Determinar la actividad *in vitro* de la anfotericina B, el voriconazol y el posaconazol frente a cepas de origen clínico y ambiental de *P. lilacinus*.

- ❖ Desarrollar un modelo de infección diseminada por *P. lilacinus* en el ratón neutropénico para poder evaluar en él la eficacia de los antifúngicos de uso clínico tradicional como la anfotericina B y los de reciente aparición como el posaconazol y el voriconazol.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Materiales y métodos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

3. Materiales y métodos

3.1. Estudios *in vitro*

3.1.1. Cepas

Para efectuar las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, se ensayaron un total de 76 cepas correspondientes a 4 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

Especie (nº total de cepas ensayadas)	Procedencia	Nº de cepas
<i>P. lilacinus</i> (2)	FMR	2
<i>R. oryzae</i> (52)	FMR	1
	IHEM	1
	UTHSC	50
<i>R. microsporus</i> (15)	FMR	1
	CBS	1
	IHEM	8
	UTHSC	5
<i>S. prolificans</i> (1)	FMR	1
<i>S. apiospermum</i> (2)	IHEM	1
	CBS	1
<i>S. aurantiacum</i> (2)	FMR	1
	IHEM	1
<i>P. boydii</i> (2)	FMR	2

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

IHEM, Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute, Bruselas, Bélgica

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda

UTHSC, University of Texas Health Science Center

3.1.2. Conservación de las cepas

Las cepas se conservaron mediante liofilización, a temperatura ambiente en tubos de agar inclinados cubiertos de vaselina o como suspensiones de conidios en agua destilada estéril.

Para la obtención del inóculo, las cepas se subcultivaron en placas de PDA (agar patata y dextrosa) y se incubaron a 30°C durante 7-10 días hasta observar una correcta esporulación. En el caso de los Mucorales, *R. oryzae* y *R. microsporus*, las cepas se incubaron a 35°C durante 24-72 horas, debido a su rápida esporulación.

3.1.3. Agentes antifúngicos

Los antifúngicos ensayados en las pruebas *in vitro* fueron (Tabla 2):

- Anfotericina B (Squibb Industrial Farmacéutica S. A., Barcelona, España).
- Micafungina (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japón)
- Voriconazol (Pfizer Inc., Madrid, España)
- Posaconazol (Schering-Plough Research Institute, New Jersey, EE.UU.)

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

Antifúngicos	Forma de presentación. Conservación	Disolvente
Anfotericina B	Pureza: 99.8%. Sustancia en polvo. Temperatura ambiente	DMSO
Posaconazol	Pureza: 100%. Sustancia en polvo. Temperatura ambiente	DMSO
Voriconazol	Pureza: 100%. Sustancia en polvo. Temperatura ambiente	DMSO
Micafungina	Pureza: 100%. Sustancia en polvo. Temperatura ambiente	Agua destilada

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 “Clinical Laboratory Standard Intitute” (CLSI), documento M38-A en el año 2002, aunque, tras su aparición, se tuvieron en cuenta las modificaciones incluidas en el documento M38-A2 en el 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 y 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) o en H₂O destilada estéril en función de la sustancia.

Preparación del gradiente de concentraciones

A partir de la solución madre (1600 µg/ml en el ejemplo de la Figura 2) se preparó un banco de diluciones dobles progresivas siguiendo el esquema de la Figura 2. 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).

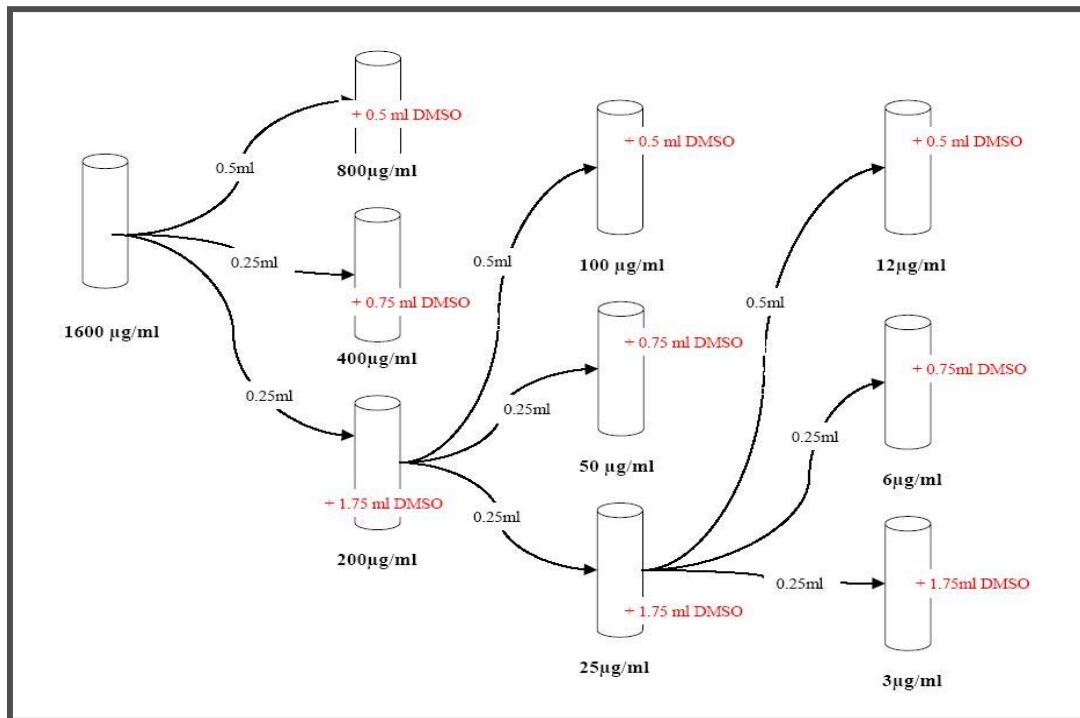


Figura 2. Esquema del banco de diluciones utilizado para realizar los ensayos *in vitro*.

Los rangos de concentraciones de antifúngico ensayados fueron: de 0.03 a 16 µg/ml en el caso de la anfotericina B, el voriconazol, y el posaconazol (Figura 3). En el caso de la micafungina el rango de concentraciones fue de 0.25 a 128 µg/ml.

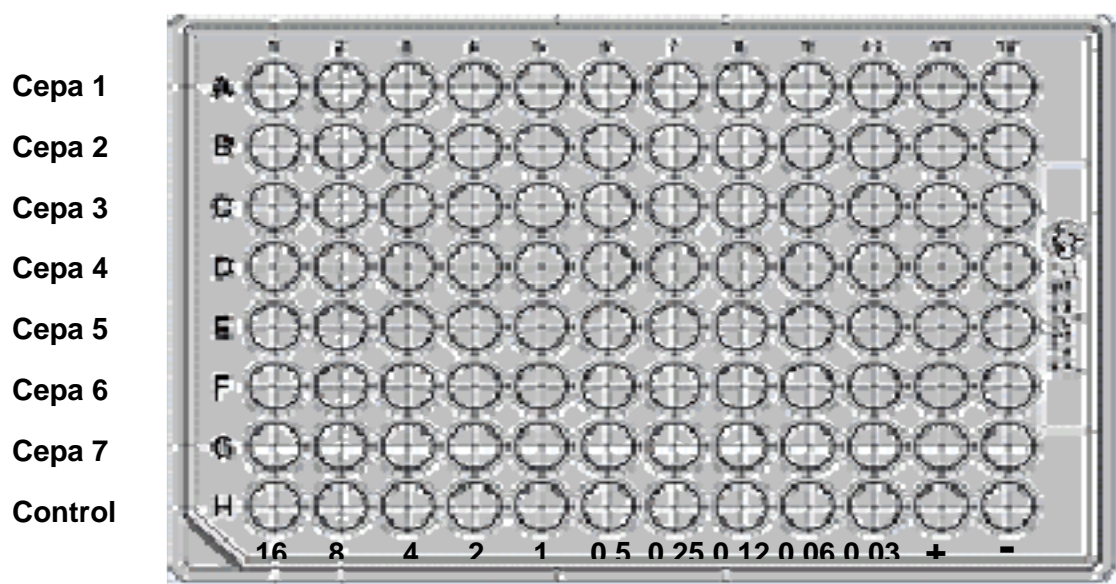


Figura 3. Esquema ejemplo de la distribución de las diferentes concentraciones estudiadas para el rango de 0.03 a 16 µg/ml y de las cepas a estudiar en la microplaca.

Una vez preparadas las microplacas se sellaron para evitar la evaporación del líquido y se guardaron 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 $100\ \mu\text{l}$ 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. En el caso del género *Rhizopus* las microplacas fueron examinadas entre las 21-26 horas mientras que para el género *Scedosporium* las microplacas fueron examinadas entre las 70-74 horas.

3.1.4.2. Preparación de las microplacas de combinaciones de antifúngicos

3.1.4.2.1 Combinaciones dobles

Se preparó un gradiente de concentraciones para cada uno de los antifúngicos utilizados siguiendo el método descrito por el CLSI documento M37-A2. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo cóncavo. El volumen final fue de $100\ \mu\text{l}$ en todos los pocillos de las microplacas debido a que se dispensaron $50\ \mu\text{l}$ de cada antifúngico en la zona B de la microplaca (Figura 4).

Se estudiaron un total de tres combinaciones de antifúngicos, que se dispusieron en filas o en columnas en las microplacas para acabar formando un gradiente doble de concentraciones en forma de tablero de ajedrez (Jonson *et al.*, 2001; Dannaoui *et al.*, 2004).

- Micafungina. Se utilizó un gradiente de concentraciones de 0.125 a $128\ \mu\text{g/ml}$ dispensándose $50\ \mu\text{l}$ en los pocillos de las columnas 2-11 de la microplaca para todas las combinaciones.
- Voriconazol. Se utilizó un gradiente de concentraciones de 1 a $64\ \mu\text{g/ml}$ dispensándose $50\ \mu\text{l}$ en los pocillos de las filas de la A a la G.
- Anfotericina B. Se utilizó un gradiente de concentraciones de 1 a $64\ \mu\text{g/ml}$ dispensándose $50\ \mu\text{l}$ en los pocillos de las filas de la A a la G.

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

En la fila H (columnas de la 2-11) de cada microplaca, se dispensó 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)

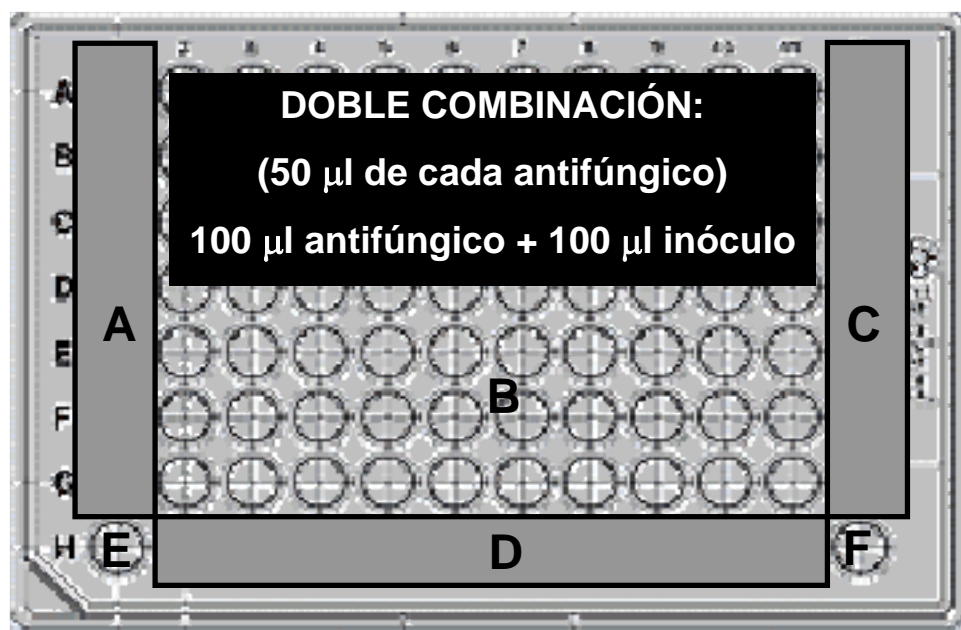


Figura 4. Esquema de la distribución de las diferentes concentraciones de antifúngicos en una microplaca de doble combinación. Se definen 6 zonas: A) zona donde se encuentra un solo antifúngico que se ha dispensado en las filas en un rango de concentración determinado, B) zona de combinaciones de los 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.

3.1.4.2.2 Combinaciones triples

La triple combinación anfotericina B-micafungina-voriconazol se llevó a cabo mediante la misma técnica usada en las combinaciones dobles en tres dimensiones. La micafungina y la anfotericina B se dispensaron de la misma forma que en las combinaciones dobles anteriormente descrita. El voriconazol fue añadido a una sola concentración por placa. Cuatro placas fueron utilizadas

para estudiar el rango escogido para el voriconazol (2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$). El volumen final fue de 150 μl en los pocillos de la zona B de las microplacas debido a que se dispensaron 50 μl de cada uno de los tres antifúngicos (Figura 5) (Dannaoui *et al.*, 2004; O'Shaughnessy *et al.*, 2006).

En la columna 1 (filas de la A-G) de las cuatro microplacas, se dispensó 150 μl de anfotericina B en un gradiente de concentraciones de 1 a 64 $\mu\text{g/ml}$.

En la fila H (columnas de la 2-11) de las cuatro microplacas, se dispensó 150 μl de micafungina en un gradiente de concentraciones de 0.25 a 128 $\mu\text{g/ml}$.

En el pocillo H12 se dispensó 150 μl de una única concentración de voriconazol para cada microplaca. Se dispensaron 4 microplacas y cada una tenía una concentración determinada de voriconazol, desde 2 a 16 $\mu\text{g/ml}$.

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

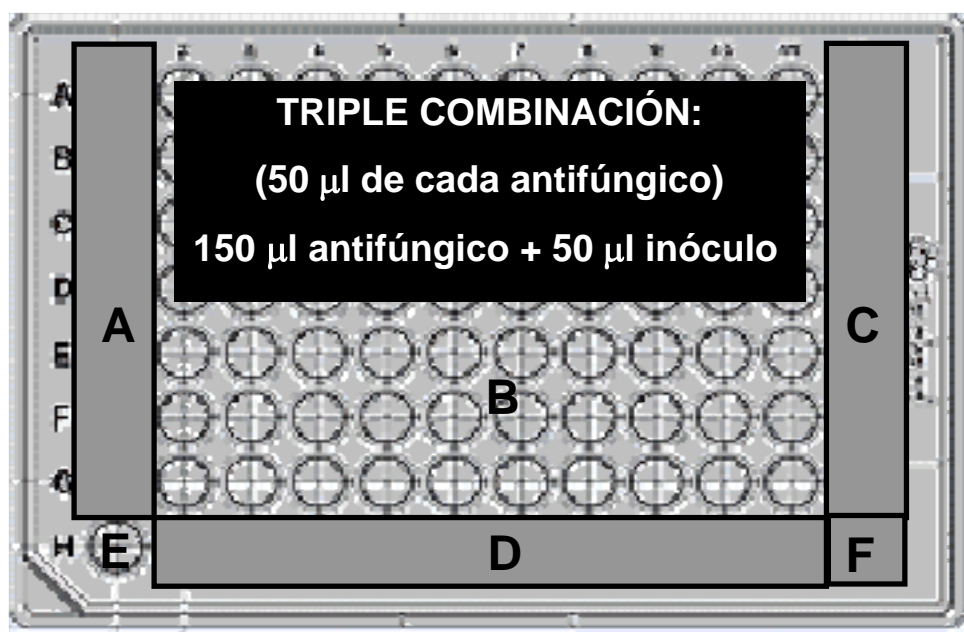


Figura 5. Esquema de la distribución de las diferentes concentraciones de antifúngicos en una placa de combinación triple de antifúngicos. Se definen 6 zonas: A) zona donde se encuentra únicamente el antifúngico que se ha dispensado en las filas en un rango de concentración determinado B) zona de combinaciones de los tres antifúngicos en forma de tablero de ajedrez, C) zona con solo RPMI utilizada como control positivo (control de crecimiento del hongo), D) zona donde se encuentra únicamente el antifúngico que se ha dispensado en las columnas en un rango determinado, E) pocillo donde se encuentra dispensado el tercer antifúngico en una concentración determinada 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 7-10 días hasta observar una correcta esporulación. En el caso de *R. oryzae* y *R. microsporus*, las cepas se incubaron a 35°C durante 24-72 horas. 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 0.4×10^4 - 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 dobles, y una dilución 1:25 en el caso de los inóculos utilizados en las combinaciones triples. En el caso de los estudios de un solo antifúngico y en los de combinaciones dobles se inocularon las microplacas con 100 μ l de su correspondiente dilución, mientras que en el caso de las combinaciones triples se inocularon las placas con 50 μ l de su correspondiente dilución.

Siguiendo las recomendaciones del documento M38-A2, en cada ensayo se incluyó la cepa control *Paecilomyces variotii* ATCC 36257

3.1.4.4. Definiciones

- **CMI (concentración mínima inhibitoria):**

Para todos los antifúngicos ensayados *in vitro*, anfotericina B, micafungina, voriconazol y posaconazol, 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.

- **FICI (índice de concentración inhibitoria fraccionada):**

Para el estudio de las interacciones entre antifúngicos, se utilizó el índice de concentración inhibitoria fraccionada (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.

En las combinaciones de dos antifungicos el FICI se calculó:

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

En las combinaciones de tres antifúngicos al FICI se calculó:

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

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>Paecilomyces lilacinus</i>	
FMR 5522	Líquido articular rodilla. Texas, USA
FMR 8252	Nematodo hembra. Amposta, España

<i>Rhizopus oryzae</i>	
FMR 6485	Biopsia seno maxilar. Rio de Janeiro. Brasil
FMR 8542	Lavado broncoalveolar. Bruselas, Bélgica
UTHSC 07-365	Clínica. Texas, USA
UTHSC 06-89	Clínica. Texas, USA
UTHSC 05-3032	Clínica. Texas, USA
UTHSC 03-511	Clínica. Texas, USA
UTHSC 04-3109	Clínica. Texas, USA
<i>Rhizopus microsporus</i>	
FMR 3542	Clínica. India
IHEM 4770	Ambiental. Bélgica
UTHSC 01-983	Clínica. Texas, USA
UTHSC 3466	Clínica. Texas, USA
<i>Scedosporium prolificans</i>	
FMR 6719	Clínica. Madrid, España
<i>Scedosporium apiospermum</i>	
IHEM 14464	Espuito. Giens, Francia
CBS 117407	Endoftalmitis. Sao Paulo, Brasil
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	
FMR 8630	Exudado úlcera. Santiago de Compostela, España
IHEM 15458	Espuito. Giens, Francia
<i>Pseudallescheria boydii</i>	
FMR 6694	Absceso cerebral. Barcelona, España
FMR 8627	Clínica. Madrid, España

3.2.2. Animales de experimentación

Para el desarrollo de los modelos experimentales de infección diseminada causada por hongos filamentosos oportunistas y de su tratamiento, se utilizaron ratones machos OF-1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) de 30 gramos de peso.

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.

Los animales se supervisaron diariamente atendiendo especialmente los siguientes aspectos:

- Apariencia del animal (pelo liso y brillante o piloerección).
- Peso (la pérdida acentuada de peso corporal es señal de sufrimiento)
- Postura (normal o encorvado).
- 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 por sufrimiento de los animales se realizó por inhalación de CO₂. Al final del estudio los animales supervivientes se sacrificaron por este procedimiento.

3.2.3. Inmunosupresión

Se utilizaron diferentes pautas de inmunosupresión:

- **Combinación de ciclofosfamida con 5-fluorouracilo.** Se utilizaron dos pautas de administración diferentes de esta combinación:
 - 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). Esta inmunosupresión se utilizó en la mayoría de los estudios, concretamente con las especies: *R. oryzae*, *R. microsporus*, *P. lilacinus*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *P. boydii*.

- 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 de la infección (día 0), más otra dosis de 5-fluorouracilo en dosis única de 75 mg/Kg por vía intravenosa cinco días después de la infección (día +5). Esta pauta de inmunodepresión sólo se empleó en los estudios de supervivencia con *P. lilacinus*.

- **Ciclofosfamida.** En los estudios realizados con *S. prolificans*, se utilizó la ciclofosfamida a dosis única de 200 mg/kg un día previo a la infección (día -1).

3.2.4. Infección

En la preparación de los inóculos para los estudios *in vivo* se seguía 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 verificaban siempre sembrando las diluciones adecuadas en placas de PDA. En todos los casos los inóculos se administraron intravenosamente a través de la vena lateral de la cola.

3.2.5. Fármacos

3.2.5.1. Antifúngicos

Los 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 o 10 días dependiendo del estudio. En la tabla 5 se muestran las vías de administración y las dosis empleadas para cada uno de los antifúngicos.

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

Antifúngicos	Procedencia	Disolvente
Anfotericina B	Fungizona [®] Squibb Industria farmacéutica, Madrid, España	solución glucosada al 5%
Anfotericina B liposomal	Ambisome [®] Gilead Sciences S. L. , Madrid, España	solución glucosada al 5%
Posaconazol	Noxafil [®] Schering-Plough, Madrid, España	Solución salina fisiológica
Voriconazol	Vfend [®] Pfizer, Ltd., Sandwich, Reino Unido	Solución salina fisiológica
Micafungina	Astellas Pharma Inc., Tokio, Japan	Solución salina fisiológica

3.2.5.2. Citocinas

En el tratamiento de la zigomicosis sistémica se emplearon 2 citocinas en combinación con la anfotericina B liposomal. En este estudio se probó la eficacia de la anfotericina B liposomal sola y en combinación con el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o con el interferón gamma (IFN- γ). Los tratamientos se iniciaron 24 horas después de la infección (día +1) y se administraron diariamente durante 7 días.

- **GM-CSF.** GenScript Corporation, USA.
- **IFN- γ .** GenScript Corporation, USA.

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, y en la administración de los tratamientos con anfotericina B, anfotericina B liposomal e interferón gamma. 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 micafungina y la ciclofosfamida en el ratón. 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 del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos. 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 y el posaconazol a través de una cánula esofágica.

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 y 3 mg/kg/día. Intraperitoneal 0.3 y 0.8 mg/kg/día. Intravenosa	0.1 ml
Anfotericina B liposomal	5 y 10 mg/kg/día. Intravenosa	0.1 ml
Posaconazol	5, 20, 25, 40, 50, 75 y 100 mg/kg/día. Oral 10, 20, 30 mg/kg/ dos veces al día. Oral	0.2 ml
Voriconazol	20, 40 y 60 mg/kg/día. Oral	0.2 ml
Micafungina	10 mg/kg/día. Intraperitoneal	0.1 ml
GM-CSF	5µg/kg/día. Subcutánea	0.1 ml
IFN-γ	100000 U. Intravenosa	0.1 ml
Ciclofosfamida	200 mg/kg. Intraperitoneal	0.3 ml
5-Fluorouracilo	150 mg/kg. Intravenosa	0.1 ml

3.2.7. Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado

Para cada estudio se estableció previamente el día adecuado de sacrificio. El método de sacrificio utilizado fue mediante inhalación de CO₂. Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los órganos diana utilizando material quirúrgico estéril. Se estudiaron riñón, bazo, hígado, pulmón y cerebro, escogiendo de éstos los órganos adecuados para cada estudio. Se dispensó solución salina estéril en tubos estériles 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 varillas de vidrio estériles. 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:

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

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

3.2.8. Análisis estadístico

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

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 cuales se han de considerar iguales.

Análisis de la Variancia. Este es un método paramétrico de análisis que se aplica a los estudios en que se realiza la cuantificación del hongo en diversos órganos. Permite comparar la media de recuperación para cada órgano entre los diferentes grupos del estudio. Como es un método paramétrico, los datos tiene 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 valido cuando los grupos de datos son muy pequeños, en este caso es 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. 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.

3.2.9. Bioensayo

En algunos de los estudios realizados se determinó el nivel de antifúngico en suero mediante bioensayo. Para ello se realizó una recta patrón de los antifúngicos a ensayar, en nuestro caso el posaconazol y el voriconazol, con un rango de diluciones determinado previamente escogido basándose en publicaciones anteriores. En el caso del posaconazol el rango de diluciones ensayadas fue desde 0.125 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para el voriconazol

fue desde 0.625 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$. La composición del medio utilizado en el ensayo de los diferentes rangos fue:

- 3.45 g de Yeast Nitrogen Base
- 5 g de triptosa peptona
- 2.5 g de dextrosa
- 7.5 g de agar
- 500 ml agua destilada estéril

Paralelamente se preparó un inóculo con *Candida parapsilosis* ATCC 22019 a partir de una placa de Sabouraud sembrada 24 h antes e incubada a 35°C. Se dispensaron 20 ml de medio esterilizado en un tubo Falcon estéril. Una vez el medio alcanzó una temperatura aproximada de 49 °C se añadió el inóculo de *Candida parapsilosis* quedando a una concentración final de 2×10^6 conidios/ml. Después de homogeneizar la mezcla se dispensó en una placa petri de 100x15mm. Las placas se dejaron enfriar. Cuando el medio solidificó se hicieron unos pocillos de 4 mm de diámetro mediante un sacabocados y se dispensó en cada uno de ellos 20 μl del rango de concentraciones de antifúngico previamente preparado. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Las placas se incubaron a 35°C. Los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento fueron medidos a las 24 horas y a partir de éstos se calculó la recta patrón para cada antifúngico y el coeficiente de correlación.

Para calcular la concentración de fármaco en el suero de los animales se utilizaron grupos de cinco ratones infectados y tratados con el antifúngico a estudiar. Se extrajo el suero de los ratones y se siguió la misma metodología anteriormente descrita para el cálculo de la recta a partir de los rangos de concentraciones de los antifúngicos. En el caso del posaconazol se extrajo el suero de los ratones a las 3 y 24 horas después de la última dosis mientras que los sueros de los ratones tratados con voriconazol se extrajeron el quinto día de tratamiento a las 4 horas después de la administración del antifúngico. Una vez medidos los diámetros, éstos fueron extrapolados en la recta con la finalidad de conocer la concentración del antifúngico en suero.

La metodología utilizada para realizar el bioensayo se obtuvo mediante la modificación de diferentes métodos ya establecidos por otros autores (Kan *et*

al., 1986; Jorgensen *et al.*, 1981; Connolly *et al.*, 1999; Sugar y Liu, 2001; Majithiya *et al.*, 2009).

3.2.10. Histopatología

Para realizar los estudios histopatológicos una porción de los órganos fue fijada en formol al 10% una vez realizada una primera observación macroscópica.

Deshidratación de las muestras

La deshidratación de las muestras se realizó sumergiendo las piezas en concentraciones crecientes de alcohol etílico. Primero en alcohol 70% durante cuatro horas y a continuación en alcohol de 96% durante dos horas y de 100% durante tres horas. Una vez deshidratadas, las muestras se 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). Luego 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. Luego se introdujeron en concentraciones decrecientes de

Materiales y métodos

alcohol isopropílico, primero en alcohol puro y después en alcohol 80%, 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 color rosado. Las estructuras fúngicas, los núcleos celulares y sustancias mucoides se tiñeron de color morado oscuro.
- Ácido periódico 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 y las células fúngicas color negro.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Resultados

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

4.1. Posaconazol en combinación con anfotericina B, una terapia efectiva frente a una infección diseminada causada por *Rhizopus oryzae* en el ratón.

Posaconazole combined with amphotericin B, an effective therapy for a murine disseminated infection caused by *Rhizopus oryzae*.

Rodríguez MM, Serena C, Mariné M, Pastor FJ, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008, 52:3786-3788.

Posaconazole Combined with Amphotericin B, an Effective Therapy for a Murine Disseminated Infection Caused by *Rhizopus oryzae*[∇]

M. Mar Rodríguez, Carolina Serena, Marçal Mariné, F. Javier Pastor, and Josep Guarro*

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

Received 14 May 2008/Returned for modification 25 June 2008/Accepted 28 July 2008

In a murine model of disseminated zygomycosis, low doses of amphotericin B (0.3 mg/kg body weight/day) combined with posaconazole (40 mg/kg/day) prolonged survival and reduced tissue burden with respect to that of controls and that of both drugs administered alone. Results were similar to those obtained with amphotericin B given alone at 0.8 mg/kg/day.

Zygomycosis is an opportunistic fungal infection that causes a high degree of morbidity and mortality in immunocompromised patients, particularly those with hematologic malignancy or diabetes mellitus. *Rhizopus oryzae* infection is the most common cause of zygomycosis in humans (10). Optimal management of zygomycosis has not been defined. Rapid diagnosis, mitigation or reduction of risk factors, administration of antifungal therapy, surgical debridement where possible, and the use of adjunctive therapies all contribute to the successful management of zygomycosis (11). Amphotericin B (AMB) deoxycholate and lipid formulations of AMB are the drugs of choice for treating zygomycoses (10, 11, 12). Posaconazole (PSC) is safer than AMB and shows good in vitro activity against some zygomycetes (1, 14). Clinical data seem to confirm that in two compassionate use trials, outcomes obtained with PSC therapy were similar to those obtained with AMB, supporting the use of this azole in the management of refractory zygomycosis or in cases of patient intolerance to AMB therapy (6, 15). Because animal studies showed limited activity of PSC against *R. oryzae* infection (2, 4), we hypothesized that the combined use of two drugs with different targets and with proven activities against zygomycetes may act synergistically against *R. oryzae* infection or, at least, would allow the use of reduced therapeutic doses. Therefore, we evaluated the efficacy of PSC alone and of PSC combined with AMB in a model of disseminated *R. oryzae* infection in neutropenic mice.

Two clinical isolates of *R. oryzae*, FMR 6485 and FMR 8542, were used. The in vitro antifungal susceptibility of each strain was tested using a reference microdilution method (8), and the in vitro interactions were assessed using a checkerboard method (5, 7). For both of the drugs and their combinations, we used a MIC of 0 as the endpoint criterion.

Male OF1 mice weighing 30 g were used. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili animal welfare committee. Animals were immunosuppressed by intraperitoneal administration of a single dose of cyclophosphamide, 200 mg/kg of body weight, plus a single intravenous administration of 5-fluorouracil, 150 mg/kg,

1 day before the infection (3). Mice were injected with 1×10^5 CFU in 0.2 ml in the lateral tail vein. Preliminary experiments with both strains (data not shown) showed that this concentration was the optimal dose for killing 100% of the animals within 6 days of infection.

AMB (Fungizona) and PSC (Noxafil) were tested. AMB was administered intravenously at 0.3 mg/kg/day or 0.8 mg/kg/day, once daily; PSC was administered orally at 20 mg/kg/day, 40 mg/kg/day, or 80 mg/kg/day, once daily. In addition, AMB at 0.3 mg/kg/day or 0.8 mg/kg/day was combined with PSC at 40 mg/kg/day. Treatments were started 24 h after the challenge and lasted for 7 days. We evaluated the efficacy of the different regimens in prolonging survival and in reducing tissue burden in the brain and kidneys.

For survival studies, groups of 10 mice used with each strain and from each treatment group were randomly established and checked daily for 20 days. For tissue burden studies, groups of 10 mice were also established, and the animals were sacrificed on day 4 after they were infected. Kidneys and brains were removed aseptically and gently homogenized in 2 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on Sabouraud dextrose agar and incubated for 24 h at 35°C. Data were expressed as log₁₀ CFU per gram of tissue. Mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. Colony counts from tissue burden studies were analyzed by using the Mann-Whitney U test.

The in vitro results are shown in Table 1. The combination of AMB plus PSC was synergistic against the strain FMR 6485 but showed an indifferent interaction against the strain FMR 8542.

For both strains, the results of two studies are pooled; thus,

TABLE 1. In vitro antifungal activities and interactions among antifungal drugs against two strains of *R. oryzae*

Strain	MIC (μg/ml) ^a			
	AMB	PSC	AMB/PSC	FICI
FMR 6485	0.5	1	0.125/0.25	0.50
FMR 8542	0.5	2	0.125/1	0.625

^a Values greater than or equal to 0.5, synergistic activity; values ranging from >0.5 to ≤4, indifferent activity; values of more than 4, antagonistic activity (8). FICI, fractional inhibitory concentration index.

* 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 11 August 2008.

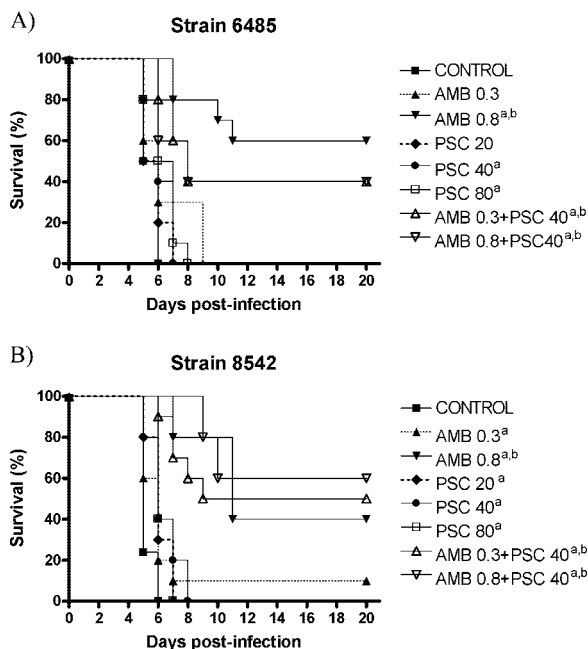


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with *R. oryzae* FMR 6485 (A) or *R. oryzae* FMR 8542 (B) and treated with AMB and PSC. ^a, $P < 0.05$ versus control; ^b, $P < 0.05$ versus PSC (20 mg/kg), PSC (40 mg/kg), PSC (80 mg/kg), and AMB (0.3 mg/kg).

there were 20 control mice for each strain. For strain FMR 6485, all treatment regimens, with the exception of AMB at 0.3 mg/kg/day and PSC at 20 mg/kg/day, significantly prolonged survival compared with that for the control group (Fig. 1). For strain FMR 8542, all treatments prolonged survival compared with those for the control group. In addition, for both strains, AMB at 0.8 mg/kg/day and with the two combinations were the most effective regimens for prolonging survival. We observed no statistical differences between AMB at 0.8 mg/kg/day and the two combinations of AMB and PSC.

AMB at 0.8 mg/kg/day and the two combinations of AMB plus PSC significantly reduced the fungal load of strain FMR 6485 in the brain and the kidney with respect to that of the other groups (Fig. 2). For strain FMR 8542, the same results were seen with the kidneys. However, in brain the combination of AMB at 0.3 mg/kg plus PSC at 40 mg/kg was the most effective therapy. The combination of AMB at 0.8 mg/kg plus PSC at 40 mg/kg and AMB at 0.8 mg/kg also significantly reduced fungal load in brain tissue compared with those of the monotherapies and the control group. Finally, PSC 40 and 80 at mg/kg/day significantly reduced fungal load in both the brain and the kidney compared with that of the control group, whereas PSC at 20 mg/kg/day did so only in brain.

As in other studies, AMB at 0.8 mg/kg/day was generally

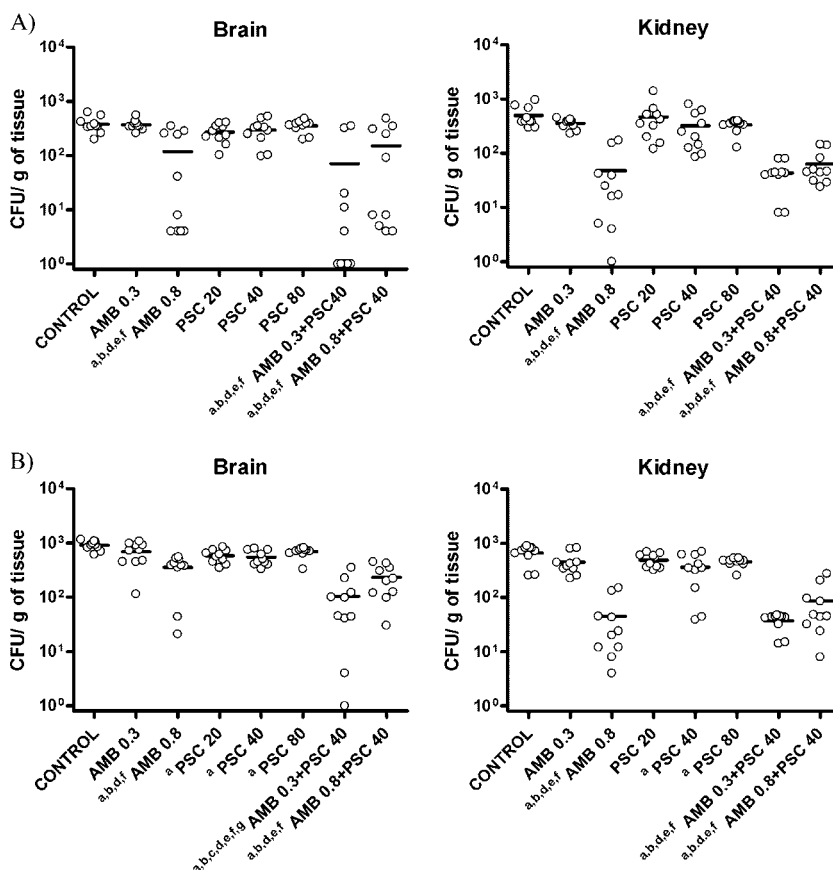


FIG. 2. Effects of the antifungal treatment on colony counts of the *R. oryzae* strains FMR 6485 (A) and FMR 8542 (B) in brain and kidney of mice. ^a, $P < 0.05$ versus control; ^b, $P < 0.05$ versus AMB (0.3 mg/kg); ^c, $P < 0.05$ versus AMB (0.8 mg/kg); ^d, $P < 0.05$ versus PSC (20 mg/kg); ^e, $P < 0.05$ versus PSC (40 mg/kg); ^f, $P < 0.05$ versus PSC (80 mg/kg); ^g, $P < 0.05$ versus AMB (0.8 mg/kg) plus PSC (40 mg/kg). Horizontal lines indicate mean values.

effective against both isolates (4, 13). In an animal infection model, PSC showed poor efficacy against a strain of *R. oryzae* (4). Similarly, prophylactic administration of PSC to neutropenic mice prolonged survival but did not reduce the tissue burden in a disseminated infection caused by *R. oryzae* (2). The current study partly confirmed these results.

Although the combination of PSC plus AMB has not been extensively tested in patients with infections caused by *R. oryzae*, recently, a patient with disseminated infection caused by *Rhizomucor* sp. (a genus close to *Rhizopus*) was cured with combined therapy of liposomal AMB and PSC, without surgical intervention (9).

In the current study, although the combination of PSC with AMB was not superior to high-dose AMB alone, the combination did allow a reduction of the AMB dose with no loss of efficacy. In addition, for one fungal strain, the combination reduced the fungal burden in the brain. Further controlled studies are needed to ascertain the clinical relevance of this combination.

This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

REFERENCES

1. Almyroudis, N. G., D. A. Sutton, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, and S. Kusne. 2007. In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2587–2590.
2. Barchiesi, F., E. Spreghini, A. Santinelli, A. W. Fothergill, E. Pisa, D. Giannini, M. G. Rinaldi, and G. Scalise. 2007. Posaconazole prophylaxis in experimental systemic zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:73–77.
3. Capilla, J., C. Serena, F. J. Pastor, M. Ortoneda, and J. Guarro. 2003. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3976–3978.
4. Dannaoui, E., J. F. G. M. Meis, D. Loebenberg, and P. E. Verweij. 2003. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3647–3650.
5. Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering. 1991. Antimicrobial combinations, p. 432–492. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
6. Greenberg, R. N., K. Mullane, J. A. van Burik, I. Raad, M. J. Abzug, G. Anstead, R. Herbrecht, A. Langston, K. A. Marr, G. Schiller, M. Schuster, J. R. Wingard, C. E. Gonzalez, S. G. Revankar, G. Corcoran, R. J. Kryscio, and R. Hare. 2006. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:126–133.
7. Johnson, M. D., C. MacDougall, L. Ostrosky-Zeichner, J. R. Perfect, and J. H. Rex. 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:693–715.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
9. Rickerts, V., J. Atta, S. Herrmann, V. Jacobi, E. Lambrecht, R. Bialek, and G. Just-Nübling. 2006. Successful treatment of disseminated mucormycosis with a combination of liposomal amphotericin B and posaconazole in a patient with acute myeloid leukaemia. *Mycoses* **49**:27–30.
10. Roden, M. M., T. E. Zaoutis, W. L. Buchanan, T. A. Knudsen, T. A. Sarkisova, R. L. Schaufele, M. Sein, T. Sein, C. C. Chiou, J. H. Chu, D. P. Kontoyiannis, and J. Walsh. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin. Infect. Dis.* **41**:634–653.
11. Rogers, T. R. 2008. Treatment of zygomycosis: current and new options. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:35–39.
12. Spellberg, B., J. Edwards, Jr., and A. Ibrahim. 2005. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:556–559.
13. Sugar, A. M., and X. Liu. 2000. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2004–2006.
14. Sun, Q. N., A. W. Fothergill, D. I. McCarthy, M. G. Rinaldi, and J. R. Graybill. 2002. In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1581–1582.
15. van Burik, J., R. S. Hare, H. F. Solomon, M. L. Corrado, and D. P. Kontoyiannis. 2006. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin. Infect. Dis.* **42**:61–65.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

4.2. Eficacia del posaconazol en el tratamiento de la infección diseminada en el ratón causada por *Paecilomyces lilacinus*.

Posaconazole efficacy in a murine disseminated infection caused by *Paecilomyces lilacinus*.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Serena C, and Guarro J.

Journal of Antimicrobial Agents. 2009, 63:361-364.

Posaconazole efficacy in a murine disseminated infection caused by *Paecilomyces lilacinus*

M. Mar Rodríguez, F. Javier Pastor, Carolina Serena and Josep Guarro*

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

Received 18 August 2008; returned 6 October 2008; revised 11 November 2008; accepted 12 November 2008

Objectives: We have compared the efficacy of posaconazole and amphotericin B in an experimental murine model of paecilomycosis.

Methods: Immunosuppressed mice were treated with posaconazole at 25, 50, 75 or 100 mg/kg/day orally, amphotericin B at 1.5 or 3 mg/kg/day intraperitoneally or liposomal amphotericin B at 5 mg/kg/day intravenously. Treatment began 1 day after infection and continued for 10 days post-infection. Two strains of *Paecilomyces lilacinus* were tested.

Results: Posaconazole at 50 mg/kg/day was the only treatment able to significantly reduce fungal loads in the spleens, kidneys and livers of the mice infected by each of the two strains.

Conclusions: The results suggest that posaconazole may have a clinical role in the treatment of disseminated paecilomycosis.

Keywords: amphotericin B, murine model, paecilomycosis

Introduction

Paecilomyces lilacinus is a fungus distributed worldwide, which produces severe infections in immunocompromised hosts, although it can affect immunocompetent hosts too.¹ A recent review of 119 infections caused by this fungus since 1964 has shown that although most of them were ocular, many other sites of the body were also affected.¹ In general, these infections are very difficult to treat, recovery of neutropenia and removal of central venous catheters, if present, being crucial for resolving the infection. *P. lilacinus* shows a high *in vitro* resistance to the classical antifungal drugs, including amphotericin B, which is still the most commonly used drug despite its poor *in vitro* activity¹ and its controversial *in vivo* results. While it usually fails in ocular, cutaneous and subcutaneous infections, it has shown efficacy in other types of infections.¹ The novel triazoles have shown *in vitro* activity,¹ but there has been little experience of its clinical use. Since posaconazole has showed good *in vitro* activity against *P. lilacinus*¹ and favourable outcomes in several *in vivo* studies,^{2,3} we have evaluated the effectiveness of this drug against two strains of this fungus in murine models of *Paecilomyces* infection.

Materials and methods

The isolates tested were: FMR 5522 of clinical origin and FMR 8252 of environmental origin. Their *in vitro* antifungal susceptibility

was assayed using a broth microdilution method following the CLSI (formerly the NCCLS) guidelines for filamentous fungi.⁴ The MICs were 32 mg/L for amphotericin B and 1 mg/L for posaconazole for both strains. The isolates were stored at -80°C in potato dextrose broth with glycerol, and prior to testing they were subcultured on potato dextrose agar (PDA) at 30°C for 7 days. On the day of infection, they were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells or hyphae. The resulting suspensions, containing $\geq 95\%$ conidia, 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.

OF1 male mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) with a mean weight of 30 g were used. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee. The efficacy of the drugs was evaluated by prolonging survival and reducing tissue burden. Survival studies were performed by lethal infection attained by using severe immunosuppression. Tissue burden studies were performed by a sublethal infection attained by using moderate immunosuppression. Severe immunosuppression was reached after a dose of cyclophosphamide at 200 mg/kg of body weight administered intraperitoneally on the day of infection and two doses of 5-fluorouracyl, one of 150 mg/kg of body weight intravenously on the day of infection and another of 75 mg/kg on day 5. In prior studies, we found that this immunosuppressive regimen provokes severe neutropenia with polymorphonuclear leukocyte (PMN) counts of around $50/\mu\text{L}$ from days 3 to 14

*Corresponding author. Tel: +34 977-759359; Fax: +34 977-759322; E-mail: josep.guarro@urv.cat

or more (data not shown). In this case, the mice were challenged with 1.2×10^8 cfu/mouse for the strain FMR 5522 and 0.6×10^8 cfu/mouse for the strain FMR 8252, both inocula being chosen in previous studies (data not shown). Moderate immunosuppression was reached by a single administration of cyclophosphamide at 200 mg/kg of body weight intraperitoneally plus 5-fluorouracyl at 150 mg/kg of body weight intravenously, given 1 day prior to the infection. Previously, we had demonstrated that with this immunosuppressive regimen, the peripheral blood PMN counts were $<100/\mu\text{L}$ from days 3 to 9 or more.⁵ Mice were challenged with 1.2×10^7 cfu/mouse; and 0.6×10^7 cfu/mouse for the strains FMR 5522 and FMR 8252, respectively; both inocula were chosen in previous studies (data not shown).

Amphotericin B, purchased as Fungizone (Squibb Industria Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain), was administered at doses of 1.5 or 3 mg/kg of body weight once daily intraperitoneally; liposomal amphotericin B, kindly provided by Gilead Sciences S.A. (Madrid, Spain), was administered at a dose of 5 mg/kg of body weight/dose once daily intravenously; and posaconazole, purchased as Noxafil (Schering Plough Ltd, Hertfordshire, UK), was administered at doses of 25, 50, 75 or 100 mg/kg of body weight/dose once daily orally by gavage. To prevent bacterial infection, all mice received ceftazidime (5 mg/day subcutaneously) from days 1 to 10 post infection.

Treatments were started 24 h after challenge and lasted for 10 days. Control animals received no treatment. Groups of 10 mice were randomly established for each strain and each treatment. Mice were checked daily for 30 days. For tissue burden studies, groups of 10 mice were randomly established too. The animals were sacrificed

on day 11 post-infection. The livers, spleens and kidneys were aseptically removed, and portions of each organ were homogenized with sterile glass rods with the cutting edge in 1 mL of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA, incubated at 30°C and examined daily for 3 days. The numbers of cfu/g of tissue were calculated. Mean survival time was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups by using the log rank test. Colony counts in tissue burden studies were analysed using the Mann–Whitney *U*-test. Calculations were made using SPSS 15.0 and Graph pad 4.0 for Windows.

Results

The results of the survival studies are shown in Figure 1. For the strain FMR 5522, the control group and the treatment with posaconazole at 50 mg/kg/day were repeated and the results were pooled. In this case, there were 20 control mice and 20 mice in that particular group. Posaconazole at 50 mg/kg/day significantly prolonged survival at a rate of over 65%, the results being significantly better than for the other treatments at the end of the study. Posaconazole at 75 mg/kg significantly prolonged survival with respect to posaconazole at 25 and 100 mg/kg and to the control group. Amphotericin B at 3 mg/kg/day significantly prolonged survival with respect to the control group and the other therapies with the exception of posaconazole at 50 and 75 mg/kg. Survival of groups treated with posaconazole at 100 mg/kg, liposomal amphotericin B at 5 mg/kg and amphotericin B at 1.5 mg/kg

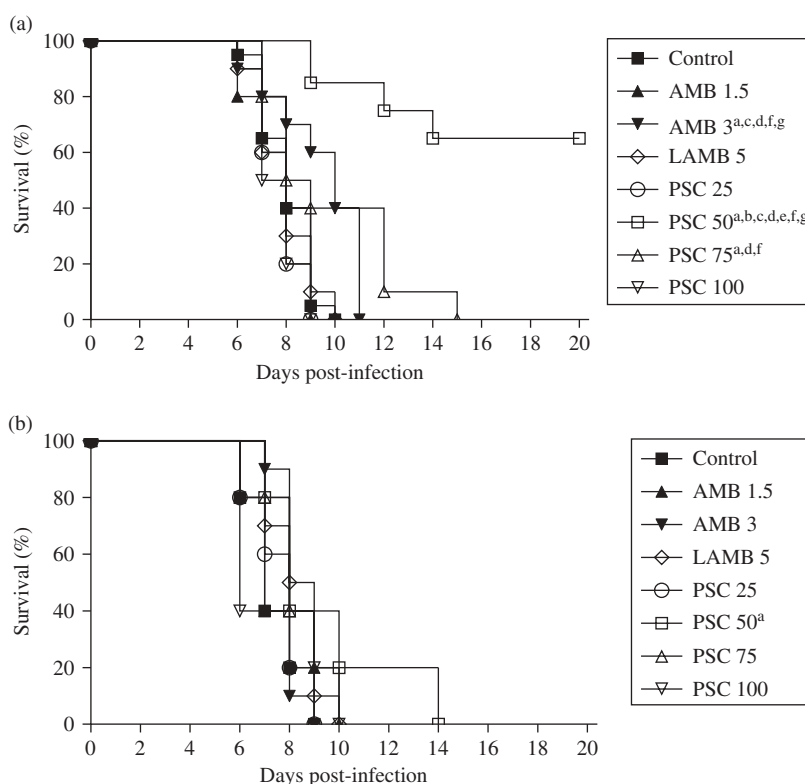


Figure 1. Cumulative mortality of severe immunosuppressed mice infected with 1.2×10^8 cfu/mouse of *P. lilacinus* FMR 5522 (a) or 0.6×10^8 cfu/mouse of *P. lilacinus* FMR 8252 (b). Amphotericin B (AMB) at 1.5 or 3 mg/kg/day; liposomal amphotericin B (LAMB) at 5 mg/kg/day; posaconazole (PSC) at 25, 50, 75 or 100 mg/kg/day. ^a*P* value < 0.05 versus the control; ^b*P* value < 0.05 versus AMB 3; ^c*P* value < 0.05 versus AMB 1.5; ^d*P* value < 0.05 versus PSC 100; ^e*P* value < 0.05 versus PSC 75; ^f*P* value < 0.05 versus PSC 25; ^g*P* value < 0.05 versus LAMB 5. All treatment groups contained 10 mice with the exception of the group treated with posaconazole at 50 mg/kg/day and the control group for the strain FMR 5522, which contained 20 mice each.

Posaconazole therapy in a murine paecilomycosis

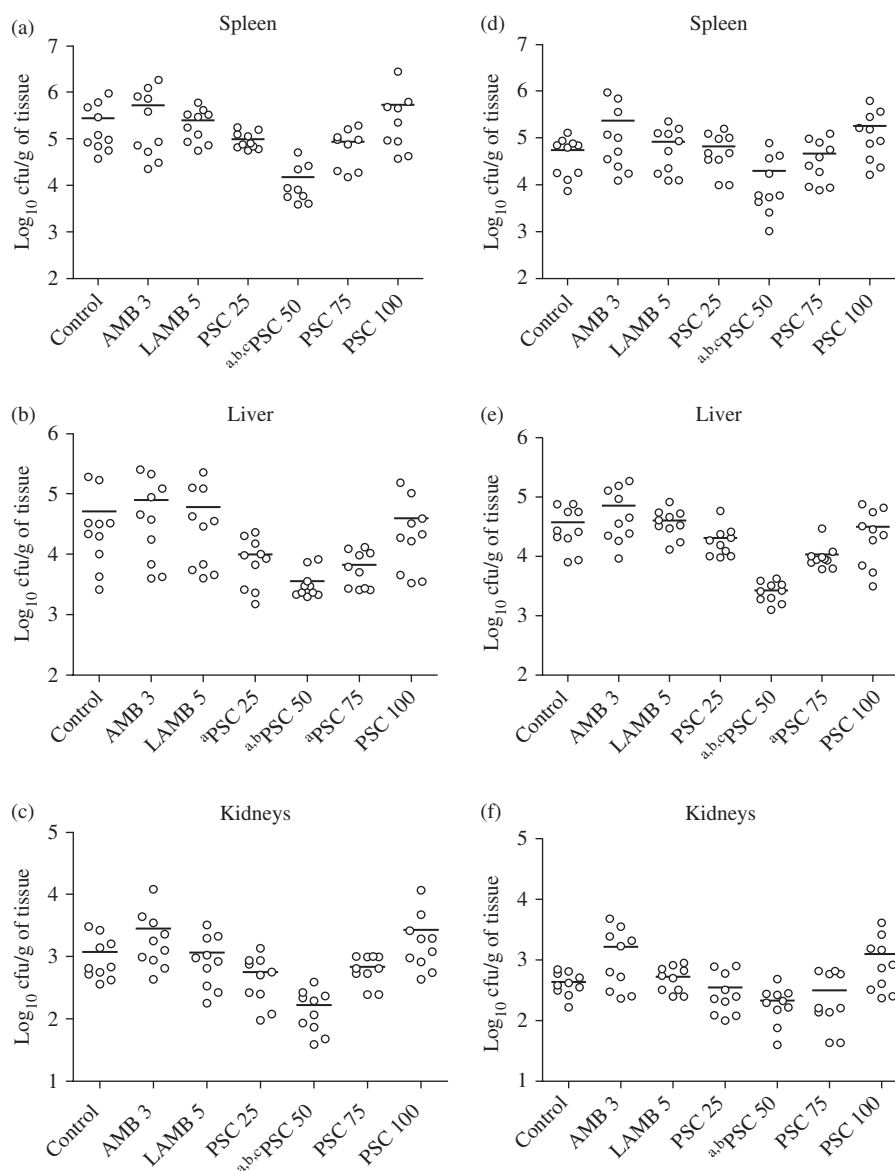


Figure 2. Effects of the antifungal treatments on colony counts in mice moderately immunosuppressed and infected with 1.2×10^7 cfu/mouse of *P. lilacinus* FMR 5522 (a, b and c) or 0.6×10^7 cfu/mouse of *P. lilacinus* FMR 8252 (d, e and f) in the spleen, liver and kidneys of mice. Amphotericin B (AMB) at 1.5 or 3 mg/kg/day; liposomal amphotericin B (LAMB) at 5 mg/kg/day; posaconazole (PSC) at 25, 50, 75 or 100 mg/kg/day. ^aP value < 0.05 versus the control; ^bP value < 0.05 versus PSC 100, LAMB 5 and AMB 3; ^cP value < 0.05 versus PSC 25 and PSC 75. Horizontal lines indicate mean values.

was not significantly different from that of the control group. For the strain FMR 8252, posaconazole at 50 mg/kg was the only drug able to significantly prolong survival with respect to the control group, although less impressively than for the FMR 5522 strain.

For both strains, the fungal load was at least two log units higher in the spleen and the liver than in the kidneys (Figure 2). Posaconazole at 50 mg/kg was the only treatment able to reduce the fungal load in all the organs studied for both strains.

Discussion

No previous data exist on the efficacy of posaconazole in experimental paecilomycosis, and there is a very little clinical

experience of its use in human infections.³ Although experimental infections by some species of *Paecilomyces* have been evaluated in different animal models, such as mice and rabbits using different routes of infection (intraperitoneal, intracorneal and intravenous),¹ this is the first time they have been used to evaluate different antifungal treatments against *P. lilacinus*.

Here, we have demonstrated the efficacy of posaconazole in two experimental murine models of paecilomycosis, one for survival and another for tissue burden studies. Due to the low virulence of *P. lilacinus*, and in order to find an immunosuppressive regimen that, combined with a high fungal inocula, would be able to provoke an acute infection with 100% of the animals dying within 10 days post-infection, we used a lethal infection with severe immunosuppression for the survival

studies. For the tissue burden studies, we used a less aggressive immunosuppressive regimen that allowed the animals to survive until the completion of treatment. The best results were obtained with posaconazole at 50 and 75 mg/kg, the 50 mg/kg dose being the most effective treatment in getting a high survival rate and reducing the fungal load with respect to the control group for all the organs tested. We did not observe a dose-effect relationship for posaconazole in this model, as higher doses of this drug were ineffective in prolonging survival and in reducing the fungal load. Similarly, other authors did not obtain better results with higher doses versus lower doses.^{6,7} No data exist to explain these observations, but a pharmacokinetic study in mice suggests that posaconazole absorption could be lower when high doses were administered.⁸ No studies on posaconazole toxicity in mice have been reported, but multiple daily 40 mg/kg doses have been administered to dogs with no adverse effects observed.⁹ Our study agrees with that of Imai *et al.*,⁷ who observed an apparent lack of clinical signs of toxicity since respiratory, nervous system, cardiovascular or gastrointestinal effects were not seen and the state of the skin, hair and pallor of the mucous were similar to those of the controls. Even the mice treated with high doses of posaconazole appeared healthier than those treated with the low dose of this drug.

In our study, posaconazole has shown efficacy in the treatment of murine paecilomycosis. Although further studies are needed to ascertain its clinical relevance, we think that this drug must be considered of potential clinical use in the treatment of human infections by *P. lilacinus*.

Funding

This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Pastor FJ, Guarro J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**: 948–60.
2. Groll AH, Walsh TJ. Posaconazole: clinical pharmacology and potential for management of fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005; **3**: 467–87.
3. Mullane K, Toor AA, Kalnicky C *et al.* Posaconazole salvage therapy allows successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory invasive mold infections. *Transpl Infect Dis* 2007; **9**: 89–96.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard M38-A*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
5. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ *et al.* 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.
6. Lozano-Chiu M, Arkan S, Paetznick VL *et al.* Treatment of murine fusariosis with SCH 56592. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 589–91.
7. Imai JK, Singh G, Clemons KV *et al.* Efficacy of posaconazole in a murine model of central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4063–6.
8. Nomeir AA, Kumari P, Hilbert MJ *et al.* Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 727–31.
9. Groll AH, Walsh TJ. Antifungal efficacy and pharmacodynamics of posaconazole in experimental models of invasive infections. *Mycoses* 2006; **49**: 7–16.

4.3. Eficacia de las combinaciones de dos y tres antifúngicos en el tratamiento experimental de una infección diseminada causada por *Scedosporium prolificans* en el ratón.

Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*.

Rodríguez MM, Calvo E, Serena C, Mariné M, Pastor FJ, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53:2153-2155.

Effects of Double and Triple Combinations of Antifungal Drugs in a Murine Model of Disseminated Infection by *Scedosporium prolificans*[∇]

M. Mar Rodríguez, Enrique Calvo, Carolina Serena, Marçal Mariné,
F. Javier Pastor, and Josep Guarro*

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

Received 5 November 2008/Returned for modification 12 December 2008/Accepted 6 February 2009

We have evaluated the efficacies of micafungin, amphotericin B, and voriconazole, alone and in double and triple combinations, in a murine model of systemic infection by *Scedosporium prolificans*. Micafungin combined with voriconazole or amphotericin B was the most effective, these being the only treatments able to prolong survival and to reduce the fungal load in the kidneys and brain. Triple combinations of these drugs did not improve the results obtained with double combinations.

Invasive infections by *Scedosporium* species are difficult to treat and cause high mortality (7). The outcome of these infections is generally worse when they are caused by *Scedosporium prolificans* (3, 7), which is refractory to antifungal therapy (18).

Up to now, the only drugs that have shown any beneficial effect in infection of animals by *S. prolificans* have been liposomal amphotericin B (AMB) at high doses (1, 16), albaconazole (2), and caspofungin (1). However, in the clinical setting, the usefulness of these drugs is questionable (8, 9, 12). It seems reasonable, therefore, to explore the use of new approaches, testing two and even three drugs with different action mechanisms. The in vitro combinations of AMB with different echinocandins or triazoles have shown some degree of synergy against *S. prolificans* (4, 23). Combinations of more than two drugs have been poorly explored.

We have evaluated the efficacies of micafungin (MFG), AMB, and voriconazole (VRC), alone and in double and triple combinations, in a murine model of disseminated scedosporiosis caused by *S. prolificans*. Although none of these drugs is active in vitro against this fungus (14, 23), it is not known if the combination of these drugs could be effective in vivo.

A clinical isolate of *S. prolificans*, FMR 6719, was used. On the day of infection, it was suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of cells or hyphae (17). The resulting suspension, containing $\geq 95\%$ of viable conidia, was adjusted to the desired inoculum based on the hemocytometer counts and confirmed by culture on potato dextrose agar.

In vitro susceptibilities of the isolate to MFG, AMB, and VRC determined by a reference method (15) are shown in Table 1. Drug interactions were assessed using a checkerboard method (5, 6, 10). All double combinations resulted in indifferent interactions, while the triple combination of MFG plus AMB and VRC was synergistic.

Male OF1 mice with a mean weight of 30 g were immunosuppressed with cyclophosphamide 1 day prior to the infection (1). Animal care procedures were approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee. To evaluate the most appropriate infective dose that produced an acute infection, groups of 10 mice were challenged with each of the following three conidial suspensions: 1×10^4 CFU/ml, 7.5×10^4 CFU/ml, and 1×10^5 CFU/ml in 0.2 ml injected into the lateral tail vein. The second inoculum tested was the most appropriate.

The efficacies of the different treatments were evaluated through prolongation of survival and fungal tissue burden reduction in brains and kidneys of infected mice. The different groups (10 mice per group) were treated as follows: MFG at 10 mg/kg of body weight given intraperitoneally once daily (11); AMB at 1.5 mg/kg of body weight given intraperitoneally once daily; VRC at 60 mg/kg of body weight given orally by gavage once daily (19); MFG plus AMB; MFG plus VRC; AMB plus VRC; and MFG plus AMB and VRC. The doses and the routes of administration used in the combined therapies were the same as in the monotherapies. The tests on the control group and the groups treated with MFG alone and in combination with VRC or AMB, which showed the best results, were repeated, and those results were pooled. There were 20 control mice and 20 mice for each treatment. From 3 days prior to infection, the mice that received VRC and the control group were given grapefruit juice instead of water. Control animals received no treatment. All treatments began 1 day after challenge, and the therapy lasted for 10 days. For tissue burden studies, mice were sacrificed on day 7 postinfection and the fungal loads in the kidneys and brain were determined.

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 using the Kruskal-Wallis test.

An additional group of five mice was similarly infected and treated with VRC (60 mg/kg daily) to determine the level of this drug in serum by bioassay (20), using yeast nitrogen broth and *Candida parapsilosis* ATCC 22019. The drug level was as

* 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 17 February 2009.

TABLE 1. In vitro antifungal activities and interactions among antifungal drugs against *S. proliferans* FMR 6719

Treatment	MIC(s) (µg/ml)	FICI ^a
MFG	256	
AMB	32	
VRC	64	
MFG + AMB	8, 16	0.53
MFG + VRC	16, 32	0.56
AMB + VRC	2, 32	0.56
MFG + AMB + VRC	0.25, 2, 16	0.31

^a FICI, fractional inhibitory concentration index. ≤ 0.5 , synergistic; > 0.5 to ≤ 4 , indifferent; > 4 , antagonistic (8).

expected, 6.71 µg/ml measured on day 5 of therapy, 4 h after dosing (13, 20).

All of the treatments were able to prolong survival. Moreover, MFG and the double and triple combinations prolonged the survival compared to results with the other monotherapies (Fig. 1). In kidneys, only the combination of MFG with VRC or AMB was able to reduce the fungal load with respect to results for the controls and the VRC group (Fig. 2). In brain, MFG alone significantly reduced the fungal load with respect to results for the control group. MFG combined with VRC or AMB was able to reduce the fungal load with respect to those for the control group and the VRC group. The combination of AMB, VRC, and MFG has shown synergy in our in vitro study. However, these results did not correlate with in vivo results because the triple combination did not work as well as the double combinations.

The mild efficacy of AMB in our murine model agrees with findings of several clinical studies (3, 22). VRC showed benefits in 40% of the patients included in a recent clinical study (21), although their degree of neutropenia was not mentioned. In our study, VRC showed poor efficacy, similar to that of AMB, which correlated with its high in vitro MICs. It is probable that the response to VRC is strain dependent. There are no studies of the use of MFG in the treatment of infections by *S. proliferans*, but in a murine infection, caspofungin was able to prolong survival, although there was no reduction of tissue burden (1). Our results with MFG agree in part with those results, since in our model this drug alone and principally in combination produced the best results.

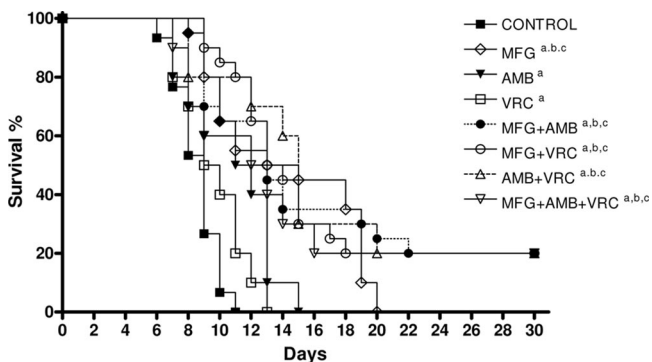


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with *S. proliferans* FMR 6719. a, $P < 0.05$ versus results for the control; b, $P < 0.05$ versus results with VRC; c, $P < 0.05$ versus results with AMB.

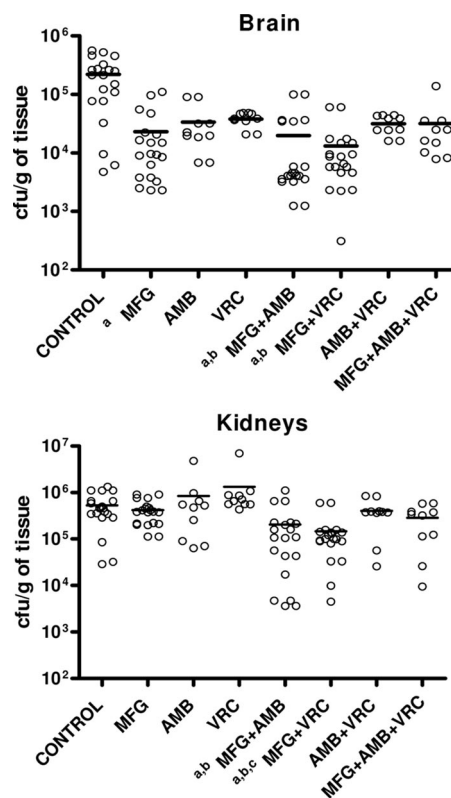


FIG. 2. Effects of the antifungal treatment on colony counts of *S. proliferans* FMR 6719 in the brains and kidneys of mice. a, $P < 0.05$ versus results for the control; b, $P < 0.05$ versus results with VRC; c, $P < 0.05$ versus results with MFG. Horizontal lines indicate mean values.

The use of combined therapies can be a promising clinical approach for combating infections caused by multiresistant fungi, such as *S. proliferans*.

REFERENCES

- Bocanegra, R., L. K. Najvar, S. Hernandez, D. I. McCarthy, and J. R. Graybill. 2005. Caspofungin and liposomal amphotericin B therapy of experimental murine scedosporiosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:5139-5141.
- Capilla, J., C. Yustes, E. Mayayo, B. Fernández, M. Ortoneda, F. J. Pastor, and J. Guarro. 2003. Efficacy of albaconazole (UR-9825) in treatment of disseminated *Scedosporium proliferans* infection in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1948-1951.
- Cortez, K. J., E. Roilides, F. Quiroz-Telles, J. Meletiadis, C. Antachopoulos, T. Knudsen, W. Buchanan, J. Milanovich, D. A. Sutton, A. Fothergill, M. G. Rinaldi, Y. R. Shea, T. Zaoutis, S. Kottlil, and T. J. Walsh. 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:157-197.
- Cuenca-Estrella, M., A. Alastruey-Izquierdo, L. Alcazar-Fuoli, L. Bernal-Martinez, A. Gomez-Lopez, M. J. Buitrago, E. Mellado, and J. L. Rodriguez-Tudela. 2008. In vitro activities of 35 double combinations of antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium proliferans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1136-1139.
- Dannaoui, E., O. Lortholary, and F. Dromer. 2004. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:970-978.
- Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering. 1991. Antimicrobial combinations, p. 432-492. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- Guarro, J., A. S. Kantarcioglu, R. Horrre, J. L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, J. Berenguer, and G. S. De Hoog. 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* **44**:295-327.
- Husain, S., P. Muñoz, G. Forrest, B. D. Alexander, J. Somani, K. Brennan, M. M. Wagnen, and N. Singh. 2005. Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium proliferans* in transplant recipients: clinical char-

- acteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. *Clin. Infect. Dis.* **40**:89–99.
9. **Idigoras, P., E. Perez-Trallero, L. Pineiro, J. Larruskain, M. C. Lopez-Lopategui, N. Rodriguez, and J. M. Gonzalez.** 2001. Disseminated infection and colonization by *Scedosporium prolificans*: a review of 18 cases, 1990–1999. *Clin. Infect. Dis.* **32**:158–165.
 10. **Johnson, M. D., C. MacDougall, L. Ostrosky-Zeichner, J. R. Perfect, and J. H. Rex.** 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:693–715.
 11. **Lewis, R. E., N. D. Albert, and D. P. Kontoyiannis.** 2008. Comparison of the dose-dependent activity and paradoxical effect of caspofungin and micafungin in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:1140–1144.
 12. **Maertens, J., K. Lagrou, H. Deweerdt, I. Surmont, G. E. Verhoef, J. Verhaegen, and M. A. Boogaerts.** 2000. Disseminated infection by *Scedosporium prolificans*: an emerging fatality among hematology patients. Case report and review. *Ann. Hematol.* **79**:340–344.
 13. **Majithiya, J., A. Sharp, A. Parmar, D. W. Denning, and P. A. Warn.** 2009. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**:161–166.
 14. **Meletiadis, J., J. F. G. M. Meis, J. W. Mouton, J. L. Rodriguez-Tudela, J. P. Donnelly, P. E. Verweij, and the EUROFUNG Network.** 2002. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:62–68.
 15. **NCCLS/CLSI.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. NCCLS/CLSI, Wayne, PA.
 16. **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.
 17. **Ortoneda, M., J. Capilla, I. Pujol, F. J. Pastor, E. Mayayo, J. Fernández-Ballart, and J. Guarro.** 2002. Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:525–529.
 18. **Rodriguez-Tudela, J. L., J. Berenguer, J. Guarro, A. S. Kantarcioglu, R. Horre, G. S. De Hoog, and M. Cuenca-Estrella.** 2008. Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Med. Mycol.* **1**:1–12.
 19. **Serena, C., F. J. Pastor, M. Mariné, M. M. Rodríguez, and J. Guarro.** 2008. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:877–879.
 20. **Sugar, A. M., and X. Liu.** 2001. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:601–604.
 21. **Troke, P., K. Aguirrebengoa, C. Arteaga, D. Ellis, C. H. Heath, I. Lutsar, M. Rovira, Q. Nguyen, M. Slavin, and S. C. A. Chen.** 2008. Treatment of scedosporiosis with voriconazole: clinical experience with 107 patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1743–1750.
 22. **Walsh, T. J., and A. H. Groll.** 1999. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transplant. Infect. Dis.* **1**:247–261.
 23. **Yustes, C., and J. Guarro.** 2005. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3498–3500.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

4.4. Eficacia de la anfotericina B liposomal en combinación con el interferón gamma o con el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos en el tratamiento de la zigomicosis sistémica en el ratón.

Efficacy of liposomal amphotericin B combined with gamma interferon or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of systemic zygomycosis in mice.

Rodríguez MM, Calvo E, Mariné M, Pastor FJ, Fernández-Ballart J, and Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53:3569-3571.

Efficacy of Liposomal Amphotericin B Combined with Gamma Interferon or Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor for Treatment of Systemic Zygomycosis in Mice[∇]

M. Mar Rodríguez,¹ Enrique Calvo,¹ Marçal Mariné,¹ F. Javier Pastor,¹
Joan Fernandez-Ballart,² and Josep Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain,¹ and Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain²

Received 6 April 2009/Returned for modification 28 April 2009/Accepted 12 May 2009

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhanced the efficacy of liposomal amphotericin B (LAMB) in a murine model of disseminated infection by *Rhizopus oryzae*, significantly prolonging survival and reducing tissue burden. The use of gamma interferon (IFN- γ) alone was ineffective, and IFN- γ combined with LAMB did not improve the results obtained with LAMB alone.

Zygomycosis is a frequently lethal invasive infection (2). The standard therapy for zygomycosis has not yet been resolved (2). Historically, conventional amphotericin B (AMB) was the drug of choice for invasive zygomycosis, but its use is limited by its potential toxicity. The lipid formulation of AMB (LAMB) allows higher doses to be administered on account of its low toxicity and represents first-line therapy (17). In murine zygomycosis, LAMB has showed efficacy and has been even better than AMB deoxycholate (11, 12). The efficacy of posaconazole is controversial, as some clinical data show good results (9, 20) but some authors have demonstrated that this drug is poorly active against *Rhizopus oryzae*, the most common species causing zygomycosis (13, 16). Since the mortality rate is often high in disseminated zygomycosis, despite aggressive therapy, new strategies for the treatment of this infection are urgently needed (5).

Cytokines are critical components of the functional host defenses promoting activation and recruitment of granulocyte and mononuclear phagocyte effector cells (18). Over the last decade, the usefulness of these compounds as adjunctive agents in antifungal therapy in the treatment of severe fungal infections has been evaluated (2, 10). In particular, gamma interferon (IFN- γ) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) have showed efficacy as adjunctive agents in the treatment of experimental cryptococcosis and histoplasmosis in mice (3, 4) and also in several clinical cases of zygomycosis (1, 5, 8, 14). Moreover, these cytokines have induced an increase in in vitro polymorphonuclear leukocyte-induced hyphal damage to *R. oryzae* (6).

In this study, we have evaluated the effects of IFN- γ and GM-CSF, alone and combined with LAMB, in a murine model of infection by *R. oryzae*.

Two clinical isolates of *Rhizopus oryzae*, FMR 6485 and FMR 8542, were used in this study. The isolates were cultured

on potato dextrose agar at 35°C. The AMB MICs were identical for both strains (0.5 $\mu\text{g/ml}$) (16).

Male OF1 mice were used in this study. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee. Animals were immunodepressed 1 day prior to infection by administering a single dose of 200 mg of cyclophosphamide per kg of body weight intraperitoneally plus a single dose of 150 mg of 5-fluorouracil per kg intravenously (i.v.). Mice were challenged with 0.2×10^5 CFU/animal. Ten mice were used for survival studies and 10 for tissue burden studies, with the latter group being identified before the study started. All mice received ceftazi-

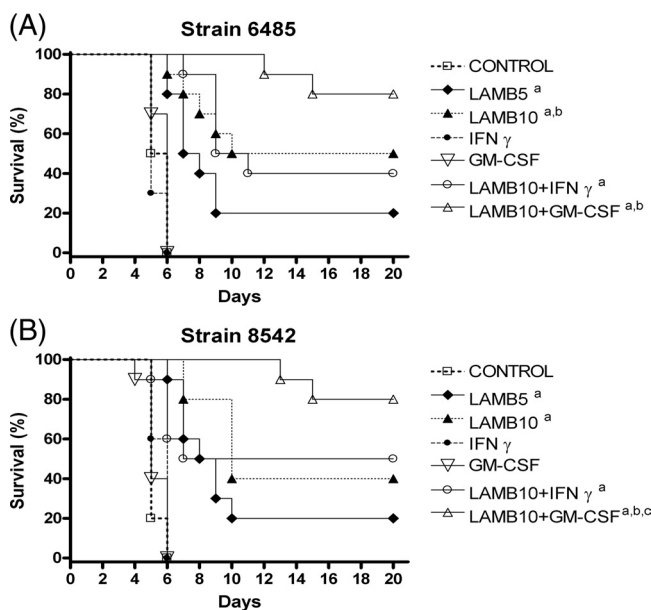


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with *Rhizopus oryzae* FMR 6485 (A) or *R. oryzae* FMR 8542 (B) and treated with LAMB, GM-CSF, and IFN- γ . ^a, *P* values of <0.05 for comparison with the control, IFN- γ (100,000 U), and GM-CSF (5 $\mu\text{g/kg}$); ^b, *P* values of <0.05 for comparison with LAMB (5 mg/kg); ^c, *P* values of <0.05 for comparison with LAMB (10 mg/kg).

* 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 18 May 2009.

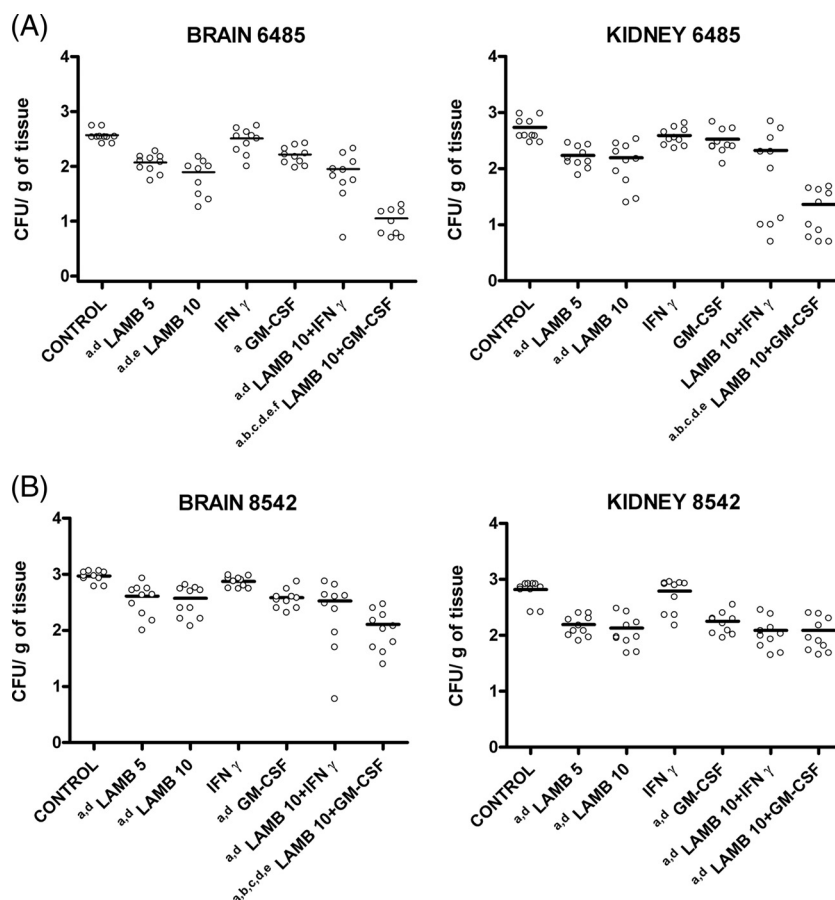


FIG. 2. Effects of antifungal treatment on colony counts of *Rhizopus oryzae* strains FMR 6485 (A) and FMR 8542 (B) in brain and kidney tissues of mice. ^a, *P* values of <0.002 for comparison with the control; ^b, *P* values of <0.002 for comparison with LAMB (5 mg/kg); ^c, *P* values of <0.002 for comparison with LAMB (10 mg/kg); ^d, *P* values of <0.002 for comparison with IFN- γ (100,000 U); ^e, *P* values of <0.002 for comparison with GM-CSF (5 μ g/kg); ^f, *P* values of <0.002 for comparison with LAMB (10 mg/kg) plus IFN- γ . CFU/g of tissue are expressed as log₁₀ scale. Horizontal lines indicate mean values.

dime (5 mg/day subcutaneously [s.c.]) from day 1 to day 7 after infection.

LAMB was administered i.v. at doses of 5 or 10 mg/kg of body weight/dose once daily. Human recombinant IFN- γ (GenScript Corporation) was administered i.v. at a dose of 10⁵ U once daily (3); human recombinant GM-CSF (GenScript Corporation) was administered s.c. at a dose of 5 μ g/kg/day once daily (19). The different groups were treated as follows: LAMB at 5 or 10 mg/kg of body weight i.v., IFN- γ at 10⁵ U i.v., GM-CSF at 5 μ g/kg/day s.c., LAMB at 10 mg/kg i.v. plus IFN- γ at 10⁵ U i.v., and LAMB at 10 mg/kg i.v. plus GM-CSF at 5 μ g/kg/day s.c.

All treatments began 24 h after challenge, and the therapies lasted for 7 days (16). Survival of mice was evaluated daily for 30 days. For tissue burden studies, mice were sacrificed on day 4 postinfection. Kidneys and brains were removed aseptically and were homogenized in 1 ml of sterile saline; care was taken to minimize tissue trauma. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on potato dextrose agar and incubated for 18 to 24 h at 35°C. Mean survival times were estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. Colony counts in tissue burden studies were analyzed by the Kruskal-Wallis test. When the results of

this test were significant, we used the Mann-Whitney U test to compare treatment pairs. The Bonferroni correction method was used to avoid an increase in type I errors due to multiple comparisons. When *P* was <0.05, the observed differences were declared to be statistically significant.

For both strains, the two doses of LAMB and the combination of LAMB with IFN- γ or GM-CSF significantly prolonged survival with respect to the rates for the control and the groups treated only with IFN- γ or GM-CSF (Fig. 1). LAMB combined with GM-CSF was able to prolong survival with respect to the rate for the group treated with LAMB at 10 mg/kg for strain FMR 8542. The combination of LAMB with IFN- γ showed efficacy similar to that of monotherapy with LAMB at 10 mg/kg, with no differences between them. Neither of the two cytokines prolonged survival.

All the treatments, with the exception of IFN- γ , significantly reduced the fungal load in brain and kidney in comparison to that for the control group for both strains. In addition, GM-CSF and IFN- γ plus LAMB failed to reduce tissue burden in kidney for strain FMR 6485 (Fig. 2). The combination of LAMB at 10 mg/kg with GM-CSF was the most effective treatment, reducing the fungal load in brain and kidney tissues, although only in brain tissues for strain FMR 8542.

AMB showed efficacy similar to that in a previous study (16), which proved the reproducibility of this murine model.

LAMB in general shows efficacy in zygomycosis treatment, but in many cases, the patients die. In a recent review of 120 cases of zygomycosis in patients with hematological malignancies, LAMB was associated with a 67% survival rate, compared to a 39% survival rate for AMB deoxycholate (7). In severe zygomycosis, correction of metabolic disturbances and reversal of immunosuppression are as essential as the other therapeutic measures for successful management (2). For this reason, we have assessed the efficacy of cytokines as adjuvant agents for returning the host immune response and tried to restore the host's defenses. In our model, only the combination of LAMB with GM-CSF was significantly better than the treatment with LAMB alone. These results agree with those observed in a few clinical cases of zygomycosis in which GM-CSF was administered successfully as an adjunctive therapy with AMB or its lipid formulation (5, 8, 14).

These studies suggest a potential use for GM-CSF as an immunomodulator for improving the benefits of therapy with LAMB against zygomycosis.

This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

REFERENCES

1. **Abzug, M. J., and T. J. Walsh.** 2004. Interferon-gamma and colony-stimulating factors as adjuvant therapy for refractory fungal infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**:769–773.
2. **Chayakulkeeree, M., M. A. Ghannoum, and J. R. Perfect.** 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:215–229.
3. **Clemons, K. V., J. E. Lutz, and D. A. Stevens.** 2001. Efficacy of recombinant gamma interferon for treatment of systemic cryptococcosis in SCID mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:686–689.
4. **Deepe, G. S., Jr., and R. Gibbons.** 2000. Recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the course of pulmonary histoplasmosis in immunocompetent and immunodeficient mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3328–3336.
5. **García-Díaz, J. B., L. Palau, and G. A. Pankey.** 2001. Resolution of rhinocerebral zygomycosis associated with adjuvant administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Infect. Dis.* **32**:166–170.
6. **Gil-Lamaignere, C., M. Simitopoulou, E. Roilides, A. Maloukou, R. M. Winn, and T. J. Walsh.** 2005. Interferon- γ and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important zygomycetes. *J. Infect. Dis.* **191**:1180–1187.
7. **Gleissner, B., A. Schilling, I. Anagnostopoulos, I. Siehl, and E. Thiel.** 2004. Improved outcome of zygomycosis in patients with hematological diseases? *Leuk. Lymphoma* **45**:1351–1360.
8. **Gonzalez, C. E., D. R. Couriel, and T. J. Walsh.** 1997. Disseminated zygomycosis in a neutropenic patient: successful treatment with amphotericin B lipid complex and granulocyte colony-stimulating factor. *Clin. Infect. Dis.* **24**:192–196.
9. **Greenberg, R. N., K. Mullane, J. A. van Burik, I. Raad, M. J. Abzug, G. Anstead, R. Herbrecht, A. Langston, K. A. Marr, G. Schiller, M. Schuster, J. R. Wingard, C. E. Gonzalez, S. G. Revankar, G. Corcoran, R. J. Kryscio, and R. Hare.** 2006. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:126–133.
10. **Hübel, K., D. C. Dale, and W. C. Liles.** 2002. Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: current status of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interferon- γ . *J. Infect. Dis.* **185**:1490–1501.
11. **Ibrahim, A. S., V. Avanesian, B. Spellberg, and J. E. Edwards, Jr.** 2003. Liposomal amphotericin B, and not amphotericin B deoxycholate, improves survival of diabetic mice infected with *Rhizopus oryzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3343–3344.
12. **Ibrahim, A. S., T. Gebremariam, M. I. Hussein, D. A. Stevens, Y. Fu, J. E. Edwards, Jr., and B. Spellberg.** 2008. Comparison of lipid amphotericin B preparations in treating murine zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1573–1576.
13. **Ibrahim, A. S., T. Gebremariam, J. A. Schwartz, J. E. Edwards, Jr., and B. Spellberg.** 2009. Posaconazole mono- or combination therapy for treatment of murine zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:772–775.
14. **Mastroianni, A.** 2004. Paranasal sinus mucormycosis in an immunocompetent host: efficacy and safety of combination therapy with liposomal amphotericin B and adjuvant rHuGM-CSF. *Infez. Med.* **12**:278–283.
15. Reference deleted.
16. **Rodríguez, M. M., C. Serena, M. Mariné, F. J. Pastor, and J. Guarro.** 2008. Posaconazole combined with amphotericin B, an effective therapy for a murine disseminated infection caused by *Rhizopus oryzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3786–3788.
17. **Rogers, T. R.** 2008. Treatment of zygomycosis: current and new options. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:35–39.
18. **Safdar, A.** 2007. Difficulties with fungal infections in acute myelogenous leukemia patients: immune enhancement strategies. *Oncologist* **12**:2–6.
19. **Simitopoulou, M., C. Gil-Lamaignere, N. Avramidis, A. Maloukou, S. Lekkas, E. Havlova, L. Kaurounaki, D. Loebenberg, and E. Roilides.** 2004. Antifungal activities of posaconazole and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo and in mice with disseminated infection due to *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3801–3805.
20. **Tobón, A. M., M. Arango, D. Fernández, and A. Restrepo.** 2003. Mucormycosis (zygomycosis) in a heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1488–1491.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

4.5. Correlación de la actividad *in vitro*, niveles séricos, y eficacia *in vivo* del posaconazol frente a *Rhizopus microsporus* en una infección diseminada en el ratón.

Correlation of in vitro activity, serum levels, and in vivo efficacy of posaconazole against *Rhizopus microsporus* in a murine disseminated infection.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Calvo E, Salas V, Sutton D, and Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53:5022-5025.

Correlation of In Vitro Activity, Serum Levels, and In Vivo Efficacy of Posaconazole against *Rhizopus microsporus* in a Murine Disseminated Infection[∇]

M. Mar Rodríguez,¹ F. Javier Pastor,¹ Enrique Calvo,¹ Valentina Salas,¹
Deanna A. Sutton,² and Josep Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain,¹ and Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas²

Received 22 July 2009/Returned for modification 20 August 2009/Accepted 15 September 2009

A broth microdilution method was used to evaluate the in vitro activities of seven antifungal agents against 15 clinical strains of *Rhizopus microsporus*. Amphotericin B (AMB) and posaconazole (POS) were the most active drugs. In a model of disseminated *R. microsporus* infection in immunosuppressed mice, we studied the efficacy of POS administered once or twice daily against four of the strains previously tested in vitro and compared it with that of liposomal AMB (LAMB). LAMB was the most effective treatment for the two strains with intermediate susceptibility to POS. For the two POS-susceptible strains, LAMB and POS at 20 mg/kg of body weight twice a day orally showed similar efficacies. The in vivo efficacy of POS administered twice a day orally correlated with the in vitro susceptibility data and the serum drug concentrations.

Zygomycosis is a frequently lethal invasive infection that occurs predominantly in immunocompromised patients (4), a population with a very poor prognosis and a high mortality rate (8). The clinical manifestations include rhino-orbito-cerebral, cutaneous, pulmonary, gastrointestinal, and disseminated infections (4). In a recent study in which a large number of clinical isolates of zygomycetes from different regions of the United States were molecularly identified, it was demonstrated that *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* were the most common species (3). Traditionally, amphotericin B (AMB) and, more recently, its lipid formulations are the front-line agents for the treatment of zygomycosis (4). Specifically, liposomal amphotericin B (LAMB) is less nephrotoxic than AMB and has better central nervous system penetration than AMB and the other lipid formulations (21). Posaconazole (POS) is a broad-spectrum triazole antifungal with a large volume of distribution into tissues (12). This drug has shown good in vitro activity against zygomycetes (1, 2) and has been used successfully as salvage therapy in some case reports and clinical trials of disseminated zygomycosis (8, 22, 23). However, its effectiveness remains controversial, since in experimental studies it has shown poor activity against *R. oryzae*, the main species causing zygomycosis (6, 9, 17). Several in vitro studies have shown that POS also exhibits significant activity against *R. microsporus*, another relevant clinical species (1, 2, 11), and a few clinical (14) and experimental (6) studies seem to demonstrate in vivo efficacy as well.

In this study, after confirming the significant in vitro activity of POS and AMB, we evaluated the efficacy of POS against four strains of *R. microsporus* in a murine model of disseminated

infection. Considering that antifungal susceptibility can differ substantially among different strains of a given species, which could explain the variable percentages of success demonstrated by POS and AMB in clinical trials (8, 18, 23), we tested multiple strains exhibiting various in vitro responses to obtain more-robust results.

MATERIALS AND METHODS

The in vitro antifungal susceptibilities of 15 clinical strains of *R. microsporus* to AMB, POS, voriconazole (VRC), fluconazole (FLC), itraconazole (ITC), micafungin (MFG), and flucytosine (5-FC) were determined by a broth microdilution method according to the CLSI guidelines for molds (13). Since AMB and POS were the most active drugs in vitro, we used these agents in the murine studies. Although there are no defined breakpoints with proven clinical efficacy, the working interpretive MIC breakpoints for POS and AMB against zygomycetes in vitro, described by the CLSI in document M38-A2, are as follows: susceptible (S), ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$; intermediate (I), 2 $\mu\text{g/ml}$; resistant (R), ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ (13).

For the murine studies, we chose four of the strains that had been tested in vitro. Two POS I strains (MIC, 2 $\mu\text{g/ml}$), FMR 3542 and IHEM 4770, and two POS S strains (MIC, 0.25 $\mu\text{g/ml}$), UTHSC 01-983 and UTHSC R-3466, were used to assess the possible correlation between in vitro and in vivo studies.

The isolates were stored at -80°C , and prior to testing they were subcultured on potato dextrose agar (PDA) at 35°C . On the day of infection, cultures on PDA were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of spores or hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on hemocytometer counts and plating 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 Committee. Animals were immunodepressed 1 day prior to infection by administering a single dose of 200 mg of cyclophosphamide per kg of body weight intraperitoneally (i.p.) plus a single dose of 150 mg of 5-fluorouracil per kg intravenously (i.v.). Mice were challenged with 1×10^4 CFU of IHEM 4770 and with 2×10^3 CFU for the rest of the strains 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; 100% of the animals died within 6 days of infection (data not shown).

The efficacy of the drugs was evaluated in terms of prolongation of survival and reduction of the fungal burden in the tissues of infected mice. Groups of 10 mice were randomly established, one for each treatment and one as a control. To

* 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 28 September 2009.

TABLE 1. In vitro activities of seven antifungal agents against 15 isolates of *Rhizopus microsporus*

Strain	MIC (mg/ml)						
	AMB	POS	VRC	FLC	ITC	MFG	5-FC
FMR 3542	0.5	2	4	32	1	64	128
CBS 102277	0.5	0.5	4	128	1	128	128
IHEM 18821	0.5	1	8	128	2	128	128
IHEM 13267	0.5	0.5	8	128	1	128	128
IHEM 9503	0.5	0.5	32	128	4	128	128
IHEM 10123	0.5	1	8	128	2	128	128
IHEM 4770	0.5	2	32	128	2	128	128
IHEM 5234	0.5	0.25	4	128	1	128	128
IHEM 13311	0.5	0.5	8	128	1	128	128
IHEM 15210	0.5	0.5	8	128	1	128	128
UTHSC R-3466	0.5	0.25	4	128	1	128	128
UTHSC 03-1802	1	0.25	8	128	1	128	128
UTHSC 04-3294	1	0.25	8	128	1	128	128
UTHSC 07-371	1	0.25	8	128	1	128	128
UTHSC 01-983	0.5	0.25	4	128	1	128	128
GM ^a	0.57	0.5	7.63	116.7	1.26	122.2	128

^a GM, geometric mean for the 15 strains studied.

prevent bacterial infection, the mice received ceftazidime (5 mg/day subcutaneously) from days 1 to 7 after infection.

Previous experiments investigating survival and tissue burden with strains FMR 3542 and IHEM 4770 (data not shown) showed that LAMB at 10 mg/kg/day i.v. and POS at 40 mg/kg/day orally (p.o.) were significantly better than AMB at 0.8 mg/kg/day i.v. and POS at 20 mg/kg/day p.o., respectively. Thus, we tested only LAMB (Gilead Sciences S.A., Madrid, Spain), that was administered at 10 mg/kg of body weight/dose once daily i.v. and POS (Noxafil; Schering Plough Ltd., Hertfordshire, United Kingdom), that was administered at 40 mg/kg of body weight/dose once daily p.o. (POS 40 QD) or at 20 mg/kg of body weight/dose twice a day p.o. (POS 20 BID). Control animals received no treatment.

All treatments began 24 h after challenge and lasted for 10 days. The survival of mice was evaluated daily for 20 days after challenge. For tissue burden studies, 10 mice from each group were sacrificed on day 4 postinfection. Kidneys and brains were removed aseptically and were homogenized in 1 ml of sterile saline; care was taken to minimize tissue trauma. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA and incubated for 18 to 24 h at 35°C.

In order to perform a bioassay to determine the level of POS in serum, additional groups of five mice were similarly infected with strain FMR 3542 or UTHSC 01-983 and were treated with POS 40 QD or POS 20 BID for 5 days. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and yeast nitrogen broth were used for this purpose. POS standards (twofold dilutions ranging from 0.125 to 10 µg/ml) were prepared in methyl alcohol. Sera obtained from POS-treated mice at 3 and 24 h after the last dose were tested in duplicate on each plate. Zones of inhibition for each pair were determined in duplicate, and the mean of those four readings was compared to the standard curve in order to calculate serum drug concentrations. The correlation coefficient was ≥ 0.93 (5, 16).

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 Kruskal-Wallis test. When the results of this test were significant, we used the Mann-Whitney U test to compare treatment pairs. Bonferroni's correction was used to avoid an increase in the type I error due to multiple comparisons. When *P* was < 0.05 , the differences observed were considered statistically significant.

RESULTS

Table 1 summarizes the in vitro activities of the seven antifungal agents tested against 15 strains of *R. microsporus*. AMB and POS were the most active drugs. ITC, with a MIC range of 1 to 4 µg/ml, was less active than AMB and POS. VRC showed poor activity, with a MIC range of 4 to 32 µg/ml. FLC, MFG, and 5-FC exhibited no significant activity.

The results of the bioassay revealed significantly higher serum POS levels when POS was administered twice daily than

TABLE 2. Mean POS concentrations in sera of five animals infected with one of two *R. microsporus* strains at day 5 of treatment as determined by a bioassay

Sampling time	Mean drug concn (µg/ml) in serum \pm SD for animals infected with the following strain and receiving the indicated treatment:			
	FMR 3542		UTHSC 01-983	
	POS 40 QD	POS 20 BID	POS 40 QD	POS 20 BID
3 h	5.31 \pm 0.97	7.60 \pm 0.24	5.96 \pm 0.55	8.04 \pm 0.25
24 h	0.95 \pm 0.22	2.04 \pm 0.42	1.05 \pm 0.43	2.15 \pm 1.35

when it was given once daily (Table 2). The mean POS concentrations in serum were higher than the POS MICs for the two POS regimens, i.e., POS 40 QD and POS 20 BID, at 3 h after the last dose for both strains. At 24 h, the mean POS concentrations in the sera of animals that received POS 20 BID were similar to the highest POS MIC obtained (2 µg/ml).

The results of survival studies are shown in Fig. 1. All the treatments were able to prolong survival significantly over that for the control group. LAMB was the most effective treatment against the two POS I strains. For the POS S strains, LAMB and POS 20 BID showed similar efficacies (60 to 80% survival), and both were significantly better than POS 40 QD.

All the treatments significantly reduced the fungal loads in all the organs tested, except for POS 40 QD in the brain with strains FMR 3542 and IHEM 4770, and POS 20 BID in the brain with strain IHEM 4770 (Fig. 2). For the two strains that were POS I, LAMB was the most effective of the regimens, reducing the fungal burdens in both organs. For the POS S strain UTHSC 01-983, LAMB and POS 20 BID were the most effective treatments, reducing the fungal load with no statistical differences between the two. For the other POS S strain, UTHSC R-3466, POS 20 BID was even more effective than LAMB in the kidney; however, in the brain, there were no statistical differences among all treatments.

DISCUSSION

While other studies have demonstrated no beneficial effects (6) or poor efficacy (17) of POS in the treatment of murine infection with *R. oryzae*, this study, utilizing four strains rather than one or two, demonstrated significant efficacy of POS against *R. microsporus*, an important agent of zygomycosis, in an experimental murine model. These results confirm the usefulness of in vitro POS susceptibility data for this organism (1, 2, 11) and support the efficacy noted in a few clinical studies where POS was able to resolve the infection (7, 14). In a previous experimental study where one strain of *R. microsporus* was tested, a POS dose-related response was demonstrated (6).

In most of the previous experimental studies with POS, this drug was administered once a day (6, 9, 20), but in human therapy this drug is administered twice a day to optimize its pharmacodynamics (10). In our model, the administration of POS twice a day proved to be more effective at prolonging survival and reducing the tissue burden than the once-a-day regimen and correlated with higher POS levels in serum.

Another interesting finding of the present study is the correlation between the in vitro and in vivo results with POS, since this drug was less effective against strains for which the POS

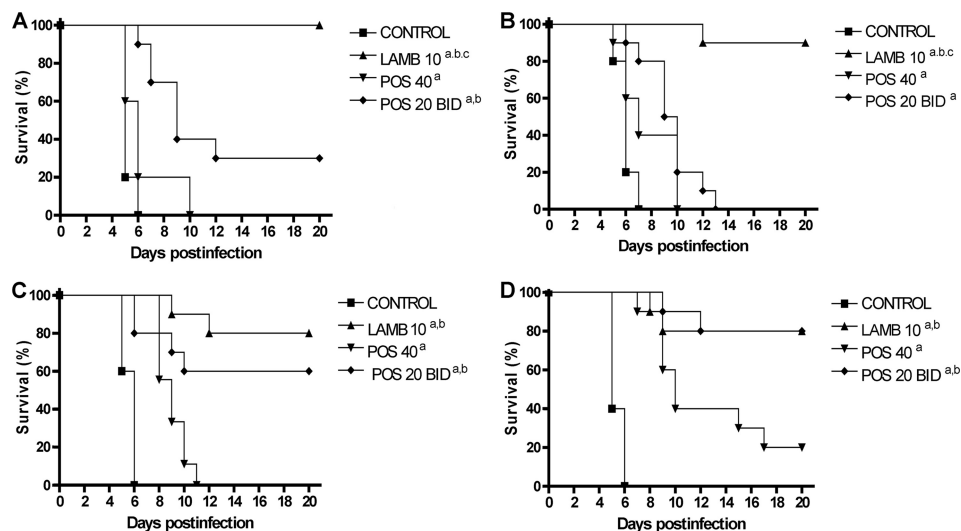


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with *Rhizopus microsporus* FMR 3542 (A), IHEM 4770 (B), UTHSC 01-983 (C), or UTHSC R-3466 (D) and treated with LAMB or POS. ^a, $P < 0.05$ for comparison with the control; ^b, $P < 0.05$ for comparison with POS 40; ^c, $P < 0.05$ for comparison with POS 20 BID. LAMB 10, liposomal amphotericin B administered at 10 mg/kg i.v. once a day; POS 40, posaconazole administered at 40 mg/kg p.o. once a day; POS 20 BID, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day. Groups of 10 mice were randomly established, one for each treatment and one as a control.

MIC was higher (2 $\mu\text{g/ml}$) than against those for which the POS MIC was 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Pharmacodynamic data revealed that POS induced optimal fungal killing when the peak drug concentrations achieved were 2 to 10 times the MIC (12). In

our study, this pharmacodynamic parameter of POS efficacy was achieved for those strains against which POS MICs were low. Although further studies are necessary to confirm these data, our results seem to demonstrate that POS MICs against

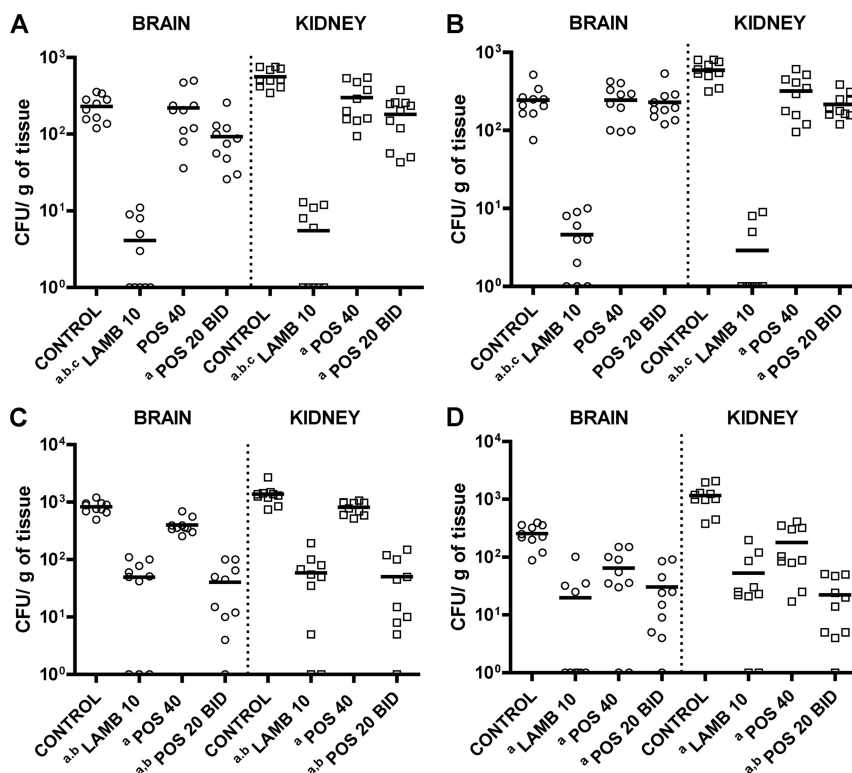


FIG. 2. Effects of the antifungal treatment on colony counts of *Rhizopus microsporus* strains FMR 3542 (A), IHEM 4770 (B), UTHSC 01-983 (C), and UTHSC R-3466 (D) in the brains and kidneys of mice. ^a, $P < 0.002$ for comparison with the control; ^b, $P < 0.002$ for comparison with POS 40; ^c, $P < 0.002$ for comparison with POS 20 BID. Horizontal lines indicate mean values. LAMB 10, liposomal amphotericin B administered at 10 mg/kg i.v. once a day; POS 40, posaconazole administered at 40 mg/kg p.o. once a day; POS 20 BID, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day. Groups of 10 mice were randomly established, one for each treatment and one as a control.

R. microsporus can be predictive of a more or less favorable outcome. In conclusion, POS could be a possible alternative to AMB or LAMB for the treatment of *R. microsporus* infections caused by strains for which POS MICs are low. In addition, the fact that POS achieves therapeutic concentrations in the central nervous system (15, 19) makes this drug useful against fungal pathogens that can cause cerebral infections, such as the zygomycetes.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 050031).

REFERENCES

1. Alastruey-Izquierdo, A., M. V. Castelli, I. Cuesta, A. Monzon, M. Cuenca-Estrella, and J. L. Rodríguez-Tudela. 2009. Activity of posaconazole and other antifungal agents against *Mucorales* strains identified by sequencing of internal transcribed spacers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1686–1689.
2. Almyroudis, N. G., D. A. Sutton, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, and S. Kusne. 2007. In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2587–2590.
3. Alvarez, E., D. A. Sutton, J. Cano, A. W. Fothergill, A. Stchigel, M. G. Rinaldi, and J. Guarro. 2009. Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 1650–1656.
4. Chayakulkeeree, M., M. A. Ghannoum, and J. R. Perfect. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:215–229.
5. Connolly, P., J. Wheat, C. Schnizlein-Bick, M. Durkin, S. Kohler, M. Smedema, J. Goldberg, E. Brizendine, and D. Loebenberg. 1999. Comparison of a new triazole antifungal agent, Schering 56592, with itraconazole and amphotericin B for treatment of histoplasmosis in immunocompetent mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:322–328.
6. Dannaoui, E., J. F. G. M. Meis, D. Loebenberg, and P. E. Verweij. 2003. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3647–3650.
7. de Mol, P., and J. F. G. M. Meis. 2009. Disseminated *Rhizopus microsporus* infection in a patient on oral corticosteroid treatment: a case report. *Neth. J. Med.* **67**:25–28.
8. Greenberg, R. N., K. Mullane, J. A. van Burik, I. Raad, M. J. Abzug, G. Anstead, R. Herbrecht, A. Langston, K. A. Marr, G. Schiller, M. Schuster, J. R. Wingard, C. E. Gonzalez, S. G. Revankar, G. Corcoran, R. J. Kryscio, and R. Hare. 2006. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:126–133.
9. Ibrahim, A. S., T. Gebremariam, J. A. Schwartz, J. E. Edwards, Jr., and B. Spellberg. 2009. Posaconazole mono- or combination therapy for treatment of murine zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:772–775.
10. Krishna, G., A. Moton, L. Ma, M. M. Medlock, and J. McLeod. 2009. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:958–966.
11. Messer, S. A., D. J. Diekema, R. J. Hollis, L. B. Boyken, S. Tendolkar, J. Kroeger, and M. A. Pfaller. 2007. Evaluation of disk diffusion and Etest compared to broth microdilution susceptibility testing of posaconazole against clinical isolates of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1322–1324.
12. Morris, M. I. 2009. Posaconazole: a new oral antifungal agent with an expanded spectrum of activity. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **66**:225–236.
13. NCCLS/CLSI. 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.
14. Peel, T., J. Daffy, K. Thursky, P. Stanley, and K. Buising. 2008. Posaconazole as first line treatment for disseminated zygomycosis. *Mycoses* **51**:542–545.
15. Pitisuttithum, P., R. Negroni, J. R. Graybill, B. Bustamante, P. Pappas, S. Chapman, R. S. Hare, and C. J. Hardalo. 2005. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:745–755.
16. Rodríguez, M. M., E. Calvo, C. Serena, M. Mariné, F. J. Pastor, and J. Guarro. 2009. Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2153–2155.
17. Rodríguez, M. M., C. Serena, M. Mariné, F. J. Pastor, and J. Guarro. 2008. Posaconazole combined with amphotericin B, an effective therapy for a murine disseminated infection caused by *Rhizopus oryzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3786–3788.
18. Rogers, T. R. 2008. Treatment of zygomycosis: current and new options. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**(Suppl. 1):i35–i40.
19. Rüping, M. J. G. T., N. Albermann, F. Ebinger, I. Burckhardt, C. Beisel, C. Müller, J. J. Vehreschild, M. Kochanek, G. Fätkenheuer, C. Bangard, A. J. Ullmann, W. Herr, K. Kolbe, M. Hallek, and O. A. Cornely. 2008. Posaconazole concentrations in the central nervous system. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**:1468–1470.
20. Simitopoulou, M., C. Gil-Lamaignere, N. Avramidis, A. Maloukou, S. Lekkas, E. Havlova, L. Kaurounaki, D. Loebenberg, and E. Roilides. 2004. Antifungal activities of posaconazole and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo and in mice with disseminated infection due to *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3801–3805.
21. Spellberg, B., T. J. Walsh, D. P. Kontoyiannis, J. E. Edwards, Jr., and A. S. Ibrahim. 2009. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clin. Infect. Dis.* **48**:1743–1751.
22. Tobón, A. M., M. Arango, D. Fernández, and A. Restrepo. 2003. Mucormycosis (zygomycosis) in a heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1488–1491.
23. van Burik, J. A. H., R. S. Hare, H. F. Solomon, M. L. Corrado, and D. P. Kontoyiannis. 2006. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin. Infect. Dis.* **42**:e61–e65.

4.6. Eficacia del voriconazol en una infección diseminada en ratón causada por *Paecilomyces lilacinus*.

Efficacy of voriconazole in a murine model of invasive paecilomycosis.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Serena C, and Guarro J.

International Journal of Antimicrobial Agents. 2009. Aceptado.
IJAA-D-09-00372R2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Efficacy of voriconazole in a murine model of invasive paecilomycosis

M. Mar Rodríguez¹, F. Javier Pastor^{1*}, Carolina Serena¹, and Josep Guarro¹

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

Running title: Voriconazole against invasive paecilomycosis.

*** 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**

Abstract

We studied the efficacy of voriconazole and amphotericin B in an immunosuppressed murine model of disseminated infection by two strains of *Paecilomyces lilacinus*. Mice were treated with voriconazole 60 mg/kg/day orally or amphotericin B 3 mg/kg/day intraperitoneally, beginning 1 day after infection and continuing for 9 days. In order to avoid its rapid clearance, the animals that received voriconazole and the control group were given grapefruit juice instead of water. Voriconazole significantly prolonged survival with respect to the group treated with amphotericin B and to the control group for both strains ($P=0.005$ and $P<0.0001$, respectively, for the strain FMR 5522; and $P=0.0002$ and $P<0.0001$, respectively, for the strain FMR 8252). Voriconazole reduced fungal load in spleens, kidneys and liver of the infected mice for both strains tested. Survival of mice challenged with the strain FMR 8252 treated with amphotericin B was not different from that of the control group ($P=0.223$), being worse than that of the mice treated with voriconazole ($P=0.0002$). Amphotericin B was not able to reduce the tissue burden in any organ with respect to the control group for both strains studied.

Keywords: *Paecilomyces lilacinus*, mice, voriconazole, amphotericin B.

1. Introduction

Paecilomyces lilacinus is an opportunistic filamentous fungus causing severe infections in both immunocompetent and immunocompromised patients [1-4]. The most frequent clinical manifestations correspond to oculomycosis and cutaneous and subcutaneous infections [5-19]. Although, less frequently, this fungus can also disseminate, probably due to this ability to sporulate in tissue, producing numerous conidia that spread haematogenously [1,20].

In ophthalmic and skin infections caused by this fungus, several drugs, generally topically, have been used, but the optimal treatment for *P. lilacinus* infection has not yet been established. Amphotericin B is probably the most commonly used drug for treating this infection with most of the results negative or unknown [6, 8, 10, 15, 21-26], which agrees with the poor *in vitro* response of *P. lilacinus* to this antifungal drug [1, 27, 28]. There is little data on the activity of the newer triazoles, either in *in vitro* [28, 29] or in animal models [1, 30], but that data is promising. Although there is limited clinical experience in the use of voriconazole, this drug seems to be effective in the treatment of this fungal infection [1, 31]. The aim of this study was to evaluate the efficacy of voriconazole (VRC) in a disseminated *P. lilacinus* infection in neutropenic mice.

2. Materials and methods

The isolates FMR 5522 and FMR 8252, from knee joint fluid and from environmental origin, respectively, were used in this study. The isolates were identified following morphological criteria (32) and by sequencing several genes. Their *in vitro* susceptibility to AMB and VRC was tested using a broth microdilution method following the CLSI guidelines for filamentous fungi [33].

The isolates were stored at -80°C , and prior to testing they were subcultured on potato dextrose agar (PDA) at 30°C . On the day of infection, cultures on PDA were suspended in sterile saline and 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 (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) with a mean weight of 30 g were used. Animals were housed in standard boxes with corncob bedding and free access to food and water. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee. Two markers of efficacy were used, i.e. prolonging survival and tissue burden reduction. The former was evaluated through a lethal infection, attained by using severe immunosuppression, and the latter through a sublethal infection, attained by using a moderate immunosuppression. Both regimens had been selected in a previous study [30]. Mice were challenged with 1.2×10^8 cfu/mouse for the strain FMR 5522 or 0.6×10^8 cfu/mouse for the strain FMR 8252 [30]. Severe immunosuppression was reached with a dose of cyclophosphamide 200 mg/kg of body weight administered intraperitoneally (i.p) on the day of infection and two doses of 5-fluorouracil, one of 150 mg/kg of body weight intravenously (i.v) on the day of infection and another one of 75 mg/kg on day 5 post-infection. For moderate immunosuppression, the mice received cyclophosphamide 200 mg/kg of body weight administered i.p. plus 5-fluorouracil 150 mg/kg of body weight administered i.v. one day prior to the infection. Animals were challenged with 1.2×10^7 cfu/mouse of the strain FMR 5522 or 0.6×10^7 cfu/mouse of the strain FMR 8252 [30]. Ten mice were used for survival studies

and ten for tissue burden studies, the latter group being identified before the study started.

AMB (Fungizona, Squibb Industria Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain) was administered i.p. a dose of 3 mg/kg of body weight/dose once daily [8]. VRC (Vfend, Pfizer Inc., Madrid, Spain) was administered orally a dose of 60 mg/kg of body weight/dose once daily. From 3 days prior to infection, the mice that received VRC and the control group were given grapefruit juice (Hero, Spain) instead of water to block the VRC metabolism and increase its serum concentration in mice to suitable levels for performing treatment studies [34, 35]. The selected dose of VRC has been shown previously to deliver adequate plasma levels in mice when co-administered with grapefruit juice [36]. Preliminary experiments with the strain FMR 5522 (data not shown) demonstrated that VRC 60 mg/kg/day significantly prolonged the survival of mice in comparison with VRC 40 mg/kg and control group. Survival of mice treated with VRC 40 mg/kg was not different from that of the untreated control group. Therefore, only the higher dose was tested in the study. All mice received ceftazidime (5 mg/day subcutaneously) from days 1 to 10 after infection in order to prevent bacterial infection. All treatments began 24 h after challenge and the therapies lasted for 10 days. Control animals received no treatment. Survival of mice was evaluated daily for 20 days. For tissue burden studies, mice were sacrificed on day 11 post-infection. Livers, spleens, and kidneys were removed aseptically and were homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA and incubated for 24 to 72 h at 30°C. Mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. Colony counts in tissue burden studies were analyzed using the

Mann-Whitney U test. Calculations were made using SPSS 15.0 and Graph pad 4.0 for windows.

3. Results

The minimal inhibitory concentrations (MICs) were 32 $\mu\text{g/ml}$ for AMB, and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for VRC for both strains. Figure 1 shows the results of the survival studies. VRC 60 mg/kg/day significantly prolonged survival with respect to the group treated with AMB and to the control group for both strains. Figure 2 shows that with both strains fungal load was at least two log units higher in spleen and in liver than in kidney. For the strain FMR 8252, VRC 60 mg/kg/day was able to significantly reduce the fungal load with respect to the control group and to the group that received AMB in the three organs. For the strain FMR 5522, VRC 60 mg/kg/day was able to significantly reduce the fungal load with respect to the control group and AMB in spleen and in kidney.

4. Discussion

In this study we investigated the effect of VRC against a *P. lilacinus* infection using the same murine model where previously posaconazole showed efficacy [30]. We also corroborated the low virulence of *P.lilacinus* previously described in an experimental murine model of disseminated infection [37]. In the survival study we used severe immunosuppression to provoke an acute infection with all of the animals dying within 10 days post-infection.

Some data exist on the efficacy of triazoles in human paecilomycosis, especially VRC [26, 31, 38, 39]. Our results agree with these favourable data,

since VRC has been able to reduce the fungal burden in the three organs studied for one strain and in two organs for the other strain.

Our results suggest that VRC may have a clinical role in the treatment of disseminated paecilomycosis.

References

1. Pastor FJ, Guarro J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 948-960.
2. Carey J, D'Amico R, Sutton DA, Rinaldi MG. *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. Emerg Infect Dis 2003; 9: 1155-1158.
3. Castro LGM, Salebian A, Sotto MN. Hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant recipient and a review of human *Paecilomyces* species infections. J Med Vet Mycol 1990; 28: 15-26.
4. Itin PH, Frei R, Lautenschlager S, Buechner SA, Surber C, Gratwohl et al. Cutaneous manifestations of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. J Am Acad Dermatol 1998; 39: 401-409.
5. Gutierrez-Rodero F, Morganon M, Ortiz de la Tabla V, Mayoll MJ, Martin C. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host successfully treated with itraconazole: case report and review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 814–818.
6. Orth B, Frei R, Itin PH et al. Outbreak of invasive mycoses caused by *Paecilomyces lilacinus* from a contaminated skin lotion. Ann Intern Med 1996; 125: 799–806.
7. Minogue MJ, Playfair TJ, Gregory-Roberts JC, Robinson LP. Cure of *Paecilomyces* endophthalmitis with multiple intravitreal injections of amphotericin B. Case report. Arch Ophthalmol 1989; 107: 1281.
8. D'Mellow G, Hirst LW, Whitby M, Nimmo G, Stallard K. Intralenticular infections. Ophthalmology 1991; 98: 1376–1378.

9. Hirst LW, Sebban A, Whitby M, Nimmo G, Stallard K. Non-traumatic mycotic keratitis. *Eye* 1992; 6: 391–395.
10. Domniz Y, Lawless M, Sutton GL, Rogers CM, Meagher LJ. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* endophthalmitis after foreign body trauma to the cornea. *Cornea* 2001; 20: 109–111.
11. O’Sullivan MVN, Withby M, Hirst LW, Apel AJG, Ellis D. Outcome of *Paecilomyces* species ophthalmic infections treated with systemic voriconazole (abstract M-972). In: Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology 2003; 448.
12. Anderson KL, Mitra S, Salouti R, Pham TA, Taylor HR. Fungal keratitis caused by *Paecilomyces lilacinus* associated with a retained intracorneal hair. *Cornea* 2004; 23: 516–521.
13. Okhravi N, Dart JK, Towler HM, Lightman S. *Paecilomyces lilacinus* endophthalmitis with secondary keratitis. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 1320–1324.
14. Pintor E, Martin M, Garcia P, Gonzalez M. Endophthalmitis due to *Paecilomyces lilacinus* after non-surgical penetrating trauma. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 374–378.
15. Hecker MS, Weinberg JM, Bagheri B et al. Cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infection: report of two novel cases. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37: 270–277.
16. Gottlieb T, Atkins BL. Case report. Successful treatment of cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infection with oral itraconazole in an immune competent host. *Mycoses* 2001; 44: 513–515.

17. Hall VC, Goyal S, Davis MDP, Walsh JS. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*: report of three cases and review of the literature. *Int J Dermatol* 2004; 43: 648–653.
18. Itin PH, Frei R, Lautenschlager S et al. Cutaneous manifestations of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 401–409.
19. Yuan X, Wilhelmus KR, Matoba AY, Alexandrakis G, Miller D, Huang AJ. Pathogenesis and outcome of *Paecilomyces* keratitis. 2009. *Am J Ophthalmol* 2009; 147: 691-696.
20. Liu K, Howell DN, Perfect JR, Schell WA. Morphologic criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* species by histopathology. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 45–54.
21. Clark NM. *Paecilomyces lilacinus* infection in a Herat transplant recipient and successful treatment with terbinafine. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1169–1170.
22. Jade KB, Lyons MF, Gnann JW. *Paecilomyces lilacinus* cellulitis in an immunocompromised patient. *Arch Dermatol* 1986; 122: 1169–1170
23. Murciano A, Domer J, Cohen I. *Paecilomyces lilacinus* infection in an immunocompromised patient. *J State Med Soc* 1990; 142: 35–37.
24. Legeais JM, Blanc V, Basset D et al. Severe keratomycosis. Diagnosis and treatment. *J Fr Ophtalmol* 1994; 17: 568–573.
25. Scott IU, Flynn HW, Miller D, Speights JW, Snip RC, Brod RD. Exogenous endophthalmitis caused by amphotericin B-resistant *Paecilomyces*

- lilacinus*: treatment options and visual outcomes. Arch Ophthalmol 2001; 119: 916–919.
26. Martin CA, Roberts S, Greenberg RN. Voriconazole treatment of disseminated *Paecilomyces* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Clin Infect Dis 2002; 35: 78–81.
 27. Aguilar C, Pujol I, Sala J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of *Paecilomyces* species. Antimicrob Agents Chemoter 1998; 42: 1601-1604.
 28. Espinel-Ingroff A. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. J Clin Microbiol 2001; 39: 954-958.
 29. 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: 3776-3781.
 30. Rodríguez MM, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Posaconazole efficacy in a murine disseminated infection caused by *Paecilomyces lilacinus*. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 361-364.
 31. Van Schooneveld T, Freifeld A, Lesiak B, Kalil A, Sutton DA, Iwen PC. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. Transpl Infect Dis 2007; 10: 117-122.
 32. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi, 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, and University Rovira i Virgili, Reus, Spain, 2000.
 33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi:

- approved standard-second edition. Document M38-A2. 2008. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
34. Sugar AM, Liu X. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 601–604.
 35. Graybill JR, Najvar LK, Gonzalez GM, Hernández S, Bocanegra R. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1373-6.
 36. Rodríguez MM, Calvo E, Serena C, Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2153–2155.
 37. Pujol I, Aguilar C, Ortoneda M, Pastor J, Mayayo E, Guarro J. Experimental pathogenicity of three opportunistic *Paecilomyces* species in a murine model. *J Mycol Med* 2002; 12: 1286-1289.
 38. Anderson KL, Mitra S, Salouti R, Pham TA, Taylor HR. Fungal keratitis caused by *Paecilomyces lilacinus* associated with a retained intracorneal hair. *Cornea* 2004; 23: 516-521.
 39. Garbino J, Ondrusova A, Baligvo E, Lew D, Bouchuiguir-Wafa K, Rohner P. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* endophthalmitis with voriconazole. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 701-703.

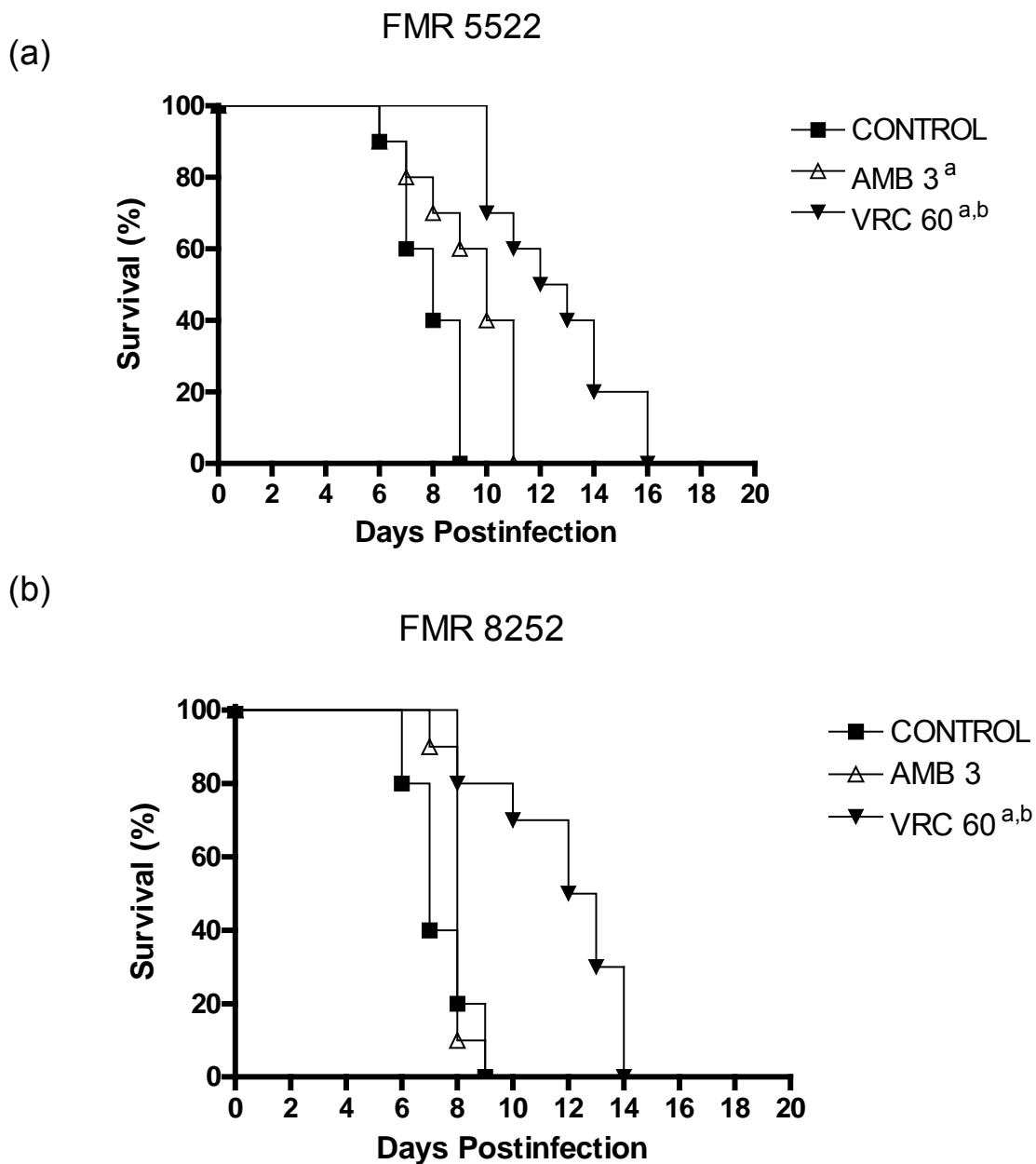


Figure 1. Cumulative mortality of severe immunosuppressed mice infected with 1.2×10^8 cfu/mouse of *P. lilacinus* FMR 5522 (a) or 0.6×10^8 cfu/mouse of *P. lilacinus* FMR 8252 (b). Amphotericin B (AMB) 3 mg/kg/day; voriconazole (VRC) 60 mg/kg/day. ^a, *P* value < 0.05 versus the control; ^b, *P* value < 0.05 versus AMB 3.

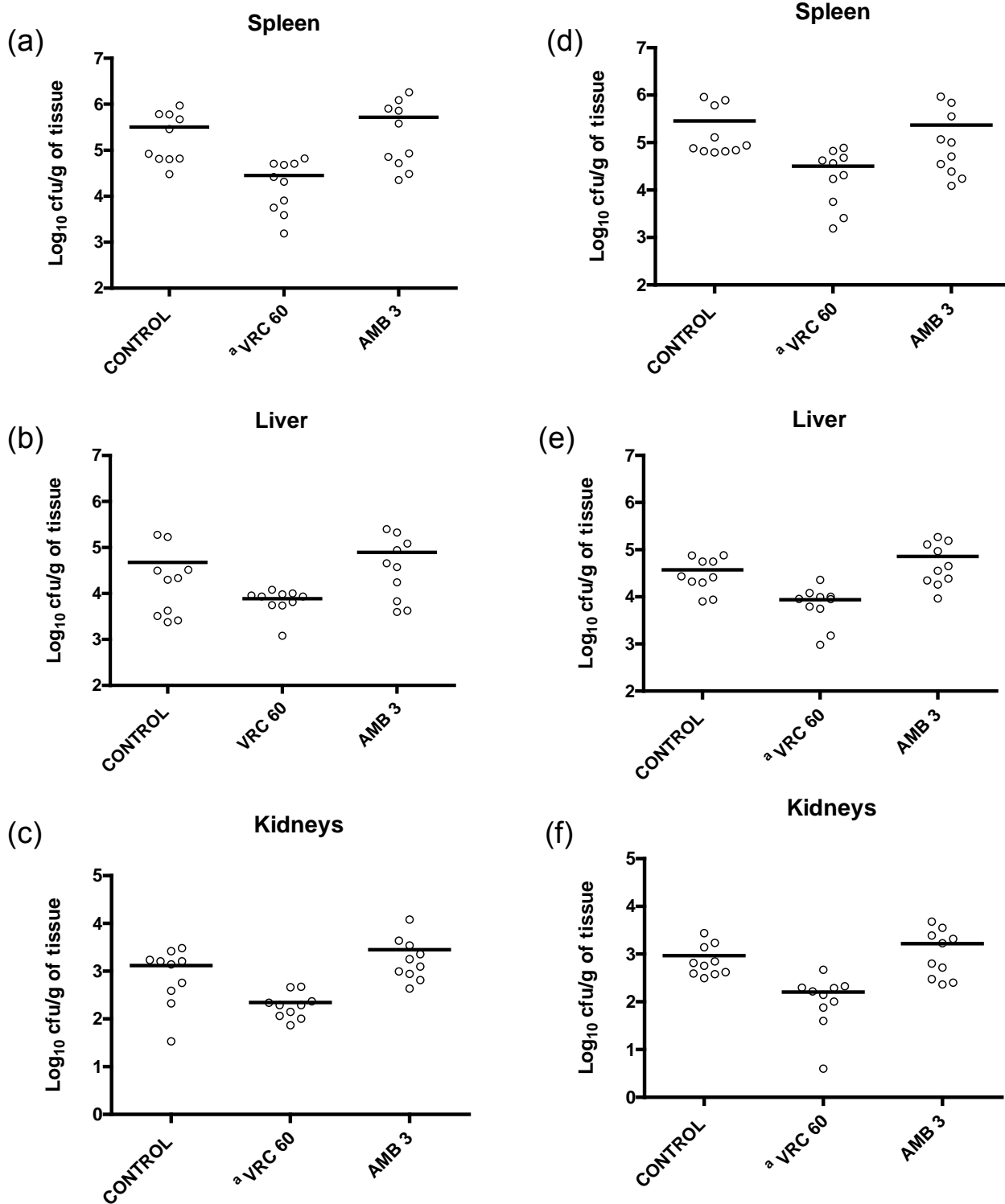


Figure 2. Effects of the antifungal treatment with voriconazole on colony counts of *P.lilacinus* strains FMR 5522 (a, b and c) and FMR 8252 (d, e and f) in the spleens, livers and kidneys of mice. ^a, *P* value < 0.05 versus the control and AMB 3. Horizontal lines indicate mean values.

4.7. Correlación entre la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* del posaconazol frente a una infección causada por *Rhizopus oryzae* en ratón.

Correlation between *in vitro* activity of posaconazole and *in vivo* efficacy against *Rhizopus oryzae* infection in mice.

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

Antimicrobial Agents of Chemotherapy. 2009. En revisión.
AAC 01463-09. Versión 1.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Correlation between in vitro activity of posaconazole and in vivo efficacy against *Rhizopus oryzae* infection in mice

M. Mar Rodríguez¹, F. Javier Pastor¹, Deanna A. Sutton², Enrique Calvo¹,
Annette W. Fothergill², Valentina Salas¹, Michael G. Rinaldi² and Josep
Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV,
Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain¹

Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San
Antonio, Texas²

*** 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**

Abstract

We have evaluated the in vitro activity of posaconazole (PSC) against 50 clinical strains of *Rhizopus oryzae* using a broth microdilution method, the Neo-Sensitabs[®] tablet diffusion method, and the minimal fungicidal concentration (MFC) determination. In general, PSC showed low minimal inhibitory concentrations (MICs) against this fungus, which correlated with inhibition zone diameters. Most of the MFCs, however, were from 1 to 4 dilutions higher than their corresponding MICs. We then investigated the efficacy of several different doses of PSC in a murine model. The drug was administered twice a day against three strains that showed intermediate PSC susceptibility (MIC=2 µg/ml), and against three PSC susceptible strains (MIC=0.25 µg/ml). A dose of 10 mg/kg was ineffective, while doses of 20 and 30 mg/kg prolonged mice survival. The 50 strains tested were segregated into two groups based on their in vitro data. The most numerous group (85 % of the strains), contained isolates with low PSC MICs, showed higher mice survival rates (30-40%), and was able to reduce the fungal load in kidney and less regularly in brain. The second group (15% of the strains), contained isolates with intermediate MICs to PSC, lower mice survival rates (10-20 %), and variable to no reduction in the fungal load in the kidney and brain, respectively.

Introduction

Infections by some fungi of the order Mucorales are highly invasive and potentially fatal and mainly affect patients with diabetes mellitus or hematological malignances (19). In a recent survey on the occurrence of Mucorales in clinical samples in U.S., approximately half of the isolates identified belonged to the species *Rhizopus oryzae* (2). Treatment of Mucorales infections is based on four critical factors; rapid diagnosis, removal of predisposing factors, surgical debridement, and appropriate antifungal therapy, with liposomal amphotericin B (LAMB) being the drug of choice (20). Although PSC has demonstrated to be less effective than LAMB in the treatment of human infection by *R. oryzae*, and is not recommended as primary treatment, this drug is considered a reasonable option for patients who are refractory to or intolerant to polyenes (8, 21). PSC has been tested as salvage therapy in several clinical trials, showing a complete response in 14-37% of the patients (8, 21). However, even in such cases the actual role of this drug is difficult to assess as most of these patients had been previously treated with AMB or their lipid formulations. It is also unknown whether these success rates were related to the patients' immune status and/or other conditions, or to the susceptibility of the strains involved in these infections. Furthermore, in clinical trials where PSC has been evaluated, the fungi involved were not identified to species level thereby making it impossible to know which species of Mucorales responded better to treatment. Based upon the recent study of Alvarez *et al.* (2) demonstrating that *R. oryzae* was the most common organism involved in various forms of zygomycosis, albeit data was restricted to the U.S., it seems likely that this may have been the fungus tested. Considering the low frequency

of this type of infection and the difficulty in obtaining statistically-significant data regarding efficacy of antifungal agents, animal models have proved very useful for this purpose. Previous animal studies evaluating the efficacy of PSC against zygomycetes have included only one or two strains of *R. oryzae* (3, 4, 9, 18). Here, we have tested a panel of 50 clinical isolates of *R. oryzae*, and after determining their in vitro susceptibility to PSC by different methods, have selected a subset of strains with varying degrees of susceptibility to evaluate PSC efficacy in a murine model of infection.

Materials and methods

The strains used in this testing were those that had been well-characterized in our previous study (2). The in vitro antifungal susceptibilities of clinical strains of *R. oryzae* to PSC were determined by evaluating their minimum inhibitory concentrations (MICs in ug/ml), their inhibition zone diameters (IZD in mm), and their minimum fungicidal concentrations (MFC in ug/ml). MICs ($\mu\text{g/ml}$) were determined in a broth microdilution method according to the CLSI guidelines for moulds (13). In the Neo-Sensitabs[®] diffusion method isolates were tested following the guidelines for moulds on Mueller-Hinton agar plates, using 9 mm tablets containing 5 μg of PSC, provided by Rosco[®] Laboratory (6). To determine the MFC, 20 μl of each well from the last positive one (growth similar to that of the growth control well), that showed complete inhibition in the broth microdilution method, were subcultured onto potato dextrose agar (PDA) plates. The plates were incubated at 35°C until growth was seen in the control subculture. The MFC was considered as the lowest drug concentration at which approximately 99.9% of the original inoculum was killed (7). Suggested

MIC ($\mu\text{g/ml}$) and IZD (mm) breakpoints at 24 h for PSC against zygomycetes are as follows: susceptible (S), $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ or ≥ 17 mm; intermediate (I), $2 \mu\text{g/ml}$ or 14 to 16 mm; and resistant (R), $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ or ≤ 13 mm, respectively (5, 13).

For in vivo studies, we chose six of the strains previously tested in vitro; three strains with I susceptibility to PSC (MIC= $2 \mu\text{g/ml}$), i. e. UTHSC 07-365, UTHSC 05-3032 and UTHSC 04-3109, and three PSC S strains (MIC= $0.25 \mu\text{g/ml}$), i. e. UTHSC 02-2882, UTHSC 03-511 and UTHSC 06-89. The isolates were stored at -80°C , and prior to testing they were subcultured on PDA at 35°C . On the day of infection, cultures on PDA were suspended in sterile saline and 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 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 Committee. Animals were immunodepressed one 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 (i.v). Mice were challenged 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 100% of the animals dying within 6-8 days of infection (data not shown).

We tested PSC (Noxafil, Schering Plough Ltd, Hertfordshire, UK) administered at 10, 20 or 30 mg/kg of body weight/dose twice a day orally by gavage (BID). Control animals received no treatment.

The efficacy of the drugs was evaluated through prolongation of survival and fungal tissue burden reduction of infected mice. All treatments began 24 h after challenge, and lasted for 7 days. To prevent bacterial infection, the mice received ceftazidime (5 mg/day subcutaneously) from days 1 to 7 after infection.

For survival studies, groups of 10 mice infected with each of the selected *R. oryzae* strains for each treatment group were randomly established and checked daily for 20 days after challenge. For tissue burden studies, groups of 10 mice were also established, and the animals were sacrificed on day 4 after infection. Kidneys and brains were removed aseptically and gently homogenized in 2 ml sterile saline; care was taken to minimize tissue trauma. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA and incubated for 24 hours at 35°C.

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 Kruskal-Wallis test. When the results of this test were significant, we used the Mann-Whitney U test to compare treatment pairs. The Bonferroni correction was used to avoid an increase in the type I error due to multiple comparisons. When $p < 0.05$, the observed differences were considered statistically significant

Results

Table 1 summarizes the in vitro results for the 50 strains of *R. oryzae* tested. PSC demonstrated significant activity against this fungus, with the majority of the strains showing MICs and IZDs close to the suggested breakpoints indicative of susceptibility i. e., $\leq 1\mu\text{g/ml}$ (86% of the strains) and $\geq 17\text{mm}$ (78% of the strains), respectively. The remainder of the strains showed intermediate susceptibility, with MICs of $2\mu\text{g/ml}$ (14%) and IZDs of 14-16 mm (22%). MICs higher than $2\mu\text{g/ml}$ or zone diameters $\leq 13\text{mm}$ were not seen. In general, MICs did not correlate with MFCs since most of the values of this latter parameter were 1 to 4 dilutions higher than the corresponding MICs.

In vivo results are shown in Figure 1. For all strains, PSC doses of 20 or 30 mg/kg BID, significantly prolonged survival with respect to control group. Moreover, PSC 30 mg/kg also significantly prolonged survival with respect to the lower dose (10 mg/kg BID) for most of the strains tested. The survival rates of mice infected with PSC S strains were from 30% to 40%, while those mice infected with PSC I strains showed a survival rate only from 10% to 20%.

For two of the PSC S strains, UTHSC 02-2882 and UTHSC 06-89, all doses of this drug reduced the fungal load in brain and in kidney respect to the control group; moreover, the highest dose (30 mg/kg) significantly reduced the fungal load in both organs with respect to the lowest dose (10 mg/kg) ($P < 0.08$) (Figure 2). For the third PSC S strain, UTHSC 03-511, only PSC at 30 mg/kg BID significantly reduced the fungal load in kidney respect to the control group.

For two of the PSC I strains, UTHSC 07-365 and UTHSC 04-3109, the three doses of PSC tested significantly reduced the fungal load in kidney, but not in

brain. For the third PSC I strain, UTHSC 05-3032, any dose of PSC was not able to reduce the fungal load either in the brain or in the kidney.

Discussion

In previous animal studies with PSC and *R. oryzae*, several investigators reported either low efficacy in treating mice infected with *R. oryzae* (4, 9, 18) or demonstrated only prophylactic activity (3). In a previous experimental study using the same murine model, we also observed a lack of efficacy of PSC at 40 mg/kg given once a day (18). However, we later demonstrated that PSC administered twice a day was more effective than a once a day regimen in the treatment of the infection caused by a closely-related fungus of the same genus, *R. microsporus* (17). In that study, with the administration of PSC at 20 mg/kg BID we obtained higher PSC serum levels ($>7.5 \mu\text{g/ml}$ at 3 h and $>2\mu\text{g/ml}$ at 24h after last dose) than with a single daily administration of 40 mg/kg ($>5\mu\text{g/ml}$ at 3 h and $\leq 1\mu\text{g/ml}$ at 24h after last dose). Similarly, in this study, we observed a significant correlation between the *in vitro* and *in vivo* results using the twice-a-day dosing regimen. This study demonstrated that clinical isolates of *R. oryzae* are segregated into two groups based upon their *in vitro* susceptibility. The most numerous group (85% of the strains) had low MICs and high IZDs, and mice infected with representative strains from this group and treated with PSC showed higher survival rates (30-40%), and in general, were able to reduce the fungal load in kidney and variably in the brain. The less numerous group (15% of the strains) had intermediate MICs and lower IZDs. When mice were infected with representative strains from this group, PSC showed no efficacy in brain, variable efficacy in kidney, and lower survival rates

(10-20%). It was also demonstrated that results obtained with the tablet diffusion method correlated closely with those of the broth microdilution method. This can be especially useful for the clinical laboratories since the simplicity and low cost of the latter method can be easily implemented the routine workload. While the PSC MICs range was very narrow (0.25 to 2 $\mu\text{g/ml}$), that of the MFCs was considerably broader (0.5 to $>16 \mu\text{g/ml}$). This phenomenon has been previously noted by other investigators in other genera (14). Although the role of the MFCs in determining clinical efficacy needs to be elucidated, some authors suggest that in severely immunosuppressed patients, this parameter is more predictive of clinical outcome (12, 14, 16). The low efficacy of PSC, in our study, against isolates with high MFCs ($\geq 16 \mu\text{g/ml}$) also suggests that high MFCs may be predictors of poorer outcomes. It should also be noted that the tentative breakpoints suggested (5) are indeed only "tentative", and that the interpretive criteria for MICs of 2 $\mu\text{g/ml}$ (now considered intermediate) may change as more clinical correlates become available.

Several studies in febrile patients with neutropenia and/or with invasive fungal infections (10, 11, 20) have shown that when PSC is administered at the recommended dosage of 400 mg orally twice daily, resulting human serum levels are generally $< 1 \mu\text{g/ml}$. This would suggest that PSC at this concentration is only therapeutic against those strains which show low MICs ($< 1 \mu\text{g/ml}$). These data agree with our in vivo results, as PSC was most efficacious against those strains with the lowest MICs.

Several different in vitro studies performed on strains of *R. oryzae* have shown low MICs (1, 12, 15), corroborating our work in which 60% of the isolates had PSC MICs $< 1 \mu\text{g/ml}$. This would suggest the potential utility of PSC in

treating zygomycosis due to *R. oryzae* infection pending in vitro susceptibility data for the infecting isolate. It should also be noted, however, that the susceptibility to PSC is strain dependent, with a significant number of isolates displaying elevated MICs and MFCs.

References

- 1. Almyroudis, N. G., D. A. Sutton, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, and S. Kusne.** 2007. In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2587-2590.
- 2. Alvarez, E., D. A. Sutton, J. Cano, A. W. Fothergill, A. Stchigel, M. G. Rinaldi, and J. Guarro.** 2009. Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1650-1656.
- 3. Barchiesi, F., E. Spreghini, A. Santinelli, A. W. Fothergill, E. Pisa, D. Giannini, M. G. Rinaldi, and G. Scalise.** 2007. Posaconazole prophylaxis in experimental systemic zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 73-77.
- 4. Dannaoui, E., J. F. G. M. Meis, D. Loebenberg, and P. E. Verweij.** 2003. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3647-3650.
- 5. Espinel-Ingroff, A., B. Arthington-Skaggs, N. Iqbal, D. Ellis, M. A. Pfaller, S. Messer, M. Rinaldi, A. Fothergill, D. L. Gibbs, and A. Wang.** 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. Espinel-Ingroff, A., and E. Canton.** 2008. Comparison of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **46**:1793-1803.

- 7. Espinel-Ingroff, A., V. Chaturvedi, A. Fothergill, and M. G. Rinaldi.** 2002. 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.* **40**:3776-3781.
- 8. Greenberg, R. N., K. Mullane, J. A. van Burik, I. Raad, M. J. Abzug, G. Anstead, R. Herbrecht, A. Langston, K. A. Marr, G. Schiller, M. Schuster, J. R. Wingard, C. E. Gonzalez, S. G. Revankar, G. Corcoran, R. J. Kryscio, and R. Hare.** 2006. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:126–133.
- 9. Ibrahim, A. S., T. Gebremariam, J. A. Schwartz, J. E. Edwards Jr., and B. Spellberg.** 2009. Posaconazole mono- or combination therapy for treatment of murine zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:772–775.
- 10. Krishna, G., M. Martinho, P. Chandrasekar, A. J. Ullman, and H. Patino.** 2007. Pharmacokinetics of oral posaconazole in allogenic hematopoietic stem cell transplant recipients with graft-versus-host disease. *Pharmacotherapy* **27**:1627-1636.
- 11. 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**:812–818.
- 12. Lass-Flörl, C., A. Mayr, S. Perkhofer, G. Hintenberger, J. Hausdorfer, C. Speth, and M. Fille.** 2008. Activities of antifungal agents against yeasts and filamentous fungi: assessment according to the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3637-3641.

- 13. National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2008. 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.
- 14. Nguyen, M.H., C. J. Clancy, V. L. Yu, Y. C. Yu, A. J. Morris, D. R. Snyderman, D. A. Sutton, and M. G. Rinaldi.** 1998. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J. Infect. Dis.* **177**:425-430.
- 15. Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. N. Jones.** 2002. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole, compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. And other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1032-1037.
- 16. Rex, J., M. Pfaller, T. Walsh, V. Chaturvedi, A. Espinel-Ingroff, M. Ghannoum, L. Gosey, F. C. Odds, M. Rinaldi, D. Sheehan, and D. Warnock.** 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 643-658.
- 17. Rodríguez, M. M., F. J. Pastor, E. Calvo, V. Salas, D. A. Sutton, and J. Guarro.** 28 Sep 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.* doi:10.1128/AAC.01026-09.
- 18. Rodríguez, M. M., C. Serena, M. Mariné, F. J. Pastor, and J. Guarro.** 2008. Posaconazole combined with amphotericin B, an effective therapy for a

murine disseminated infection caused by *Rhizopus oryzae*. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:3786-3788.

19. Rogers, T. R. 2008. Treatment of zygomycosis: current and new options. J. Antimicrob. Chemother. **61**:35-39.

20. Spellberg, B., T. J. Walsh, D. P. Kontoyiannis, J. E. Edwards Jr., and A. S. Ibrahim. 2009. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. Clin. Infect. Dis. **48**:1743-1751.

21. van Burik, J. A. H., R. S. Hare, H. F. Solomon, M. L. Corrado, and D. P. Kontoyiannis. 2006. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. Clin. Infect. Dis. **42**:61-65.

TABLE 1. In vitro activity of posaconazole against 50 clinical strains of *Rhizopus oryzae* as determined by broth microdilution, disk diffusion, and minimal fungicidal concentration studies.

Isolates of <i>R. oryzae</i>	Posaconazole (24 h)		
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	IZD (mm)	MFC ($\mu\text{g/ml}$)
Susceptible to posaconazole			
UTHSC 03-228	0.25	25	1
UTHSC 06-3913	0.50	20	4
UTHSC 04-278	1	18	>16
UTHSC 06-4133	0.5	23	1
UTHSC 02-2882	0.25	22	0.5
UTHSC 04-443	0.5	22	1
UTHSC 04-1241	0.5	22	0.5
UTHSC 06-89	0.25	23	1
UTHSC 04-1613	0.5	22	0.5
UTHSC 04-2459	1	18	0.5
UTHSC 06-731	0.5	17	0.5
UTHSC 04-2159	0.5	20	1
UTHSC 2868	1	19	8
UTHSC 06-1080	1	18	>16
UTHSC 06-4152	0.25	22	1
UTHSC 06-329	0.5	20	0.5
UTHSC 05-2975	1	20	2
UTHSC 03-1826	0.5	18	0.5
UTHSC 05-1502	0.5	21	1
UTHSC 06-1351	0.25	25	0.5
UTHSC 06-4035	0.5	17	0.5
UTHSC 05-3132	0.5	20	0.5
UTHSC 03-547	0.25	25	0.5
UTHSC 05-197	0.25	21	0.5
UTHSC 02-439	0.25	22	0.5
UTHSC 06-2457	1	14	>16
UTHSC 03-511	0.25	22	1
UTHSC 03-3110	1	17	1
UTHSC 03-2970	1	20	4
UTHSC 05-1817	0.25	25	2
UTHSC 412-546	1	15	8
UTHSC 06-434	1	15	1
UTHSC 06-1301	0.5	25	1
UTHSC 05-3580	0.5	25	1
UTHSC 05-2447	1	17	1
UTHSC 04-1220	0.5	20	1
UTHSC 06-2374	0.5	23	1
UTHSC 03-112	0.5	20	1
UTHSC 06-4336	0.5	20	1
UTHSC 06-3827	1	18	16
UTHSC 03-299	1	15	>16
UTHSC 05-3111	0.25	20	2
UTHSC 05-1679	0.5	18	0.5
Intermediate susceptibility to posaconazole			
UTHSC 03-285	2	14	>16
UTHSC 07-365	2	15	16
UTHSC 03-285	2	15	>16
UTHSC 05-3032	2	14	>16
UTHSC 04-3109	2	14	>16
UTHSC 05-114	2	15	16
UTHSC 03-3165	2	16	16

MIC, minimum inhibitory concentration; IZD, inhibition zone diameter; MFC, minimal fungicidal concentration.

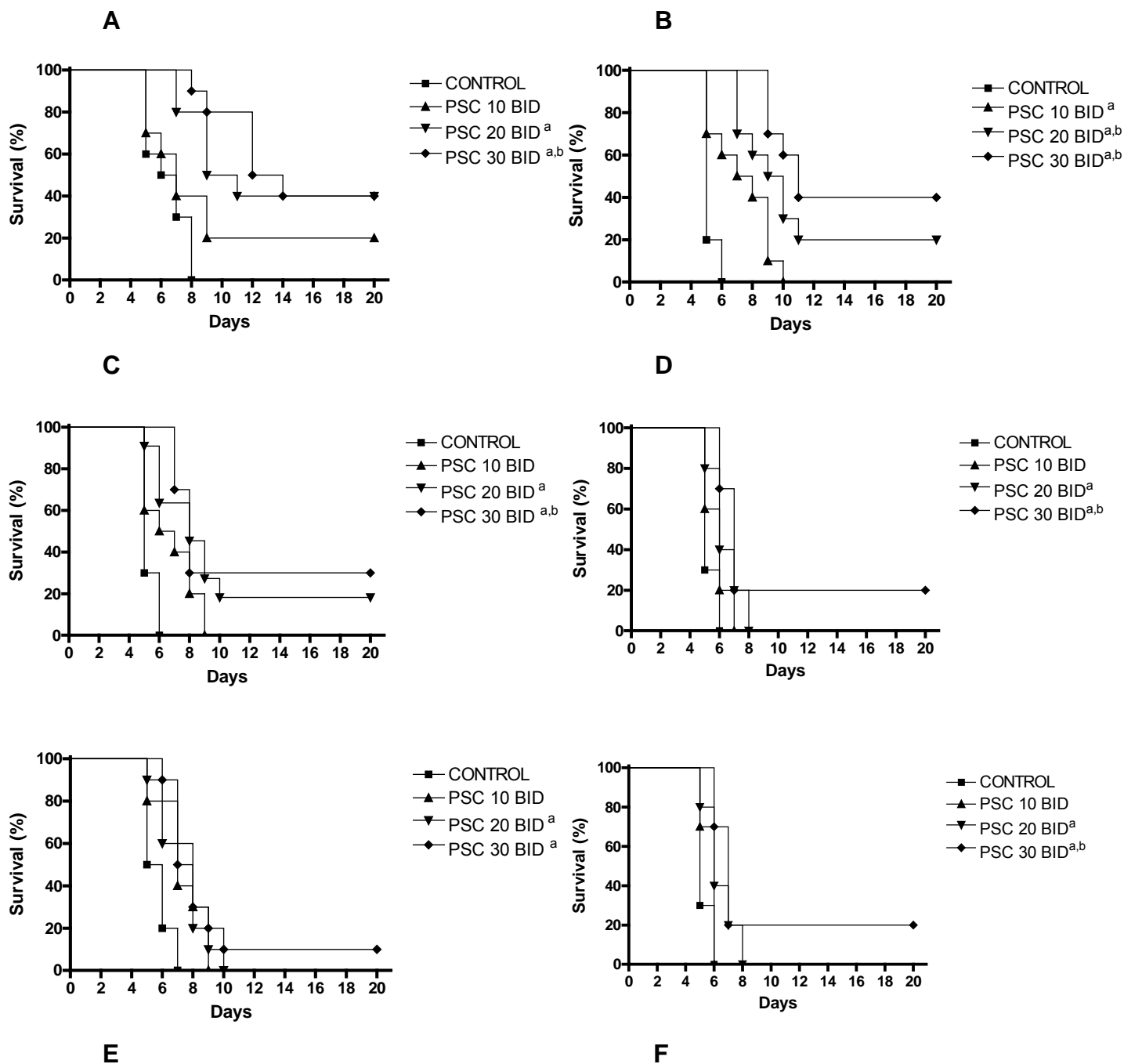


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with *Rhizopus oryzae* UTHSC 02-2882 (A), UTHSC 06-89 (B), UTHSC 03-511(C), UTHSC 07-365 (D), UTHSC 05-3032 (E), and UTHSC 04-3109 (F) and treated with PSC. ^a $P < 0.05$ versus control and ^b $P < 0.05$ versus PSC 10. PSC 10, posaconazole administered at 10 mg/kg p.o. twice a day; PSC 20, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day; PSC 30, posaconazole administered at 30 mg/kg p.o. twice a day.

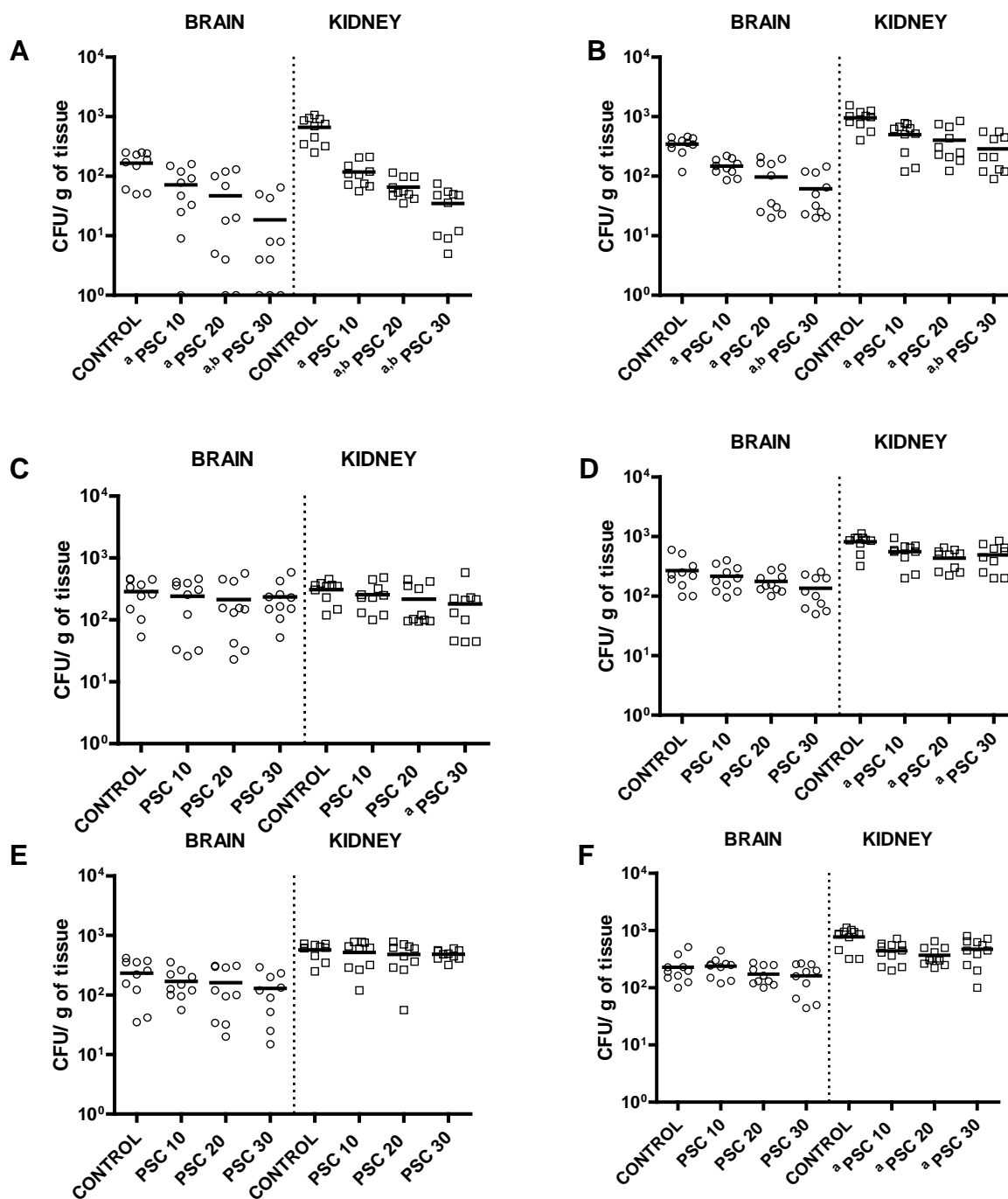


FIG. 2. Effects of the antifungal treatment on colony counts of the *R. oryzae* UTHSC 02-2882 (A), UTHSC 06-89 (B), UTHSC 03-511(C), UTHSC 07-365 (D), UTHSC 05-3032 (E), and UTHSC 04-3109 (F) in brain and kidney of mice. ^a*P* < 0.05 versus control, ^b*P* < 0.05 versus PSC 10. PSC 10, posaconazole administered at 10 mg/kg p.o. twice a day; PSC 20, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day; PSC 30, posaconazole administered at 30 mg/kg p.o. twice a day. Horizontal lines indicate mean values.

4.8. Escedosporiosis experimental en ratón: histopatología y tratamiento con azoles.

Experimental murine scedosporiosis: histopathology and azole treatment.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Salas V, Calvo E, Mayayo E, and Guarro J.

Antimicrobial Agents of Chemotherapy. 2009, Enviado.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Experimental murine scedosporiosis: histopathology and azole treatment

M. Mar Rodríguez¹, F. Javier Pastor¹, Valentina Salas¹, Enrique Calvo¹, Emilio
Mayayo² and Josep Guarro^{1*}

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

²Unitat de Anatomia Patològica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

*** 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**

Abstract

The histopathology of clinical isolates belonging to three *Scedosporium* species of clinical interest: *S. apiospermum*, *S. boydii* and *S. aurantiacum*, was evaluated in immunosuppressed and immunocompetent mice. Different amounts of CFUs of the three species were recovered from in the five organs tested, the highest counts being in brain, kidneys and spleen. Hyphae were observed in kidneys and brains of mice infected with *S. boydii* and *S. aurantiacum*, while tissue infected with *S. apiospermum* only showed inflammatory infiltrates. *S. aurantiacum* produced more tissue damage than the other two species. We compared the efficacy of posaconazole, voriconazole and amphotericin B (AMB) in the treatment of disseminated infections in immunosuppressed mice by the same species. AMB was ineffective and the azoles showed efficacy which correlated with the in vitro susceptibility data.

Introduction

Pseudallescheria boydii sensu lato is a complex of species, some of them being involved in severe human infections, particularly in immunocompromised patients, that have increased in the last few decades (Cortez 08, Guarro 06). The taxonomy of this fungal group has suffered dramatic changes in recent years, several new species being reported (Gilgado 08 "Molecular", Harun 09). The most clinical relevant species of the complex are *Scedosporium boydii* (anamorph of *Pseudallescheria boydii*), *Scedosporium apiospermum* (anamorph of *Pseudallescheria apiosperma*) and *Scedosporium aurantiacum* (Gilgado 09, Harun 09), but the real incidence of these species in human infections and their clinical significance is just starting to be explored.

Despite aggressive therapy, invasive scedosporiosis shows a high mortality, emphasizing the critical need for new therapeutic strategies (Cortez 08, Guarro 06). Most of the available antifungal susceptibility data refer to obsolete species names and only scarce data exist on the antifungal response of the current species (Gilgado 06). Amphotericin B (AMB) has demonstrated in general poor in vitro and in vivo activity against the fungi causing scedosporiosis (Espinel-Ingroff 08, Cuenca-Estrella 08, Guarro 06, Capilla 04 "AMB", Capilla 03, Kowacs 06). The two new triazoles, voriconazole (VRC) and posaconazole (PSC), are active in vitro (Espinel-Ingroff 08, Cuenca Exstrella 08, Guarro 06) and has shown efficacy in animal models against members of *Pseudallescheria boydii* complex (Capilla 03, Capilla 04, Gonzalez 03). Some efficacy of these triazoles in the treatment of scedosporiosis has also been reported in clinical trials and case reports (Apostolova 05, Porte 06, Husain 05, Troke 08, Mellingroff 02).

The virulence of the new species of *P. boydii* complex has been evaluated by survival studies in murine models (Gilgado 09), but is unknown if there are differences among the current species in their ability to invade the different organs of mice and to produce tissue damage. In the present study we have compared the ability of three species of clinical interest of the *P. boydii* complex, i. e. *S. apiospermum*, *S. boydii* and *S. aurantiacum*, for organ invasion and to cause tissue lesions and evaluated the efficacy of the azoles, PSC and VRC, in murine disseminated infection by this same species.

Materials and methods

A total of six strains, two representing each of the following species; *S. boydii* (*P. boydii*), *S. apiospermum* (*P. apiospermum*) and *S. aurantiacum* were included in the study (Table 1). Their in vitro antifungal susceptibilities to AMB, VRC and PSC were determined by a broth microdilution method according to the CLSI guidelines for moulds (NCCLS 08).

Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., 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 care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee.

Mice were immunosuppressed by a single intraperitoneally (i.p.) injection of 200 mg/kg of body weight of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk S.A., Barcelona, Spain) plus 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma S.A., Barcelona, Spain) at 150 mg/kg of body weight intravenously one day prior to

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

The isolates were stored at -80°C , and prior to testing they were subcultured on potato dextrose agar (PDA) for 7-10 days at 30°C . The inocula were prepared by flooding the surface of the agar plate with sterile saline, scraping the sporulating mycelium with a culture loop. The suspensions were then filtered once through sterile gauze to remove hyphae and adjusted to the desired inoculum size through the use of a hemocytometer. The inocula concentrations were verified by plating dilutions of the suspensions on PDA plates.

Histopathology

We used both immunosuppressed and immunocompetent animals in experimental models of disseminated scedosporiosis previously developed in our laboratory (Gilgado 08). Two different inocula were tested for each strain, i.e. 1×10^4 CFU (low inoculum) for immunosuppressed animals and 2×10^5 CFU (high inoculum) for immunocompetent animals (Gilgado 09) in 0.2 ml of sterile normal saline injected via a lateral tail vein. Groups of 10 animals were randomly established for each inoculum and each strain and were sacrificed on day 4 post-infection. Lungs, brain, spleen, liver 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 plated on PDA, incubated at 30°C and examined daily for 7 days. The numbers of CFU/g of tissue were calculated. For the histopathological study, half of each organ was fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin embedded and sliced into $2\ \mu\text{m}$ sections which were stained with haematoxylin-

eosin (H-E), periodic acid Schiff (P.A.S) or Grocott methamine silver and examined blind by light microscopy.

Treatment studies

We used the immunosuppressed mice infected with the low inoculum (1×10^4 CFU/mice), which was able to produce an acute infection in all the strains tested, with 100% of the animals dying within 6 to 10 days of infection.

The drugs assayed were: AMB (Fungizone, Squibb Industrial Farmacéutica S. A., Barcelona, Spain) administered at 1.5 mg/kg/day i.p.; PSC (Noxafil, Schering-Plough Ltd., Hertfordshire U.K.) administered at 10 or 20 mg/kg twice a day orally; and VRC (V-Fend, Pfizer Inc., Madrid, Spain) administered at 20 or 40 mg/kg/day orally. From 3 days prior to infection, the mice that received VRC and the control group were given grapefruit juice (Hero, Spain) instead of water to blocks the VRC metabolism and increases its serum concentration in mice to suitable levels for performing treatment studies (Graybill 03, Sugar 01). Control animals received no treatment. All treatments began 24 h after challenge, and lasted for 10 days. For survival studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain and each treatment and checked daily for 20 days after challenge. For tissue burden studies, groups of 10 mice were also established, and the animals were sacrificed on day 4 after infection. Kidneys and brain were removed aseptically and gently 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.

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

test was significant, we used the Man-Whitney U test to compare pairs of strains. The Bonferroni correction was used to avoid the increase of the type I error due to multiple comparisons. When $p < 0.05$, the observed differences were statistically declared significant.

Results

The in vitro results are shown in the table 2. AMB was not active against any of the isolates tested. VRC and PSC, showed good in vitro activity against most of the strains tested with the exception of one strain of *S. aurantiacum* that was resistant to these drugs.

Histopathology

Fungi were present in all organs tested in both immunocompetent and immunosuppressed mice. The three species tested showed marked brain tropism, being this organ the most affected, followed by kidney, spleen, liver and lung. Histopathological studies revealed, only in brain and kidney of mice infected with *S. boydii* and *S. aurantiacum*, focal infiltration by hyphae in blood vessels and in parenchyma without inflammatory response. In mice infected with *S. apiospermum*, abscesses in the brain parenchyma and in the kidney with abundant inflammatory cells without presence of hyphae were observed. *S. aurantiacum* produced more cellular necrosis than the other two species tested.

Treatment study

The effects of the different treatments on mice survival are shown in Figure 3. AMB was not able to improve the survival respect to the control group for any species tested. By contrast, all the doses of PSC and VRC tested prolonged survival respect to the control group in all cases. The highest doses of the two

azoles (40 mg/kg) showed the highest and similar efficacy. VRC showed a dose-response efficacy. The strain *S. aurantiacum* CBS116910 was that worse responded to treatment (90% and 100% of mortality of mice treated with the highest doses of VRC and PSC, respectively). For this strain precisely PSC and VRC showed the highest MICs (32 µg/ml). The effects of the different treatments on tissue burden reduction are shown in Figure 4. In all the cases AMB was also here ineffective in reducing fungal load. VRC at 40 mg/kg and PSC at 40 mg/kg were able to reduce tissue burden in all the cases with the exception of the strain *S. aurantiacum* CBS116910 where VRC only reduced fungal load in kidney and PSC in none of both organs tested. In general, PSC at 20 mg/kg and VRC at 20 mg/kg showed similar results, being only able to reduce the fungal load respect to the control group in both organs for both strains of *S. boydii* and for *S. apiospermum* IHEM 14464 tested, with the exception of PSC in kidney for *S. boydii* FMR 6694.

Discussion

The true clinical role of the current *Scedosporium* spp. is still unknown. Some of these species have just been recently discovered and their particular clinical incidence and if there are important differences in the type of infection that they provoke is poorly known. Recently, it was evaluated in a murine model the mortality rate caused by the species of the complex (Gilgado 09). Three of the species investigated, the same than in this study, caused a mortality of 100 % in neutropenic mice. In immunocompetent mice, only 20% of mice infected by *S. boydii* or *S. apiospermum* died, while *S. aurantiacum* caused the death of 80 % of the immunocompetent mice (Gilgado 09). Our studies confirmed the higher virulence of *S. aurantiacum*. Although we did not observe significant differences

among the species in tissue burden reduction, histological results indicated that *S. aurantiacum* was the species that produced more tissue damage. The mortality rates of untreated control groups obtained in the present study agree with previous data reported by Gilgado *et al.* (Gilgado 09) in their virulence study demonstrating the reproducibility of this murine model.

In this study the lack of *in vivo* efficacy of AMB against these species agrees with previous experimental and clinical studies (Capilla 04 “AMB”, Capilla 03, Gonzalez 03, Porte 06, Troke 08, Mellingroff 02). In general, the results obtained with mice correlated with *in vitro* data, since VRC and PSC, which displayed good *in vitro* activity, showed efficacy in prolonging survival and in reducing tissue burden for *S. apiospermum* and *S. boydii*. In the case of *S. aurantiacum*, VRC and PSC at high doses were more effective in prolonging the survival and reducing the fungal load in brain and kidney in mice challenged with the strain that showed lower MICs, than in those infected with the strain that had higher MICs. These results suggest that the determination of VRC and PSC MICs of clinical strains of *S. aurantiacum* could be useful to assess the possible outcome of the infection.

The different pathological behavior of the species of the complex together with the antifungal susceptibility results demonstrated that infections caused by *S. aurantiacum* could be most severe and difficult to treat than those caused by other species of the complex. The high virulence and the *in vitro* resistance of this species are probably more similar to *S. prolificans*, another emerging *Scedosporium* species highly aggressive and resistant to conventional antifungal drugs (Cortez 08), than the other species of the complex.

The in vivo data from this study suggest that VRC and PSC may have a clinical role in the treatment of disseminated scedosporiosis caused by *S. boydii*, *S. apiospermum* and also by strains of *S. aurantiacum* with low VRC and PSC MICs.

References

1. **Alastruey-Izquierdo, A., M. Cuenca-Estrella, A. Monzón, and J. L. Rodríguez-Tudela.** 2007. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical molds isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:748-751.
2. **Apostolova, L. G., E. K. Johnson, and H. P. Adams Jr.** 2005. Disseminated *Pseudallescheria boydii* infection successfully treated with voriconazole. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **76**:1741-1742.
3. **Capilla, J., and J. Guarro.** 2004. Correlation between in vitro susceptibility of *Scedosporium apiospermum* to voriconazole and in vivo outcome of scedosporiosis in guinea pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 4009-4011.
4. **Capilla, J., E. Mayayo, C. Serena, F. J. Pastor, and J. Guarro.** 2004. A novel murine model of cerebral scedosporiosis: lack of efficacy of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 1092-1095.
5. **Capilla, J., C. Serena, F. J. Pastor, M. Ortoneda, and J. Guarro.** 2003. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3976-3978.
6. **Cortez, K. J., E. Roilides, F. Quiroz-Telles, J. Meletiadis, C. Antachopoulos, T. Knudsen, W. Buchanan, J. Milanovich, D. A. Sutton, A. Fothergill, M. G. Rinaldi, Y. R. Shea, T. Zaoutis, S. Kottlil, and T. J. Walsh.** 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**: 157-197.
7. **Cuenca-Estrella, M., A. Alastruey-Izquierdo, L. Alcazar-Fuoli, L. Bernal-Martinez, A. Gomez-Lopez, M. J. Buitrago, E. Mellado, and J. L. Rodriguez-Tudela.** 2008. In vitro activities of 35 double combinations of antifungal agents

against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans*. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:1136-1139.

8. Espinel-Ingroff, A., E. Johnson, H. Hockey, and P. Troke. 2008. Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in vitro against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies. J. Antimicrob. Chemother. **61**: 616-620.

9. Graybill, J. R., L. K. Najvar, G.M. Gonzalez, S. Hernandez, and R. Bocanegra. 2003. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. J. Antimicrob. Chemother. **51**: 1373-1376.

10. Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, C. Serena, and J. Guarro. 2009. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Med. Mycol. **47**: 371-374.

11. Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, D. A. Sutton, and J. Guarro. 2008. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehogii*. J. Clin. Microbiol. **46**: 766-771.

12. Gilgado, F., C. Serena, J. Cano, J. Gené, and J. Guarro. 2006. Antifungal susceptibilities of the species of *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:4211-4213.

13. Gonzalez, G. M., R. Tijerina, L. K. Najvar, R. Bocanegra, M. G. Rinaldi, D. Loebenberg, and J. R. Graybill. 2003. Activity of posaconazole against *Pseudallescheria boydii*: in vitro and in vivo assays. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:1436-1438.

14. Guarro, J., A. S. Kantarcioglu, R. Horr , J. L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, J. Berenguer, and G. S. de Hoog. 2006. *Scedosporium*

apiospermum: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. Med. Mycol. **44**:295-327.

15. Harun, A., H. Perdomo, F. Gilgado, S. C. Chen, J. Cano, J. Guarro and W. Meyer. 2009. Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches. Med. Mycol. **47**:406-414.

16. Husain, S., P. Muñoz, G. Forrest, B. D. Alexander, J. Somani, K. Brennan, M. M. Wagener, and N. Singh. 2005. Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. Clin. Infect. Dis. **40**:89-99.

17. Kowacs, P. A., C. E. Soares-Silvado, S. Monteiro, M. Ramos, K. Abrao, L. E. Madaloso, R. L. Pinheiro, and L. C. Werneck. 2004. Infection of the CNS by *Scedosporium apiospermum* after near drowning. Report of a fatal case and analysis of its confounding factors. J. Clin. Pathol. **57**: 205-207.

18. Mellinghoff, I. K., D. J. Winston, G. Mukwaya, and G. J. Schiller. 2002. Treatment of *Scedosporium apiospermum* brain abscesses with posaconazole. Clin. Infect. Dis. **34**:1648-1650.

19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2008. 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.

20. Porte, L., S. Khatibi, L. El Hajj, S. Cassaing, A. Berry, P. Massip, M. D. Linas, J. F. Magnaval, N. Sans, and B. Marchou. 2006. *Scedosporium apiospermum* mycetoma with bone involvement successfully treated with voriconazole. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **100**:891-894.

- 21. Sugar, A. M., and X. Liu.** 2001. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:601–604.
- 22. Troke, P., K. Aguirrebengoa, C. Arteaga, D. Ellis, C. H. Heath, I. Lutsar, M. Rovira, Q. Nguyen, M. Slavin, and S. C. Chen on behalf of the Global Scedosporium Study Group.** 2008. Treatment of scedosporiosis with voriconazole: clinical experience with 107 patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1743–1750.

Table 1. Strains of *P. boydii* complex included in the study.

Strain	Species	Origin
FMR 6694	<i>S. boydii</i>	Cerebral abscess, Barcelona Spain
FMR 8627	<i>S. boydii</i>	Clinical, Madrid, Spain
CBS 117407	<i>S. apiospermum</i>	Keratitis, Sao Paulo, Brazil
IHEM 14464	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis, Tours, France
CBS 116910	<i>S. aurantiacum</i>	Ankle ulcer, Santiago de Compostela, Spain
IHEM 15458	<i>S. aurantiacum</i>	Cystic fibrosis, Giens, Francia

Table 2. In vitro antifungal activities of AMB, VRC and PSC against two strains of *S. boydii*, *S. apiospermum* and *S. aurantiacum*.

Species	Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		AMB	VRC	PSC
<i>S. boydii</i>	FMR 6694	32	1	1
	FMR 8627	8	0.5	1
<i>S. apiospermum</i>	CBS 117407	8	0.5	1
	IHEM 14464	32	0.25	0.5
<i>S. aurantiacum</i>	CBS 116910	32	32	32
	IHEM 15458	32	1	2

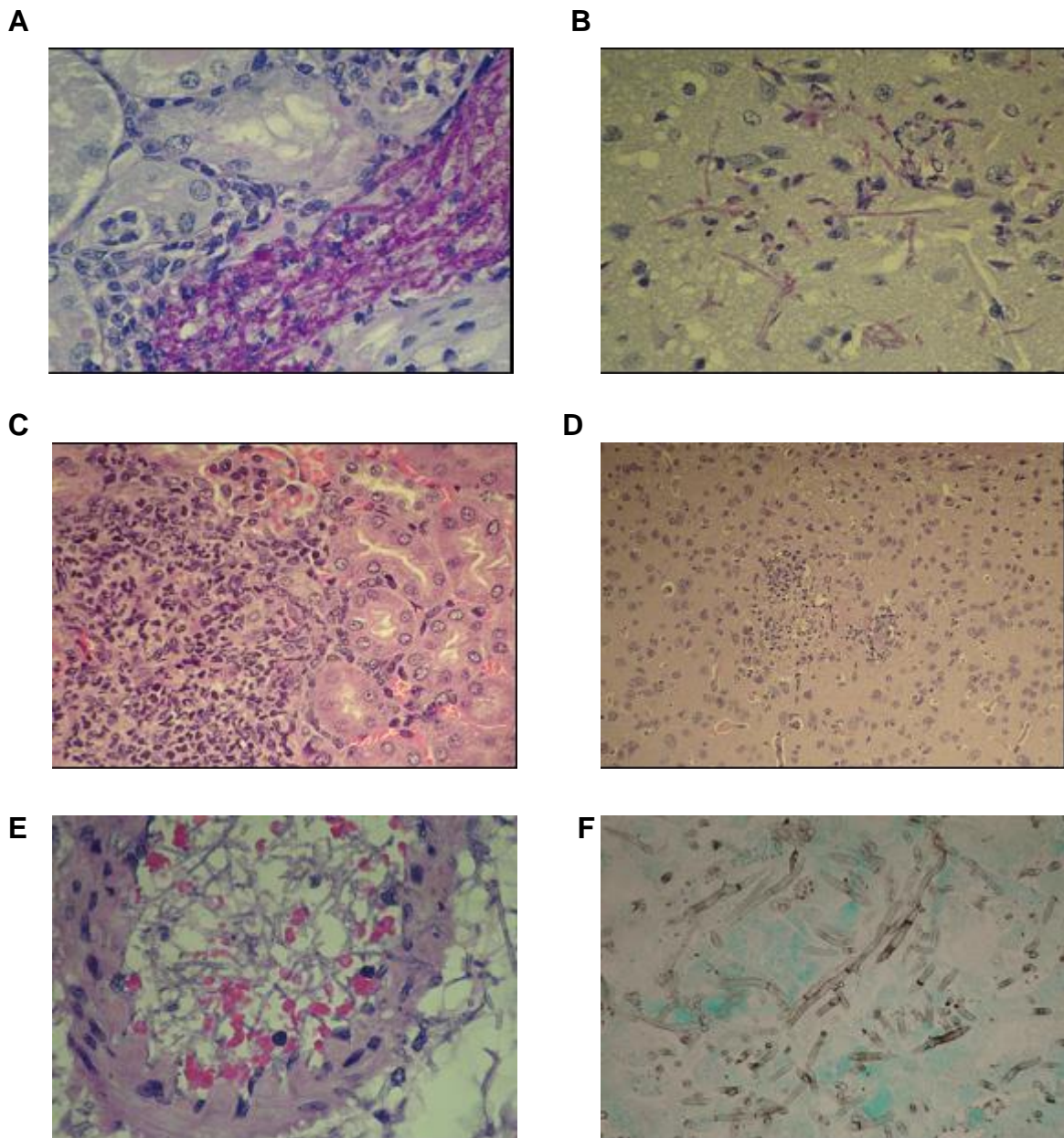


FIG. 1. Histopathological findings of *S. boydii* (A, B), *S. apiospermum* (C,D) and *S. aurantiacum* (E, F) in mice. (A) Fungal infiltration with abundant presence of hyphae in the kidney. PAS. Magnification, x400. (B) Brain section with hyphae invasion without necrosis or inflammatory response. PAS. Magnification, x400. (C) Kidney showing an abscess with abundant inflammatory cells. H-E. Magnification, x100. (D) Microabscess in the brain parenchyma. Hematoxilin and eosin stain. Magnification, x100. (E) Abundant presence of septate hyphae in tissue of kidney. Grocott stain. Magnification, x400. (F) Brain section showing hyphae invading a blood vessel lumen. PAS. Magnification, x400.

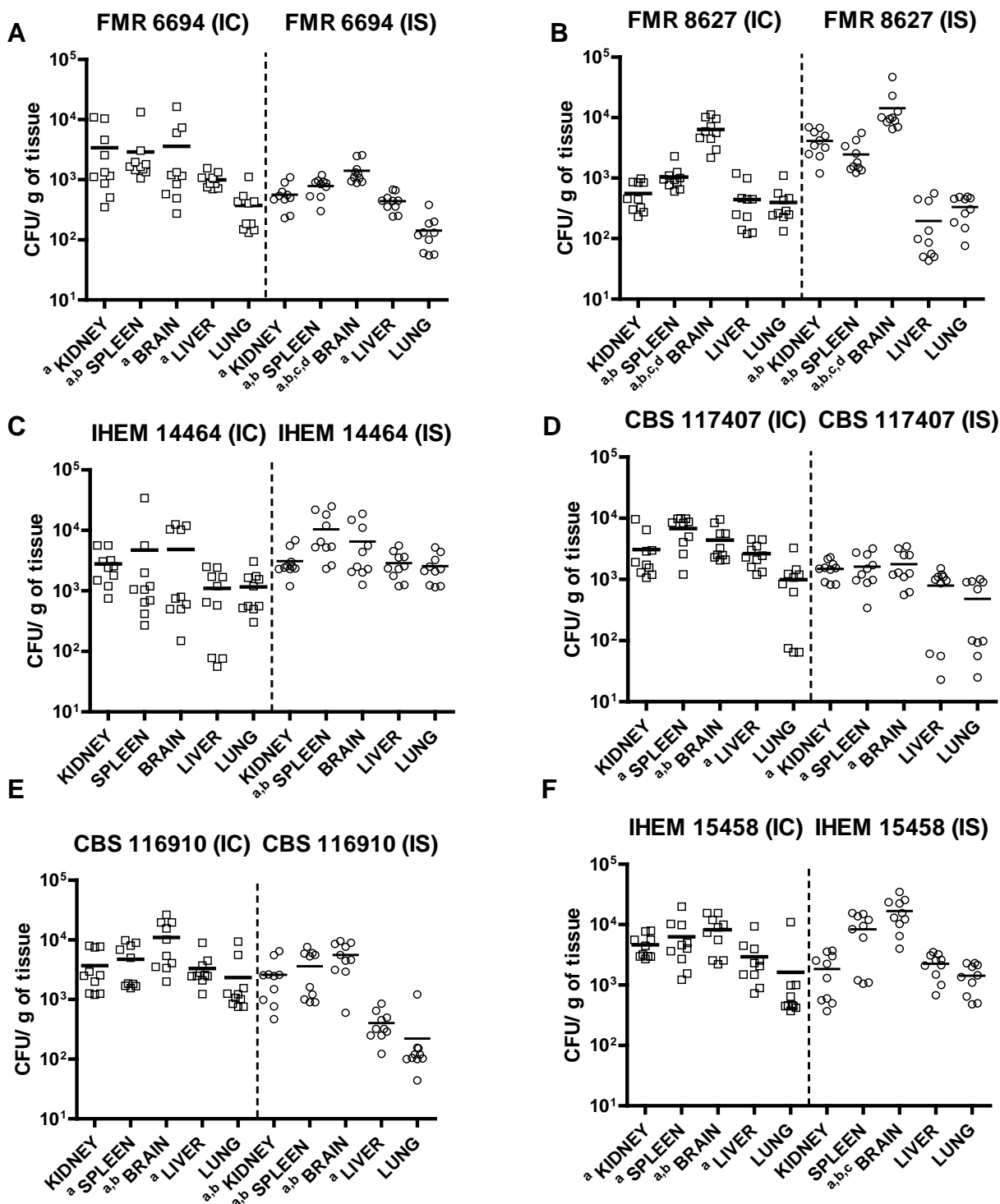


FIG. 2. Colony comparison among different organs in immunocompetents or immunosuppressed mice infected by *S. boydii* FMR 6694 (A) and FMR 8627 (B), *S. apiospermum* IHEM 14464 (C) and CBS 117407 (D) and *S. aurantiacum* CBS 116910 (E) and IHEM 15458 (F). ^a*P* < 0.005 versus lung, ^b*P* < 0.005 versus liver, ^c*P* < 0.05 versus kidney and ^d*P* < 0.05 versus spleen. Horizontal lines indicate mean values.

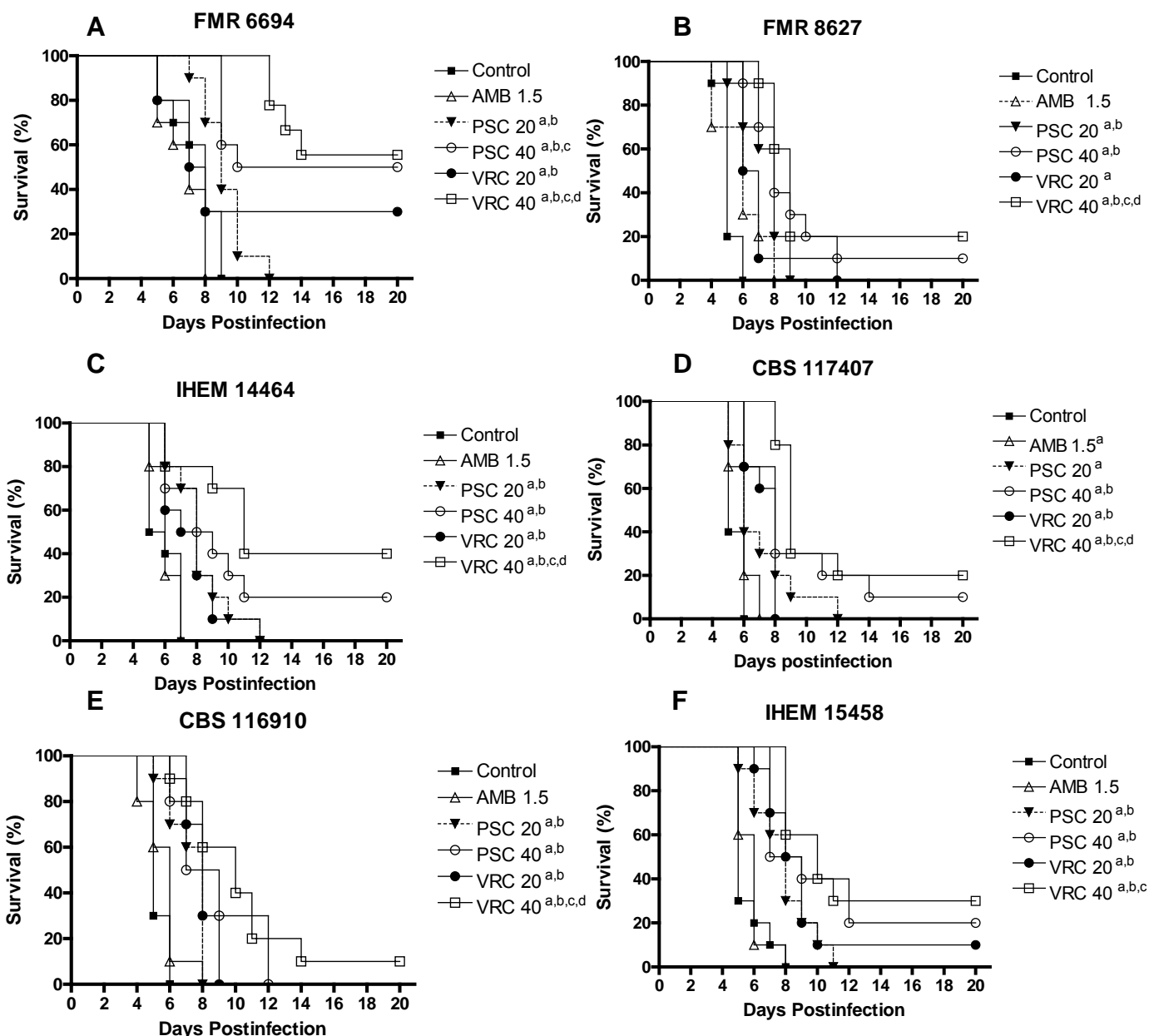


FIG. 3. Cumulative mortality of mice infected with *S. boydii* FMR 6694 (A) and FMR 8627 (B), *S. apiospermum* IHEM 14464 (C) and CBS 117407 (D) and *S. aurantiacum* CBS 116910 (E) and IHEM 15458 (F). Mice were treated with AMB, PSC and VRC. ^a $P < 0.05$ versus control, ^b $P < 0.05$ versus AMB 1.5, ^c $P < 0.05$ versus PSC 20, ^d $P < 0.05$ versus VRC 20. AMB 1.5, amphotericin B administered at 1.5 mg/kg/day i.p.; PSC 20, posaconazole administered at 10 mg/kg p.o. twice a day; PSC 40, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day; VRC 20, voriconazole administered at 20 mg/kg/day p.o.; VRC 40, voriconazole administered at 40 mg/kg/day p.o.

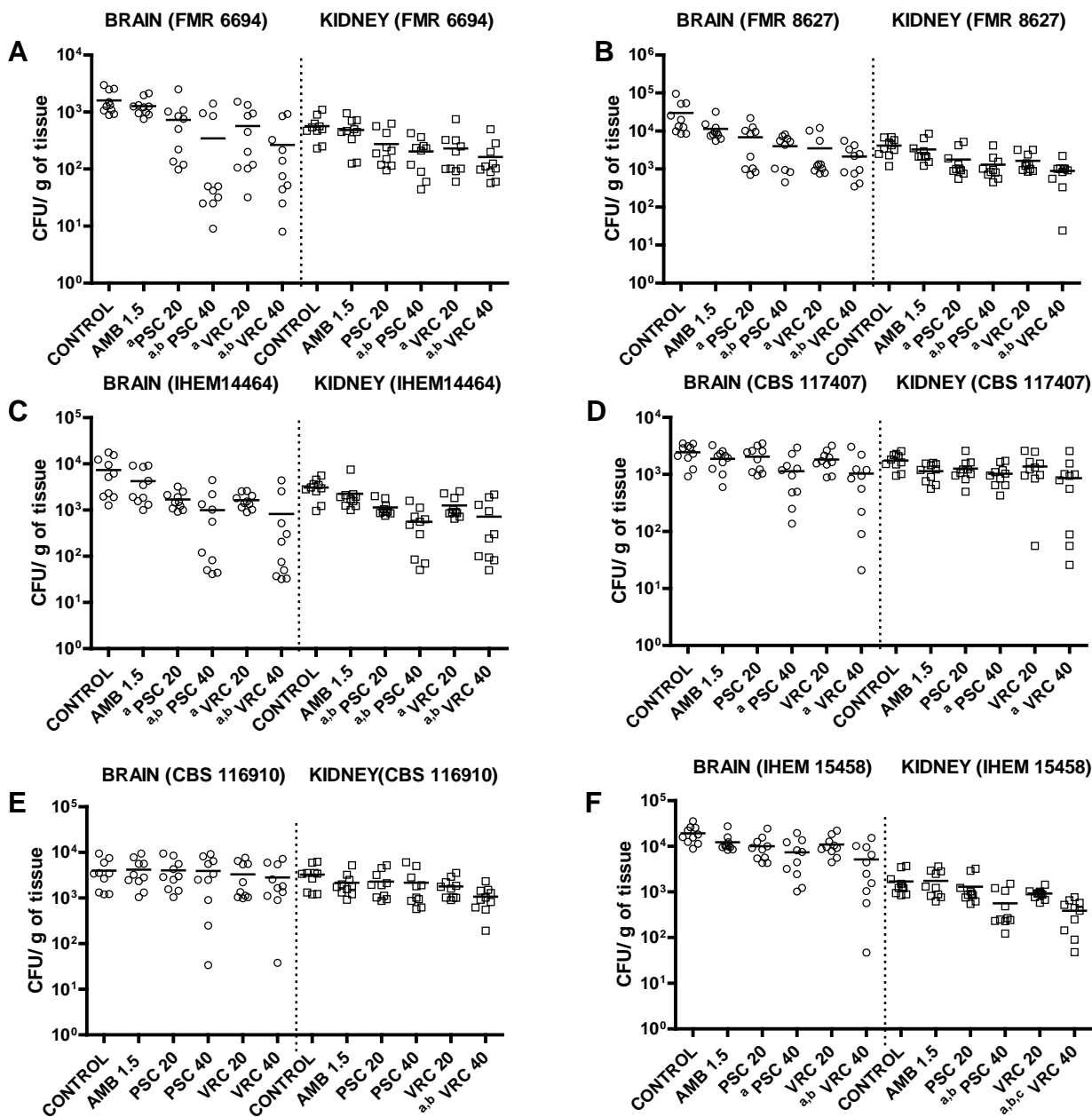


FIG. 4. Effects of the antifungal treatment on colony counts of the *S. boydii* FMR 6694 (A) and FMR 8627 (B), *S. apiospermum* IHEM 14464 (C) and CBS 117407 (D) and *S. aurantiacum* CBS 116910 (E) and IHEM 15458 (F) in brain and kidney of mice. ^aP < 0.05 versus control, ^bP < 0.05 versus AMB, ^cP < 0.05 versus PSC 20 and ^dP < 0.05 versus VRC 20. AMB 1.5, amphotericin B administered at 1.5 mg/kg/day i.p.; PSC 20, posaconazole administered at 10 mg/kg p.o. twice a day; PSC 40, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day; VRC 20, voriconazole administered at 20 mg/kg/day p.o.; VRC 40, voriconazole administered at 40 mg/kg/day p.o. Horizontal lines indicate mean values.

Discusión

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

5. Discusión

5.1. Zigomicosis

La incidencia de las zigomicosis ha aumentado notablemente en los últimos años. *R. oryzae* seguido de *R. microsporus* son los principales agentes causantes de estas micosis (Alvarez *et al.*, 2009; Gené y Guarro, 2008; Chayakulkeeree *et al.*, 2006; Roden *et al.*, 2005). A pesar del tratamiento quirúrgico agresivo y de la terapia antifúngica la tasa de mortalidad asociada a las zigomicosis continúa siendo superior al 40%, llegando a ser del 65% en pacientes hematológicos y del 90% en receptores de trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas (Spellberg *et al.*, 2009; Greenberg *et al.*, 2006; Torres-Narbona *et al.*, 2007; Salavert y Pemán, 2009). Por tanto, existe la necesidad de mejorar el tratamiento actual de estas infecciones mediante la investigación en el laboratorio y en la clínica de nuevas estrategias terapéuticas.

Tradicionalmente, la anfotericina B convencional (AMB) ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de las zigomicosis invasoras, aunque su uso está limitado por su toxicidad. Actualmente, su formulación liposomal, significativamente menos tóxica aunque de un elevado coste económico, se ha consolidado como el antifúngico de elección en el tratamiento de estas infecciones (van Burik *et al.*, 2006; Torres-Narbona *et al.*, 2007; Rogers, 2008; Spellberg *et al.*, 2009; Salavert y Pemán, 2009). Los azoles no son activos sobre estos hongos a excepción del posaconazol, frente al cual *R. oryzae* y *R. microsporus* suelen tener una buena respuesta *in vitro* (Spellberg *et al.*, 2009; Almyroudis *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2002). Este antifúngico ha sido utilizado con éxito en algunos casos clínicos aislados (Greenberg *et al.*, 2006; van Burik *et al.*, 2006), pero, lamentablemente, en la mayoría de los casos de zigomicosis publicados, no consta la identificación del agente causal a nivel de especie, lo que limita enormemente el valor de estos estudios. A nivel experimental el posaconazol sólo ha mostrado actividad profiláctica frente a *R. oryzae* (Barchiesi *et al.*, 2007), siendo inefectivo en el tratamiento de los ratones

infectados con este hongo (Dannaoui *et al.*, 2003). Dada la escasez de datos clínicos y la divergencia entre los datos experimentales *in vitro* e *in vivo* existentes sobre el posaconazol, junto a la ya citada toxicidad de la anfotericina B, nos propusimos estudiar la posibilidad de que el uso combinado de estos dos fármacos, con mecanismos de acción diferentes y con actividad *in vitro* probada frente a *Rhizopus* spp., actuara sinérgicamente en una infección diseminada causada por *R. oryzae* en ratones neutropénicos. Aunque esta combinación no ha sido estudiada previamente en modelos animales sí fue utilizada con éxito en un caso clínico de zigomicosis (Rickerts *et al.*, 2006). La combinación de la anfotericina B con el posaconazol resultó ser sinérgica *in vitro* frente a una de las cepas estudiadas, comportándose de modo indiferente frente a la otra cepa. Las monoterapias con posaconazol y con la dosis baja de anfotericina B (0.3 mg/kg/d) fueron ineficaces; en cambio ambas combinaciones y la monoterapia con la dosis más alta de anfotericina B (0.8 mg/kg/d) fueron efectivas frente a la infección diseminada en ratón causada por *R. oryzae*. En concordancia con otros estudios previamente publicados, la anfotericina B fue eficaz en el tratamiento de la infección causada por *R. oryzae* en el ratón (Dannaoui *et al.*, 2003; Sugar y Liu, 2000). Un estudio posterior al nuestro (Ibrahim *et al.*, 2009), demostró la eficacia del tratamiento combinado con posaconazol y anfotericina B liposomal a dosis altas en la zigomicosis experimental causada por *R. oryzae* en el ratón, si bien de acuerdo con nuestro estudio los resultados con la combinación no fueron mejores que los obtenidos con la monoterapia con anfotericina B liposomal. Aunque la eficacia de las combinaciones estudiadas para el tratamiento de la zigomicosis en ratón no fue superior a la eficacia de la anfotericina B, administrada en monoterapia a dosis elevadas, nuestro estudio puso de manifiesto la posibilidad de reducir la dosis de la anfotericina B administrada en combinación con el posaconazol, y por tanto reducir la toxicidad global del antifúngico. Los resultados de este estudio se publicaron en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52:3786-3788.

Los estudios acerca de la farmacodinamia del posaconazol en humanos demuestran que la dosis diaria debe repartirse en dos o tres tomas para optimizar su absorción (Krishna *et al.*, 2009). Sin embargo, en la mayoría de

estudios experimentales sobre la eficacia del posaconazol, previos al inicio de nuestra investigación, éste se administró en una única dosis diaria. Existen escasos datos experimentales acerca de la eficacia del tratamiento antifúngico de las infecciones causadas por *R. microsporus* (Dannaoui *et al.*, 2002; Dannaoui *et al.*, 2003). Concretamente, en un estudio experimental previo, el posaconazol administrado en una dosis única diaria mostró eficacia dosis dependiente frente a una única cepa de *R. microsporus* (Dannaoui *et al.*, 2003). Por ello decidimos comparar la eficacia del posaconazol administrado en una dosis única diaria o repartida en dos tomas, con la de la anfotericina B liposomal frente a cuatro cepas de *R. microsporus* con diferentes sensibilidades *in vitro*, en un modelo de ratón neutropénico. En nuestro modelo, la administración de posaconazol dos veces al día demostró ser más efectiva, prolongando la supervivencia y reduciendo la carga fúngica en los tejidos, en comparación con los resultados obtenidos con la administración de una única dosis diaria. Además, mediante estudios de bioensayo obtuvimos niveles en suero $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ a las 24h de la última dosis cuando el posaconazol fue administrado en una única dosis diaria, mientras que cuando se administró en dos tomas diarias los niveles en suero del fármaco fueron de $2 \mu\text{g/ml}$. Otro hallazgo interesante del estudio fue la correlación entre la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* de los antifúngicos utilizados. La anfotericina B liposomal resultó muy eficaz en el tratamiento de los animales infectados con las cepas de *R. microsporus*. El posaconazol mostró una eficacia *in vivo* comparable a la de la anfotericina B liposomal en el tratamiento de los ratones infectados con aquellas cepas sensibles al posaconazol (CMI = $0.25 \mu\text{g/ml}$), siendo de menor eficacia en las infecciones causadas por las cepas frente a las que obtuvieron CMIs de este antifúngico mas elevadas (CMI = $2 \mu\text{g/ml}$). Estos resultados han sido aceptados para su publicación en la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Con la finalidad de estudiar la variabilidad de la respuesta *in vitro* al posaconazol, se realizaron estudios con 50 cepas de *R. oryzae* utilizando el método de microdilución, el de disco-difusión, y la determinación de la concentración mínima fungicida. Coincidiendo con los resultados obtenidos por

otros estudios (Almyroudis *et al.*, 2007; Lass-Flörl *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2002) el posaconazol mostró buena actividad *in vitro* en los estudios efectuados con los métodos de microdilución y disco difusión. Por el contrario, en general observamos valores elevados de las concentraciones mínimas fungicidas. El papel de la concentración mínima fungicida aún no está totalmente definido, pero algunos autores (Lass-Flörl *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 1998; Rex *et al.*, 2001) sugieren que, en pacientes con inmunosupresión profunda, estos valores *in vitro* pueden ser más predictivos de la posible eficacia del tratamiento antifúngico que los datos obtenidos con el resto de métodos *in vitro* utilizados. En este estudio el posaconazol fue menos eficaz en el tratamiento de los ratones infectados con cepas que mostraron valores elevados de la concentración mínima fungicida de este antifúngico. Basándonos en nuestro estudio anterior, en el que se demostró la mayor eficacia del posaconazol administrado dos veces al día que administrado en dosis única diaria en el tratamiento de la infección causada por *R. microsporus* (Rodríguez *et al.*, 2009), decidimos evaluar la eficacia de dicho antifúngico, utilizando varias dosis administradas dos veces al día en ratones neutropénicos e infectados por varias cepas de *R. oryzae* con diferentes sensibilidades *in vitro* al mismo. Para todas las cepas estudiadas observamos correlación entre la sensibilidad *in vitro* y la eficacia *in vivo*, siendo el posaconazol más eficaz *in vivo* en el tratamiento de la infección experimental causada por aquellas cepas que fueron sensibles (CMI = 0.25 µg/ml) a este antifúngico, que en la producida por aquellas cepas frente a las que se obtuvieron CMIs de posaconazol más elevadas (CMI = 2 µg/ml). Los resultados obtenidos han sido recogidos en un artículo que ha sido enviado a la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* y que actualmente está en proceso de revisión para su publicación.

La neutropenia profunda y persistente es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar una zigomicosis invasora, estando presente en el 40-100% de los pacientes que desarrollan estas infecciones (Salavert y Pemán, 2009; Chayakulkeeree *et al.*, 2006). Varios estudios clínicos demuestran que la recuperación de la neutropenia está estrictamente relacionada con una menor tasa de mortalidad (Pagano *et al.*, 2006; Pagano *et al.*, 1997; Pagano *et al.*,

2004; Kontoyiannis *et al.*, 2000; Kara *et al.*, 2009). Las citocinas intervienen como mediadoras en la respuesta inmunológica (Safdar, 2007), y durante la última década, la utilidad de estos compuestos como inmunomoduladores ha sido evaluada en el tratamiento de infecciones fúngicas graves (Chayakulkeeree *et al.*, 2006; Hübel *et al.*, 2002). En particular, el interferón gamma y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos han demostrado su eficacia en el tratamiento de la criptococosis y la histoplasmosis experimental en el ratón (Clemons *et al.*, 2001; Deepe y Gibbons, 2000) y también en algunos casos clínicos de zigomicosis (Abzug y Walsh, 2004; García-Díaz *et al.*, 2001; González *et al.*, 1997; Mastroianni, 2004). Por todo ello, decidimos investigar la eficacia de dos citocinas diferentes, el interferón gamma y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, administradas como monoterapia y en combinación con la anfotericina B liposomal, en un modelo de infección diseminada por *R. oryzae* en ratones neutropénicos establecido en un estudio previo (Rodríguez *et al.*, 2008). En nuestro estudio la monoterapia con la anfotericina B liposomal fue moderadamente efectiva dando lugar a unas tasas de supervivencia del 40 al 50% de los animales. La combinación de la anfotericina B liposomal con el factor estimulador de colonias de granulocitos fue el tratamiento más eficaz con unas tasas de supervivencia del 80% de los ratones. La combinación de la anfotericina B liposomal con el interferón gamma no logró mejorar la eficacia de la monoterapia con anfotericina B liposomal, obteniéndose con ambos tratamientos tasas de supervivencia similares. La monoterapia con cualquiera de las dos citocinas fue ineficaz produciéndose el 100% de mortalidad de los ratones. Nuestros resultados concuerdan con los datos referentes a casos clínicos de zigomicosis en los que se evidenció la eficacia de la administración del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos como coadyuvante de la anfotericina B convencional o de sus formulaciones lipídicas en el tratamiento de los pacientes (García-Díaz *et al.*, 2001; González *et al.*, 1997; Mastroianni, 2004). Los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53:3569-3571.

5.2. Escedosporiosis

Las infecciones producidas por hongos del complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* se denominan escedosporiosis. Las especies de importancia en patología humana son *S. prolificans*, *S. boydii* (*P. boydii*), *S. apiospermum* (*P. apiosperma*) y *S. aurantiacum*. Estas infecciones invasivas son difíciles de tratar dada su resistencia a prácticamente todos los antifúngicos, y son causantes de una elevada tasa de mortalidad, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (Guarro *et al.*, 2006), por lo que se acentúa la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas (Cortez *et al.*, 2008).

Scedosporium prolificans es considerada la más virulenta de las especies causantes de scedosporiosis (Troke *et al.*, 2008; Cortez *et al.*, 2008; Guarro *et al.*, 2006). Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado una gran resistencia de este hongo a múltiples fármacos (Meletiadis *et al.*, 2003; Yustes y Guarro, 2005). Hasta ahora, los únicos antifúngicos que han mostrado cierto grado de eficacia en el tratamiento experimental de la infección causada por *S. prolificans* han sido la anfotericina B liposomal a dosis altas (Ortoneda *et al.*, 2004; Bocanegra *et al.*, 2005), cuyo efecto no se ha conseguido mejorar con la administración del factor estimulador de colonias de granulocitos (Ortoneda *et al.*, 2004), el albaconazol (Capilla *et al.*, 2003), y la caspofungina (Bocanegra *et al.*, 2005). Sin embargo, en la clínica la utilidad de estos fármacos es cuestionada (Husain *et al.*, 2005; Idigoras *et al.*, 2001; Maertens *et al.*, 2000). En un estudio sobre el tratamiento de la escedosporiosis donde se incluyeron pacientes con diversas manifestaciones clínicas, el voriconazol, del que no existen datos acerca del tratamiento experimental de esta infección, fue eficaz en un 40% de los pacientes infectados por *S. prolificans*, dando lugar a una respuesta terapéutica parcial o completa al final del estudio (Troke *et al.*, 2008). Debido a la ineficacia clínica y experimental de la monoterapia con muchos de los antifúngicos hasta ahora conocidos frente a *S. prolificans*, varios estudios han señalado el potencial de la combinación de antifúngicos como posible alternativa terapéutica (Meletiadis *et al.*, 2003; Polack, 1999). El uso de las combinaciones permite disminuir la dosis de los antifúngicos utilizados, ampliar

su espectro de actividad, y acortar la duración del tratamiento (Roling *et al.*, 2002). El uso de la terapia combinada para el tratamiento experimental de la escedosporiosis no ha sido extensamente investigado. Las combinaciones de la anfotericina B con equinocandinas o con diversos triazoles han demostrado cierto grado de sinergia *in vitro* (Cuenca-Estrella *et al.*, 2008; Yustes y Guarro, 2005) e *in vivo* (Bocanegra *et al.*, 2005; Gosbell *et al.*, 2003; Steinbach *et al.*, 2003) frente *S. prolificans*. La combinación de más de dos antifúngicos ha sido poco estudiada en micología médica, aunque ha mostrado buenos resultados *in vitro* e *in vivo* frente a *Aspergillus* spp (O'Shaughnessy *et al.*, 2006; Dannaoui *et al.*, 2004; Tascini *et al.*, 2003). Por todo ello decidimos evaluar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de la monoterapia con micafungina, anfotericina B y voriconazol, de sus combinaciones dobles y de su combinación triple. Aunque se ha demostrado que ninguno de estos fármacos es activo *in vitro* sobre este hongo (Meleatidis *et al.*, 2002; Yustes y Guarro, 2005; Carrillo-Muñoz y Guarro, 2001), se desconoce la posible eficacia *in vivo* e *in vitro* de las combinaciones de estos fármacos. Coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (Cortez *et al.*, 2008; Meleatidis *et al.*, 2002; Yustes y Guarro, 2005; Carrillo-Muñoz y Guarro, 2001) en nuestros estudios *in vitro* las CMI de los antifúngicos frente a *S. prolificans* fueron muy elevadas. Las combinaciones dobles resultaron indiferentes, mientras que la combinación triple fue sinérgica frente a la cepa estudiada de *S. prolificans*. Para llevar a cabo el estudio *in vivo* establecimos un modelo de infección diseminada por una cepa de *S. prolificans* en el ratón neutropénico. La gran virulencia de este hongo y su tropismo por cerebro y riñón que observamos en el modelo establecido habían sido apreciados previamente en varios estudios experimentales (Simitsopoulou *et al.*, 2004; Ortoneda *et al.*, 2002; Capilla *et al.*, 2003). En correlación con los altos valores de las CMI obtenidos en el estudio *in vitro*, los tratamientos con las monoterapias de anfotericina B, voriconazol y micafungina fueron muy poco eficaces en el tratamiento experimental. Las terapias dobles combinadas de anfotericina B con micafungina, y la del voriconazol con la micafungina, fueron los únicos tratamientos capaces de prolongar la supervivencia y reducir significativamente la carga de hongos en los riñones y el cerebro. La combinación triple fue sinérgica *in vitro*, pero *in vivo* no mejoró los resultados obtenidos con las combinaciones dobles. Los resultados obtenidos han sido

publicados en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53:2153-2155.

S. boydii (anamorfo de *P. boydii*), *S. apiospermum* (anamorfo de *P. apiosperma*) y *S. aurantiacum* son las especies de interés clínico del complejo de especies *P. boydii* sensu lato (Gilgado *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2009). La taxonomía de estos hongos ha sido modificada recientemente, y actualmente existen pocos datos experimentales y clínicos acerca de este complejo de especies. En general, las especies de este complejo presentan una elevada resistencia *in vitro* e *in vivo* a los antifúngicos convencionales tales como la anfotericina B (Guarro *et al.*, 2006; Cuenca-Estrella *et al.*, 2008; Carrillo-Muñoz y Guarro, 2001; Gilgado *et al.*, 2006; Capilla *et al.*, 2004; Capilla *et al.*, 2003; Kowacs *et al.*, 2004). Los nuevos azoles, voriconazol y posaconazol, han mostrado los resultados más esperanzadores tanto en estudios *in vitro* (Gilgado *et al.*, 2006; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2007; Guarro *et al.*, 2006) como en algunos casos clínicos aislados (Apostolova *et al.*, 2005; Porte *et al.*, 2006; Mellinshoff *et al.*, 2002). Después de la reciente modificación taxonómica del complejo sólo se ha llevado a cabo un estudio de virulencia experimental en el ratón, basado en datos de supervivencia, en el cual los autores concluyeron que *S. aurantiacum* es la especie más virulenta (Gilgado *et al.*, 2009). Con el fin de aportar más datos acerca de su patogenicidad, a partir de los modelos animales establecidos por Gilgado y col., decidimos comparar la virulencia de las tres especies de interés clínico del complejo, *S. apiospermum*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* mediante la determinación de la carga fúngica en tejidos y por histopatología. Los órganos con mayores niveles de carga fúngica fueron el cerebro seguido del riñón y del bazo. Los estudios histopatológicos en los ratones infectados con *S. boydii* y *S. aurantiacum* revelaron infiltración focal de hifas en los vasos sanguíneos y en el parénquima del cerebro y los riñones, sin respuesta inflamatoria. En el caso de los ratones infectados con *S. apiospermum* se observaron abscesos en el parénquima cerebral y en las secciones de riñón con abundantes células inflamatorias sin presencia de hifas. Nuestros estudios de histopatología corroboraron la mayor virulencia de la especie *S. aurantiacum*, demostrada previamente (Gilgado *et al.*, 2009), y traducida por la observación de mayor necrosis celular en los tejidos de los

ratones infectados por *S. aurantiacum* que en los infectados por las otras dos especies. Los estudios *in vitro* demostraron la resistencia de todas las cepas estudiadas a la anfotericina B. En general el voriconazol y el posaconazol mostraron buena actividad *in vitro* frente a la mayoría de las cepas, con la excepción de *S. aurantiacum* que fue la especie más resistente. Estos resultados ya fueron observados previamente por otros autores (Gilgado *et al.*, 2006; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2007). Posteriormente evaluamos la eficacia de la anfotericina B convencional y de los azoles, posaconazol y voriconazol, en el tratamiento experimental de la infección diseminada causada por estas especies en el ratón inmunosuprimido. En concordancia con los datos de estudios experimentales y clínicos previos (Capilla *et al.*, 2004; Capilla *et al.*, 2003; González *et al.*, 2003; Troke *et al.*, 2008; Mellingroff *et al.*, 2002), el tratamiento de los ratones con anfotericina B fue ineficaz para todas las cepas estudiadas. El voriconazol y el posaconazol fueron eficaces en el tratamiento de la infección causada por *S. apiospermum* y *S. boydii* en concordancia con los buenos resultados obtenidos *in vitro*. En el caso de *S. aurantiacum* también observamos correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*, ya que los azoles fueron menos eficaces frente a las cepas resistentes *in vitro* a estos antifúngicos, dando lugar a menores tasas de supervivencia de los ratones infectados con las mismas (0-10% de supervivencia), que las obtenidas (20-30% de supervivencia) en los animales infectados con las cepas sensibles *in vitro*. La mortalidad de los ratones inmunosuprimidos e infectados utilizados como control sin tratar en estos estudios coincidió con la descrita previamente por Gilgado y col. (Gilgado *et al.*, 2009) lo que demostró la reproducibilidad del modelo animal utilizado. Los resultados obtenidos han sido recogidos en un artículo que ha sido enviado a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy y que actualmente está en proceso de revisión para su publicación.

5.3. Paecilomicosis

P. lilacinus es un hongo filamentoso oportunista que causa infecciones graves principalmente en pacientes inmunocomprometidos, aunque también puede

afectar a pacientes inmunocompetentes (Pastor y Guarro, 2006; Carey *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 1990; Itin *et al.*, 1988). Aún no ha sido establecido el tratamiento antifúngico de elección para el tratamiento de esta infección. *P. lilacinus* muestra una elevada resistencia a los antifúngicos clásicos, como la anfotericina B, que sigue siendo la droga más comúnmente utilizada (Orth *et al.*, 1996; Domniz *et al.*, 2001; Hecker *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Clark, 1999) a pesar de su pobre actividad *in vitro* (Pastor y Guarro, 2006; Aguilar *et al.*, 1998; Espinel-Ingroff, 2001), lo que acentúa la necesidad de estudiar la posible eficacia de nuevos antifúngicos frente a esta infección.

No existen estudios previos sobre la eficacia de posaconazol en paecilomycosis experimentales y los datos clínicos son muy escasos (Pastor y Guarro, 2006; van Schooneveld *et al.*, 2008; Groll y Walsh, 2005; Mullane *et al.*, 2007) aunque este antifúngico ya ha demostrado eficacia *in vitro* frente a *P. lilacinus* (Pastor y Guarro, 2006). Por ello, decidimos estudiar la eficacia de posaconazol, de la anfotericina B y de la anfotericina B liposomal frente a *P. lilacinus* en ratón. Debido a la baja virulencia de *P. lilacinus* y a la escasez de estudios experimentales previos, tuvimos que desarrollar un modelo animal adecuado de infección en el ratón neutropénico. Para los estudios de supervivencia, utilizamos un tratamiento inmunosupresor que, combinado con un inóculo alto, fuese capaz de provocar una infección aguda con una mortalidad del 100% de los animales entre los 6 y 10 días post-infección. Para los estudios de carga fúngica en tejido se utilizó un tratamiento inmunosupresor menos agresivo que permitió a los animales sobrevivir hasta la finalización del tratamiento. Los mejores resultados se obtuvieron con posaconazol a dosis de 50 y 75 mg/kg/día, siendo la dosis de 50 mg/kg, el tratamiento más eficaz dando lugar a una mayor tasa de supervivencia de los animales y a una mayor reducción de la carga fúngica en sus tejidos. En este modelo no observamos una relación dosis-eficacia del posaconazol ya que las dosis más altas de este fármaco no fueron efectivas, concordando con las aportaciones de otros autores que ponen de manifiesto la menor eficacia de dosis elevadas de posaconazol en el tratamiento de diversas infecciones fúngicas experimentales (Lozano-Chiu *et al.*, 1999; Imai *et al.*, 2004). Tanto la anfotericina B convencional como su formulación liposomal fueron ineficaces en el tratamiento

experimental de esta infección. Los resultados obtenidos fueron publicados en la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 63:361-364.

Los datos clínicos escasos, pero prometedores, acerca de la eficacia de los nuevos azoles, posaconazol y voriconazol en el tratamiento de las infecciones producidas por *P. lilacinus*, los buenos resultados *in vitros* y el hecho de que en nuestro estudio anteriormente citado se demostró la eficacia *in vivo* del posaconazol frente *P. lilacinus*, nos hizo plantear el objetivo de evaluar la eficacia del voriconazol en los modelos animales previamente establecidos (Rodríguez *et al.*, 2009). Nuestros resultados coincidieron con los datos clínicos previos existentes (Martín *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004; Garbino *et al.*, 2002; van Schooneveld *et al.*, 2008), ya que el voriconazol fue eficaz en el tratamiento experimental de la infección diseminada causada por *P. lilacinus* en el ratón neutropénico dando lugar especialmente a una reducción significativa de la carga fúngica en tejidos. Los resultados obtenidos han sido aceptados para su publicación en la revista *International Journal of Antimicrobial Agents*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Conclusiones

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

6. Conclusiones

1. Hemos estudiado la actividad *in vitro* e *in vivo* de la anfotericina B, del posaconazol, y de la combinación de ambos antifúngicos, frente a dos cepas de *R. oryzae* de origen clínico.

- ❖ Tanto la anfotericina B como el posaconazol mostraron buena actividad *in vitro* frente a *R. oryzae*. Su utilización conjunta dio lugar a una interacción sinérgica frente a una de las cepas estudiadas mientras que resultó indiferente para la otra cepa.
- ❖ Hemos desarrollado un modelo estandarizado de infección diseminada por *R. oryzae* en ratones inmunodeprimidos en el que hemos demostrado que el tratamiento con la combinación de la anfotericina B a dosis bajas con posaconazol es tan eficaz como la monoterapia con anfotericina B a dosis altas. Esta nueva estrategia terapéutica permitiría disminuir la dosis de dicho fármaco y por tanto su toxicidad sin perder eficacia.

2. Se ha evaluado la actividad *in vitro* del posaconazol frente a cincuenta cepas clínicas de *R. oryzae* mediante las técnicas de microdilución, de disco difusión y la determinación de la concentración mínima fungicida.

- ❖ El posaconazol mostró buena actividad *in vitro* mediante la técnica de microdilución y la de disco difusión.
- ❖ Los valores de la concentración mínima fungicida del posaconazol frente a las cepas de *R. oryzae* ensayadas fueron de uno a cuatro logaritmos superiores a los obtenidos por el método de microdilución.
- ❖ Dada la correlación entre los resultados obtenidos por el método de microdilución y obtenidos por el de disco difusión, se sugiere la utilidad

del uso de éste último en los laboratorios clínicos, dada su sencillez de ejecución y su bajo coste económico.

3. Se han escogido seis cepas de *R. oryzae*, tres sensibles y tres indiferentes *in vitro* al posaconazol, y se ha evaluado la eficacia del tratamiento de la infección diseminada causada por dichas cepas en el ratón inmunosuprimido.

- ❖ La actividad *in vitro* se correlacionó con la eficacia *in vivo* del posaconazol, el cual fue más eficaz en el tratamiento de la infección causada por cepas sensibles *in vitro* a dicho antifúngico.
- ❖ La eficacia *in vivo* demostrada por el posaconazol sugiere que podría ser una buena alternativa a la anfotericina B liposomal en el tratamiento de las infecciones humanas causadas por cepas de *R. oryzae* sensibles *in vitro* a dicho antifúngico.

4. Hemos evaluado la eficacia de las citocinas; interferón gamma y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, y de la combinación de cada una de ellas con la anfotericina B liposomal en el tratamiento experimental de una infección diseminada por *R. oryzae*.

- ❖ El interferón gamma y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos administrados solos fueron ineficaces en el tratamiento de la infección por *R. oryzae*. De las dos pautas de tratamiento combinado, sólo la asociación de la anfotericina B liposomal y con el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos logró mejorar la eficacia de la monoterapia con anfotericina B.
- ❖ La buena eficacia de la combinación de la anfotericina B liposomal con el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos en el modelo experimental sugiere su potencial utilidad en la terapia de las infecciones humanas producidas por *R. oryzae*.

5. Hemos estudiado la actividad *in vitro* de siete antifúngicos frente a quince cepas de *R. microsporus*.

- ❖ La anfotericina B y el posaconazol, y en menor medida el itraconazol, fueron los fármacos más activos frente a *R. microsporus*. Todas las cepas de *R. microsporus* estudiadas fueron resistentes al voriconazol, al fluconazol, a la micafungina y a la flucitosina.

6. Hemos desarrollado un modelo estandarizado de infección diseminada por *R. microsporus* en el ratón inmunocomprometido, en el que hemos estudiado la eficacia de la anfotericina B liposomal y la del posaconazol. También hemos comparado, mediante bioensayo, los niveles plasmáticos de posaconazol obtenidos tras la administración de una dosis única diaria o repartida en dos tomas al día.

- ❖ En nuestro modelo animal, el posaconazol administrado dos veces al día demostró ser más efectivo que la dosis única, prolongando significativamente la supervivencia y reduciendo la carga fúngica en los tejidos de los animales. Además, se obtuvieron mayores niveles de posaconazol en suero cuando el fármaco fue administrado dos veces al día.
- ❖ La anfotericina B liposomal fue efectiva en el tratamiento experimental de la infección causada por *R. microsporus*.
- ❖ La actividad *in vitro* del posaconazol cuando fue administrado dos veces al día se correlacionó con su eficacia *in vivo*, siendo más eficaz en el tratamiento la infección causada por cepas sensibles *in vitro* a dicho antifúngico.
- ❖ La buena eficacia *in vivo* demostrada por el posaconazol sugiere su potencial utilidad como alternativa a la anfotericina B liposomal en el tratamiento de las infecciones humanas causadas por cepas de *R. microsporus* sensibles *in vitro* al mismo.

7. Hemos estudiado la actividad *in vitro* e *in vivo* de la anfotericina B, del voriconazol y de la micafungina, de sus dobles combinaciones y de su triple combinación frente a una cepa de *S. prolificans*.

- ❖ Ninguno de los tres antifúngicos fue activo *in vitro* frente a *S. prolificans*. Todas las combinaciones dobles estudiadas frente a la cepa de *S. prolificans* dieron lugar a interacciones indiferentes, mientras que la combinación triple resultó ser sinérgica para la cepa estudiada.
- ❖ Hemos desarrollado un modelo estandarizado de infección diseminada por *S. prolificans* en ratones inmunodeprimidos, en el que se ha demostrado la eficacia del tratamiento de la micafungina en combinación con la anfotericina B o con el voriconazol, sugiriendo su posible utilidad en el tratamiento de la infección humana.

8. Se han llevado a cabo estudios histopatológicos frente a las tres especies del complejo *P. boydii* de mayor interés clínico; *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. boydii*.

- ❖ Se observó crecimiento fúngico en todos los órganos estudiados para las tres especies del complejo *P. boydii* ensayadas. Las tres especies mostraron un marcado tropismo cerebral, siendo este, el órgano más afectado, seguido del riñón y del bazo.
- ❖ Los estudios histológicos de los ratones infectados con *S. boydii* y *S. aurantiacum* revelaron infiltración focal de hifas en el parénquima cerebral y renal, sin respuesta inflamatoria, mientras que en los estudios histológicos de los ratones infectados con *S. apiospermum* se observaron, en los mismos órganos, infiltrados inflamatorios sin presencia de hifas. Se observó mayor necrosis celular en los ratones infectados por *S. aurantiacum* que en los infectados por las otras dos especies.

9. Hemos estudiado la actividad *in vitro* e *in vivo* de la anfotericina B, del voriconazol, y del posaconazol, frente las tres especies del complejo *Pseudallescheria boydii* de mayor interés clínico; a *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. boydii*.

- ❖ La anfotericina B no fue activa *in vitro* frente a ninguna de las cepas ensayadas. En general, el voriconazol y el posaconazol mostraron buena actividad *in vitro* frente a las cepas estudiadas, con la excepción de una de las cepas de *S. aurantiacum* que fue resistente a estos antifúngicos.
- ❖ Hemos comprobado la reproducibilidad de un modelo de infección diseminada por *S. boydii*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum* en ratones inmunodeprimidos, previamente utilizado por otros autores.
- ❖ La buena eficacia del tratamiento con voriconazol y con posaconazol en el modelo experimental sugiere su posible utilidad en la terapia de las infecciones humanas producidas por *S. boydii* y *S. apiospermum* y también en el tratamiento de aquellas infecciones causadas por cepas de *S. aurantiacum* sensibles *in vitro* a estos antifúngicos.

10. Hemos estudiado la actividad *in vitro* e *in vivo* de la anfotericina B, del voriconazol y del posaconazol frente a dos cepas de *P. lilacinus*.

- ❖ La anfotericina B no fue activa *in vitro* frente a ninguna de las cepas ensayadas. En general, el voriconazol y el posaconazol mostraron buena actividad *in vitro* frente a las cepas estudiadas.
- ❖ La buena eficacia experimental del tratamiento con voriconazol y con posaconazol en ratones neutropénicos e infectados con *P. lilacinus* sugiere su posible utilidad en la terapia de las infecciones humanas producidas por dicho hongo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Bibliografía

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

7. Bibliografía

Abzug MJ, Walsh TJ. 2004. Interferon-gamma and colony-stimulating factors as adjuvant therapy for refractory fungal infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23:769-773.

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

Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL. 2007. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 51:748-751.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed. Wiley J and Sons, Inc., New York.

Almyroudis NG, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S. 2007. In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 51: 2587-2590.

Anderson KL, Mitra S, Salouti R, Pham TA, Taylor HR. 2004. Fungal keratitis caused by *Paecilomyces lilacinus* associated with a retained intracorneal hair. *Cornea.* 23:516–521.

Apostolova LG, Johnson EK, Adams HP Jr. 2005. Disseminated *Pseudallescheria boydii* infection successfully treated with voriconazole. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 76:1741-1742.

Alvarez E, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Stchigel A, Rinaldi MG, Guarro J. 2009. Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 47:1650-1656.

Bal AM. 2006. Importance of identification of zygomycetes in the era of newer antifungal agents. *Transpl. Infect. Dis.* 8:122-123.

Barchiesi F, Spreghini E, Santinelli A, Fothergill AW, Pisa E, Giannini D, Rinaldi MG, Scalise G. 2007. Posaconazole prophylaxis in experimental systemic zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 73-77.

Belone AF, Madeira S, Rosa PS, Opromolla DV. 2002. Experimental reproduction of the Jorge Lobo's disease in Balb/c mice inoculated with *Lacazia loboii* obtained from a previously infected mouse. *Mycopathologia.* 155:191-194.

Bocanegra R, Najvar LK, Hernandez S, McCarthy DI, Graybill JR. 2005. Caspofungin and liposomal amphotericin B therapy of experimental murine scedosporiosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:5139-5141.

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. 2009. 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.* 88:97–110.

Capilla J, Mayayo E, Serena C, Pastor FJ, Guarro J. 2004. A novel murine model of cerebral scedosporiosis: lack of efficacy of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:1092-1095.

Capilla J, Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Guarro J. 2003. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3976-3978.

Carey J, D'Amico R, Sutton DA, Rinaldi MG. 2003. *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. *Emerg. Infect. Dis.* 9:1155-1158.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The fungi. 2nd ed. Academic Press, London.

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

Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Ruesga M, Alonso R, del Valle O, Hernández-Molina JM, McNicholas P, Loebenberg D, Santos P. 2005. Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and amphotericin B against yeasts from oropharyngeal candidiasis and other infections. J. Antimicrob. Chemother. 55:317-319.

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

Castro LG, Salebian A, Sotto MN. 1990. Hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant recipient and a review of human *Paecilomyces* species infections. J. Med. Vet. Mycol. 28:15-26.

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

Clark NM. 1999. *Paecilomyces lilacinus* infection in a heart transplant recipient and successful treatment with terbinafine. Clin. Infect. Dis. 28:1169–1170.

Clay K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. Ecology. 69:10-16.

Clemons KV, Lutz JE, Stevens DA. 2001. Efficacy of recombinant gamma interferon for treatment of systemic cryptococcosis in SCID mice. Antimicrob. Agents Chemother. 45:686-689.

Clemons KV, Stevens DA. 2000. Treatment of orogastrointestinal candidosis in SCID mice with fluconazole alone or in combination with recombinant granulocyte colony-stimulating factor or interferon gamma. *Med. Mycol.* 38:213-219.

Chandrasekar P. 2009. Invasive mold infections: recent advances in management approaches. *Leuk. Lymphoma.* 50:703-715.

Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:215-229.

Connolly P, Wheat J, Schnizlein-Bick C, Durkin M, Kohler S, Smedema M, Goldberg J, Brizendine E, Loebenberg D. 1999. Comparison of a new triazole antifungal agent, Schering 56592, with itraconazole and amphotericin B for treatment of histoplasmosis in immunocompetent mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:322-328.

Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YR, Zaoutis T, Kottlilil S, Walsh TJ. 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:157-197.

Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. 2008. In vitro activities of 35 double combinations of antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1136-1139.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. 2006. 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.* 50:917-921.

Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. 2004. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:970-978.

Dannaoui E, Meis JF, Loebenberg D, Verweij PE. 2003. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3647-3650.

Dannaoui E, Mouton JW, Meis JF, Verweij PE; Eurofung Network. 2002. Efficacy of antifungal therapy in a nonneutropenic murine model of zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1953-1959.

Deepe GS Jr, Gibbons R. 2000. Recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the course of pulmonary histoplasmosis in immunocompetent and immunodeficient mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3328-3336.

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

de Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Gueho E. 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses.* 37: 71-78.

Delhaes L, Harun A, Chen SCA, Nguyen Q, Slavin M, Heath CH, Maszewska K, Halliday C, Robert V, Sorrell TC, Meyer W on behalf of the Australian *Scedosporium* Study Group. 2008. Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. *Emerg. Infect. Dis.* 14:282-290.

Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, Warnock DW, Kelly SL. 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1364-1368.

De Wet N, Llanos-Cuentas A, Suleiman J, Baraldi E, Krantz EF, Della Negra M, Diekmann-Berndt H. 2004. 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.* 39:842-849.

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

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

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. 1987. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N. Engl. J. Med.* 317:334-341.

Doern GV, Tubert TA, Chapin K, Rinaldi MG. 1986. Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 24:507-511.

Domniz Y, Lawless M, Sutton GL, Rogers CM, Meagher LJ. 2001. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* endophthalmitis after foreign body trauma to the cornea. *Cornea.* 20:109-111.

Elewski BE. 1998. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:415-429.

Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. 2006. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.* 55:809-818.

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

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

Espinel-Ingroff A. 2001. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 39:954-958.

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. 1997. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 35:139-143.

Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, Ghannoum M, Hazen KC, Pfaller MA, Rinaldi M, Walsh TJ. 2001. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp. NCCLS collaborative evaluation. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1828-1835.

Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. 2002. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 40:3776-3781.

Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Paetznick V, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. 1995. Comparative

and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:314-319.

Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. 1991. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 29:393-394.

Espinel-Ingroff A, Shadomy S. 1989. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8:352-361.

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

Garbino J, Ondrusova A, Baligvo E, Lew D, Bouchuiguir-Wafa K, Rohner P. 2002. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* endophthalmitis with voriconazole. *Scand. J. Infect. Dis.* 34:701-703.

Garcia-Diaz JB, Palau L, Pankey GA. 2001. Resolution of rhinocerebral zygomycosis associated with adjuvant administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Infect. Dis.* 32:166-170.

Gavaldà J, Ruiz I. 2003. Guidelines for the treatment of infection due to *Aspergillus* spp. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:571-578.

Gené J, Guarro J. 2008. Etiología de las zigomicosis, pp. 9-18. En: Palacio A, Pontón J, Guarro J, Quindós G (eds.). *Guía de bolsillo de las zigomicosis invasoras* (1ª ed). *Revista Iberoamericana de Micología–Asociación Española de Micología*, Bilbao.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 43:4930-4942.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J. 2009. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med. Mycol.* 47:371-374.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. 2008. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J. Clin. Microbiol.* 46: 766-771.

Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:4211-4213.

Gleissner B, Schilling A, Anagnostopoulos I, Siehl I, Thiel E. 2004. Improved outcome of zygomycosis in patients with hematological diseases? *Leuk. Lymphoma.* 45:1351-1360.

Gómez-López A, Zaragoza O, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2008. Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert. Opin. Pharmacother.* 9: 2801–2816.

Gonzalez CE, Couriel DR, Walsh TJ. 1997. Disseminated zygomycosis in a neutropenic patient: succesful treatment with amphotericin B lipid complex and granulocyte colony-stimulatory factor. *Clin. Infect. Dis.* 24:192-196.

González GM, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Rinaldi MG, Loebenberg D, Graybill JR. 2003. Activity of posaconazole against *Pseudallescheria boydii*: in vitro and in vivo assays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1436-1438.

Gosbell IB, Toumasatos V, Young J, Kuo RS, Ellis DH, Perrie RC. 2003. Cure of orthopaedic infection with *Scedosporium prolificans* using voriconazole plus terbinafine, without the need for radical surgery. *Mycoses.* 46:233-236.

Graybill JR. 2000. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug resist. Updat.* 3:364-383.

Graybill JR, Najvar LK, Gonzalez GM, Hernandez S, Bocanegra R. 2003. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:1373-1376.

Graybill JR, Sun SH, Ahrens J. 1986. Treatment of murine coccidioid meningitis with fluconazole (UK 49,858). *J. Med. Vet. Mycol.* 24:113-119

Greenberg RN, Mullane K, van Burik JAH, Raad I, Abzug MJ, Anstead G, Herbrecht R, Langston A, Marr KA, Schiller G, Schuster M, Wingard JR, Gonzalez CE, Revankar SG, Corcoran G, Kryscio RJ, Hare R. 2006. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:126-133.

Grenouillet F, Botterel F, Crouzet J, Larosa F, Hicheri Y, Forel JM, Helias P, Ranque S, Delhaes L. 2009. *Scedosporium prolificans*: an emerging pathogen in France?. *Med. Mycol.* 47:343-350.

Greig JR, Khan MA, Hopkinson NS, Marshall BG, Wilson PO, Rahman SU. 2001. Pulmonary infection with *Scedosporium prolificans* in an immunocompetent individual. *J. Infect.* 43:15-17.

Groll AH, Walsh TJ. 2006. Antifungal efficacy and pharmacodynamics of posaconazole in experimental models of invasive fungal infections. *Mycoses.* 49: 7-16.

Guarro J, Kantarcioglu AS, Horr  R, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, de Hoog GS. 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy refractory opportunist. *Med. Mycol.* 44:295-327.

Guarro J, Pastor FJ. 2009. Escedosporiosis, pp. 47-63. En: Pontón J, Quindós G (eds.). *Micosis invasoras en los pacientes oncohematológicos* (1^a ed). Revista Iberoamericana de Micología – Asociación Española de Micología, Bilbao.

Harun A, Perdomo H, Gilgado F, Chen SC, Cano J, Guarro J, Meyer W. 2009. Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches. *Med. Mycol.* 47:406-414.

Heath CH, Slavin MA, Sorrell TC, Handke R, Harun A, Phillips M, Nguyen Q, Delhaes L, Ellis D, Meyer W, Chen SC on behalf of the Australian *Scedosporium* Study Group. 2009. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:689-693.

Hecker MS, Weinberg JM, Bagheri B, Tangoren IA, Rudikoff D, Bottone E, Bilodeau-McCarthy E, Rudolph RI, Phelps RG. 1997. Cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infection: report of two novel cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 37:270-271.

Hsieh SM, Hung CC, Chen MY, Hsueh PR, Chang SC. 1998. Efficacy and adverse effects of higher dose amphotericin B monotherapy for cryptococcal meningitis in patients with advanced HIV infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 31:233-239.

Hübel K, Dale DC, Liles WC. 2002. Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: current status of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma. *J. Infect. Dis.* 185:1490-1501.

Husain S, Alexander BD, Muñoz P, Avery RK, Houston S, Pruett T, Jacobs R, Dominguez EA, Tollemar GJ, Baumgarten K, Yu CM, Wagener MM, Linden P, Kusne S, Singh N. 2003. Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non-*Aspergillus* mycelial fungi. *Clin. Infect. Dis.* 37: 221-229.

Husain S, Muñoz P, Forrest G, Alexander BD, Somani J, Brennan K, Wagener MM, Singh N. 2005. Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. Clin. Infect. Dis. 40:89-99.

Ibrahim AS, Avanesian V, Spellberg B, Edwards JE Jr. 2003. Liposomal amphotericin B, and not amphotericin B deoxycholate, improves survival of diabetic mice infected with *Rhizopus oryzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 47:3343–3344.

Ibrahim AS, Gebremariam T, Fu Y, Edwards JE Jr, Spellberg B. 2008. Combination echinocandin-polyene treatment of murine mucormycosis. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 1556–1558.

Ibrahim AS, Gebremariam T, Schwartz JA, Edwards JE Jr., Spellberg B. 2009. Posaconazole mono- or combination therapy for treatment of murine zygomycosis. Antimicrob. Agents Chemother. 53:772–775.

Idigoras P, Pérez-Trallero E, Piñeiro L, Larruskain J, López- Lopategui MC, Rodríguez N, González JM. 2001. Disseminated infection and colonization by *Scedosporium prolificans*: a review of 18 cases, 1990-1999. Clin. Infect. Dis. 32:158–165.

Imai JK, Singh G, Clemons KV, Stevens DA. 2004. Efficacy of posaconazole in a murine model of central nervous system aspergillosis. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 4063-4066.

Itin PH, Frei R, Lautenschlager S, Buechner SA, Surber C, Gratwohl A, Widmer AF. 1988. Cutaneous manifestations of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. J. Am. Acad. Dermatol. 39: 401-409.

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

Jorgensen JH, Alexander GA, Graybill JR, Drutz DJ. 1981. Sensitive bioassay for ketoconazole in serum and cerebrospinal fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20:59-62.

Kaltseis J, Rainer J, de Hoog GS. 2009. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med. Mycol.* 47: 398-405.

Kan VL, Henderson DK, Bennett JE. 1986. Bioassay for SF 86-327, a new antifungal agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:628-629.

Kara IO, Tasova Y, Uguz A, Sahin B. 2009. Mucormycosis associated fungal infections in patients with haematologic malignances. *Int. J. Clin. Prac.* 63:134-139.

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

Kerridge D, Vanden-Bossche H. 1990. Drug discovery: a biochemist approach, pp. 77-109. En: Ryley JF (ed.). *Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.

Kontoyiannis DP, Wessel WC, Bodey GP, Rolston KV. 2000. Zygomycosis in the 1990s in a tertiary-care cancer center. *Clin. Infect. Dis.* 30:851-856.

Kowacs PA, Soares Silvado CE, Monteiro de Almeida S, Ramos M, Abrao K, Madaloso LE, Pinheiro RL, Werneck LC. 2004. Infection of the CNS by

Scedosporium apiospermum after near drowning. Report of a fatal case and analysis of its confounding factors. *J. Clin. Pathol.* 57:205-207.

Krause DS, Reinhardt J, Vazquez JA, Reboli A, Goldstein BP, Wible M, Henkel T; Anidulafungin Invasive Candidiasis Study Group. 2004. Phase 2, randomized, dose-ranging study evaluating the safety and efficacy of anidulafungin in invasive candidiasis and candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2021-2024.

Krishna G, Martinho M, Chandrasekar P, Ullmann AJ, Patino H. 2007a. Pharmacokinetics of oral posaconazole in allogenic hematopoietic stem cell transplant recipients with graft-versus-host disease. *Pharmacotherapy.* 27:1627-1636.

Krishna G, Mouton A, Ma L, Medlock MM, McLeod J. 2009. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:958–966.

Krishna G, Sansone-Parsons A, Martinho M, Kantesaria B, Pedicone L. 2007b. Posaconazole plasma concentrations in juvenile patients with invasive fungal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:812–818.

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. 2005. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet.* 366:1435–1442.

Lass-Flörl C, Mayr A, Perkhofer S, Hintenberger G, Hausdorfer J, Speth C, Fille M. 2008. Activities of antifungal agents against yeasts and filamentous fungi: assessment according to the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3637-3641.

Liu K, Howell DN, Perfect JR, Schell WA. 1998. Morphologic criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* species by histopathology. *Am. J. Clin. Pathol.* 109:45–54.

Lozano-Chiu M, Arikian S, Paetznick VL, Anaissie EJ, Loebenberg D, Rex JH. 1999. Treatment of murine fusariosis with SCH 56592. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 589-591.

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

Maertens J, Lagrou K, Deweerdt H, Surmont I, Verhoef GE, Verhaegen J, Boogaerts MA. 2000. Disseminated infection by *Scedosporium prolificans*: an emerging fatality among haematology patients. Case report and review. *Ann. Hematol.* 79:340–344.

Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. 2009. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:161-166.

Martin CA, Roberts S, Greenberg RN. 2002. Voriconazole treatment of disseminated *Paecilomyces* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 35:78–81.

Mastroianni A. 2004. Paranasal sinus mucormycosis in an immunocompetent host: efficacy and safety of combination therapy with liposomal amphotericin B and adjuvant rHuGM-CSF. *Infez. Med.* 12:278-283.

Mauceri AA, Cullen SI, Vandeveld AG, Johnson JE 3rd. 1974. Flucytosine. An effective oral treatment for chromomycosis. *Arch. Dermatol.* 109:873-876.

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. 1998. Combination therapy with fluconazole and flucytosine for cryptococcal meningitis in Ugandan patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 26:1362-1366.

McGinnis MR. 1996. Mycetoma. *Dermatol. Clin.* 14:97-104.

McGinnis MR, Rinaldi MG. 1996. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids, pp. 176-211. En: Lorian V (ed.). *Antibiotic in Laboratory Medicine*. 3rd ed. Williams and Wilkins Co. MD, Baltimore,USA.

Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW, Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Verweij PE; EUROFUNG Network. 2002. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:62-68.

Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Verweij PE. 2003. In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:106-117.

Mellinghoff IK, Winston DJ, Mukwaya G, Schiller GJ. 2002. Treatment of *Scedosporium apiospermum* brain abscess with posaconazole. *Clin. Infect. Dis.* 34:1648-1650.

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

Mullane K, Toor AA, Kalnicky C. 2007. Posaconazole salvage therapy allows succesful allogenic hematopietic stem cell transplantation in patients with refractory invasive mold infections. *Transpl. Infect. Dis.* 9:89-96.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved

standard- second edition M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

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

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2008. 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.

Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, Sutton DA, Rinaldi MG. 1998. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J. Infect. Dis.* 177:425-430.

Nomeir AA, Kumari P, Hilbert MJ, Gypta S, Loebenberg D, Cacciopuoti A, Hare R, Miller GH, Lin CC, Cayen MN. 2000. Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 727-731.

Odds FC, van Gerven F, Espinel-Ingroff A, Bartlett MS, Ghannoum MA, Lancaster MV, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, and Walsh TJ. 1998. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:282–288.

O'Shaughnessy EM, Meletiadis J, Stergiopoulou T, Demchok JP, Walsh TJ. 2006. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:1168-1176.

Orth B, Frei R, Itin PH, Rinaldi MG, Speck B, Gratwohl A, Widmer AF. 1996. Outbreak of invasive mycoses caused by *Paecilomyces lilacinus* from a contaminated skin lotion. *Ann. Intern. Med.* 125:799–806.

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

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

Pachón J, Cisneros JM, Collado-Romacho AR, Lomas-Cabezas JM, Lozano de León-Naranjo F, Parra-Ruiz J, Rivero-Román A; Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas. 2006. Treatment of invasive fungal infections. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24:254–263.

Padhye AA, Kaplan W, Neuman MA, Case P, Radcliffe GN. 1984. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Sabouraudia.* 22:493-500.

Pagano L, Caira M, Candoni A, Offdani 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. 2006. The epidemiology of fungal infections in patients with haematological malignances. The SEIFEM-2004 study. *Haematologica.* 91:1068-1075.

Pagano L, Offdani M, Fianchi L, Nosari A, Candoni A, Picardi M, Corvetta L, D'Antonio D, Girmenia C, Martino P, Del Favero A. 2004. Mucormycosis in haematological patients. *Haematologica.* 89:207-214.

Pagano L, Ricci P, Tonso A, Nosari A, Cudillo L, Montillo M, Cenacchi A, Pacilli L, Fabbiano F, Del Favero A. 1997. Mucormycosis in patients with haematological malignances: a retrospective clinical study of 37 cases. *British J. Haematology.* 99:331-936.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin Jr DK, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious Diseases Society of America. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48:503–535.

Pastor FJ, Guarro J. 2006. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clin. Microbiol. Infect.*12: 948-960.

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

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

Pfaller MA, Rinaldi MG. 1992. In vitro testing of susceptibility of fluconazole, pp 10-22. En: Powderly WB, Vant Wout JW. (eds.). *The antifungal agents. Fluconazole.* Marius Press, Lancashire, United Kingdom.

Polak A. 1999. The past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycoses.* 42: 355-370.

Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J., Quindós G. 2002. Hongos y actinomicetos alergénicos. Revista Iberoamericana de Micología, Bial-Arístegui. Pp. 1-46.

Porte L, Khatibi S, Hajj LE, Cassaing S, Berry A, Massip P, Linas MD, Magnaval JF, Sans N, Marchou B. 2006. *Scedosporium apiospermum* mycetoma with bone involvement successfully treated with voriconazole. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100:891-894.

Pujol I, Guarro J, Sala J, Riba MD. 1997. Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against *Fusarium*. Antimicrob. Agents Chemother. 41:808-811.

Revankar SG, Graybill JR. 2003. Antifungal therapy, pp. 157-192. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds.) Clinical Mycology. Elsevier Science, USA.

Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. 1993. Antifungal susceptibility testing. Clin. Microbiol. Rev. 6:367-381.

Rex JH, Pfaller M, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum M, Gosey L, Odds FC, Rinaldi M, Sheehan D, Warnock D. 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin. Microbiol. Rev. 14:643-658.

Richardson MD, Warnock DW. 1997. Fungal infection. Diagnosis and management. 2nd ed. Blackwell Science Ltd, United Kingdom.

Rickerts V, Atta J, Herrmann S, Jacobi V, Lambrecht E, Bialek R, Just-Nübling G. 2006. Successful treatment of disseminated mucormycosis with a combination of liposomal amphotericin B and posaconazole in a patient with acute myeloid leukaemia. Mycoses. 49:27-30.

Rippon JW. 1988. Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, pp. 681-713. 3rd ed. WB Saunders company, Philadelphia, USA.

Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. Clin. Infect. Dis. 41:634-653.

Rodríguez MM, Calvo E, Serena C, Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. 2009. Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. Antimicrob. Agents Chemother. 53:2153–2155.

Rodríguez MM, Serena C, Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. 2008. Posaconazole combined with amphotericin B, an effective therapy for a murine disseminated infection caused by *Rhizopus oryzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 52:3786-3788.

Rogers TR. 2008. Treatment of zygomycosis: current and new options. J. Antimicrob. Chemother. 61:35-40.

Rubio M, Gil J, Benito R, Ramírez I, Navarro M. 2001. Micosis más frecuentes en nuestro medio, pp. 1-15. En: Pemán J, Martín E, Rubio M (eds.). Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Rev. Iberoam. Micol. Bilbao.

Rüping MJ, Vehreschild JJ, Cornely OA. 2008. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. Drugs. 68:1941–1962.

Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. 2009. Antifúngicos para uso sistémico. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 27:353-362.

Safdar A. 2007. Difficulties with fungal infections in acute myelogenous leukemia patients: immune enhancement strategies. *Oncologist*. 12:2-6.

Salavert M, Pemán J. 2009. Zigomicosis, pp. 65-67. En: Pontón J, Quindós G (eds.). *Micosis invasoras en los pacientes oncohematológicos* (1ª ed). Revista Iberoamericana de Micología – Asociación Española de Micología, Bilbao.

Shadomy S, Shadomy HJ. 1991. Comparative in vitro antifungal susceptibility studies with 30 serotype A and B isolates of *Candida albicans*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 14:21-22.

Sharma NL, Mahajan V, Sharma RC, Sharma A. 2002. Subcutaneous pheohyphomycosis in India-a case report and review. *Int. J. Dermatol.* 41:16-20.

Simitsopoulou M, Gil-Lamagnere C, Avramidis N, Maloukou A, Lekkas S, Havlova E, Kourounaki L, Loebenberg D, Roilides E. 2004. Antifungal activities of posaconazole and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo and in mice with disseminated infection due to *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3801-3805.

Smith KJ, Neafie RC, Skelton HG, Barrett TL, Graham JH, Lupton GP. 1991. Majocchi's granuloma. *J. Cutan. Pathol.* 18:28-35.

Spellberg B, Edwards JE Jr. 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 32:76-102.

Spellberg B, Edwards JE Jr, Ibrahim AS. 2005. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:556-569.

Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP, Edwards J Jr, Ibrahim AS. 2009. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clin. Infect. Dis.* 48:1743-1751.

Steinbach WJ, Schell WA, Miller JL, Perfect JR. 2003. *Scedosporium prolificans* osteomyelitis in an immunocompetent child treated with voriconazole and caspofungin, as well as locally applied polyhexamethylene biguanide. J. Clin. Microbiol. 41:3981-3985.

Subramanyam VR, Rath CC, Mishra M, Chhotrai GP. 1993. Subcutaneous infection due to *Curvularia* species. Mycoses. 36:449-450.

Sugar AM, Liu XP. 2000. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2004-2006.

Sugar AM, Liu XP. 2001. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. Antimicrob. Agents Chemother. 45:601-604.

Summerbell R. 2003. Ascomycetes, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix*, *Piedraia* and their relatives, pp. 237-498. En: Howard, DH (ed.). Pathogenic fungi in humans and animals, 2nd ed. Dekker, New York.

Sun QN, Najvar LK, Bocanegra R, Loebenberg D, Graybill JR. 2002. In vivo activity of posaconazole against *Mucor* spp. in an immunosuppressed mouse model. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 2310-2312.

Tascini C, Tagliaferri E, Lapoce R, Leonildi A, Menichetti F. 2003. Caspofungin in combination with itraconazole and amphotericin B for the treatment of invasive aspergillosis in humans, with a method to test ex vivo synergism. Clin. Microbiol. Infect. 9: 901-902.

Taylor JW, Spatafora J, O'Donnell K, Lutzoni F, James T, Hibbett DS, Geiser D, Bruns TD, Blackwell M. 2004. The Fungi, pp. 171 - 194. En: Cracraft J, Donoghue MJ (eds.). Assembling the tree of life. 1st ed. Oxford University Press, United Kingdom.

Torres-Narbona M, Guinea J, Muñoz P, Bouza E. 2007. Zigomicetos y zigomicosis en la era de las nuevas terapias antifúngicas. *Rev. Esp. Quimioterap.* 20:375-386.

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

Troke P, Aguirrebengoa K, Arteaga C, Ellis D, Heath CH, Lutsar I, Rovira M, Nguyen Q, Slavin M, Chen SC; Global Scedosporium Study Group. 2008. Treatment of scedosporiosis with voriconazole: clinical experience with 107 patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1743-1750.

van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP. 2006. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin. Infect. Dis.* 42: 61-65.

Van der Coer JM, Marres HA, Wielinga EW, Wong-Alcalá LS. 1992. Rhinosporidiosis in Europe. *J. Laryngol. Otol.* 106:440-443.

Van Schooneveld T, Freifeld A, Lesiak A, Kalil A, Sutton DA, Iwen PC. 2008. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. *Transpl. Infect. Dis.* 10:117-122.

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. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 46:327-360.

Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, Lazarus HM, Petersen F, Raffalli J, Yanovich S, Stiff P, Greenberg R, Donowitz G, Schuster M, Reboli A, Wingard J, Arndt C, Reinhardt J, Hadley S, Finberg R, Laverdière M, Perfect J, Garber G, Fioritoni G, Anaissie E, Lee J; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. 2002. Voriconazole

Bibliografía

compared with liposomal amphotericin B for empirical anti-fungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N. Engl. J. Med.* 346:225–34

Warnock DW. 2007. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn. J. Med. Mycol.* 48:1-12.

Yustes C, Guarro J. 2005. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:3498-3500.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

Anexo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011

----- Missatge original -----

Assumpte: Your Submission IJAA-D-09-00372R2

Data: Tue, 08 Dec 2009 15:40:51 +0000

De: International Journal of Antimicrobial Agents <ijaa@elsevier.com>

A: franciscojavier.pastor@urv.cat

Ms. Ref. No.: IJAA-D-09-00372R2

Title: Efficacy of voriconazole in a murine model of invasive paecilomycosis
International Journal of Antimicrobial Agents

Dear Dr Pastor,

I am pleased to confirm that your paper "Efficacy of voriconazole in a murine model of invasive paecilomycosis" has been accepted for publication in International Journal of Antimicrobial Agents and has now been forwarded to the Publisher.

You will receive proofs in due course.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Professor Alasdair Geddes
Editor-in-Chief
International Journal of Antimicrobial Agents

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE MICOSIS DISEMINADAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS

Maria del Mar Rodríguez Peña

ISBN:978-84-694-1251-0/DL:T-316-2011