

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos.

El primer caso descrito de coccidioidomicosis fue un soldado argentino llamado Domingo Escurra. El paciente presentaba lesiones tumorales cutáneas recurrentes de varios años de evolución antes de ingresar al hospital de la universidad de Buenos Aires, en 1891, donde el enfermo fue estudiado por Alejandro Posadas, un alumno del famoso patólogo Robert Wernicke. Posadas fue capaz de describir la enfermedad en animales mediante la inoculación con material de las lesiones del paciente. Casi al mismo tiempo que Posadas describía la enfermedad en Argentina, Emmet Rixford estaba estudiando el primer caso de coccidioidomicosis en California. El paciente José Furtado Silveira, un portugués de las Azores, que había emigrado al valle de San Joaquín en 1886, pronto desarrolló lesiones nodulares cutáneas recurrentes, parecidas a las observadas por Posadas en su paciente. Rixford y Gilchrist estudiaron el parásito que encontraron en el material de las lesiones. Por sugerencia de C. W. Stiles, denominaron al microorganismo *Coccidioides* (parecido a coccidias) *immitis* (im=no, mitis=ligero) y lo describieron como un protozoo de la clase Sporozoa. Ophüls descubrió la verdadera naturaleza del agente etiológico de la coccidioidomicosis. La investigación bacteriológica del tercer caso de esta enfermedad reveló el crecimiento de un hongo, que al menos en un principio se consideró como un contaminante. Sin embargo, la

regularidad de su aislamiento terminó por relacionar al hongo con la enfermedad. No fue sino hasta 1932, cuando Stewart y Meyer aislaron *C. immitis* del suelo del valle de San Joaquín, en el sitio en que cuatro filipinos habían contraído infecciones graves o mortales. De esta manera establecieron que el suelo era un reservorio del microorganismo en el área. Estudios posteriores de Dickson, Gifford y Smith permitieron la definición de las diversas formas que puede tomar la enfermedad en su fase inicial, así como el establecimiento de la duración del periodo de incubación (77).

1.2 Características microbiológicas de *Coccidioides immitis*.

C. immitis es el agente etiológico de la coccidioidomicosis y es un hongo dimórfico caracterizado por diferentes ciclos sapróbico y parasítico. En el suelo y en medios de cultivo a 25-30 °C crece como hongo filamentosos caracterizado por la presencia de hifas tabicadas. Ciertos compartimentos delimitados por septos se destacan rápidamente por sus paredes laterales engrosadas y citoplasma condensado, lo que contrasta con los compartimentos adyacentes no refráctiles con paredes celulares delgadas y citoplasma no vacuolado. Las paredes laterales y septales engrosadas conforman las artroconidias que se vuelven claramente visibles al microscopio. Mediante un proceso de fragmentación que ocurre como resultado de estrés mecánico, activación de enzimas líticas o ambos, las células no refráctiles se fracturan liberando así las conidias de la cadena artroconidial.

Cuando las artroconidias son inhaladas por un hospedero apropiado se lleva a cabo su transformación morfológica en una esférula multinucleada. La iniciación de la

morfogénesis de las células en el ciclo parasítico es la hinchazón de las artroconidias uninucleadas, condición que persiste por un corto tiempo para luego volverse binucleada. La continua división nuclear da lugar a una esférula multinucleada. La cariocinesis cesa simultáneamente en todos los núcleos lo cual es seguido por la septación de la esférula. El proceso involucra la formación de compartimentos multinucleados que culmina en la formación de endosporas uninucleadas, las cuales están agrupadas en pequeños racimos rodeadas por una membrana delgada. Las endosporas se liberan de la esférula madura y cada una de ellas es potencialmente capaz de iniciar una segunda generación de esférulas dentro del huésped (12).

1.3 Ecología y distribución.

El hábitat natural de *C. immitis* es el suelo, geográficamente limitado (con raras excepciones) a regiones áridas y semiáridas del continente americano. Las regiones de endemidad mas elevada de coccidioidomicosis, son el sudoeste de Estados Unidos y el norte de México; sin embargo, existen otros focos endémicos en Guatemala, Honduras, Venezuela, Colombia, Paraguay y Argentina (65). El hongo sobrevive a profundidades de 20 cm sobre la superficie del suelo y las conidias son distribuidas en forma natural por las tormentas de aire y por actividades relacionadas con remoción de la tierra como los trabajos de construcción y cultivo, búsqueda de muestras arqueológicas y desastres naturales como los terremotos (89).

1.4 Infección clínica

Cerca de un 60 % de las personas infectadas son asintomáticas y la única evidencia de que tuvieron la infección coccidioidal es por la positividad de una prueba cutánea. El 40 % restante desarrolla síntomas de una infección pulmonar primaria una a tres semanas después de la exposición. Esta infección respiratoria y/o sistémica se caracteriza por presentar los siguientes síntomas: tos, fiebre, dolor torácico, producción de esputo, malestar, escalofríos, sudoraciones nocturnas, anorexia, debilidad y artralgias. A pesar de que la enfermedad dura varias semanas, esta infección primaria puede resolverse. Si la infección pulmonar aguda no se resuelve se establece una infección pulmonar progresiva o crónica (44). Cerca de 1 % de los infectados desarrollan enfermedad diseminada (extrapulmonar), la cual puede involucrar casi cualquier órgano del cuerpo o uno o más sitios. Los órganos más afectados en la enfermedad diseminada son piel, tejidos blandos, huesos, articulaciones y meninges (40).

1.4.1 Aspectos epidemiológicos.

Existen diferencias importantes en la gravedad de la coccidioidomicosis, que se relacionan con el sexo y la raza (41). Las investigaciones de las pruebas cutáneas muestran que no existen diferencias entre los sexos en la adquisición de infecciones primarias y, que hasta la edad de la pubertad, los índices de diseminación son iguales. No obstante, en los varones adultos, el riesgo de diseminación es más alto comparado con el de las mujeres. La excepción está en la mujer embarazada, en la cual el índice de

diseminación es casi igual o excede al del varón (4, 69). Otra característica de la coccidioidomicosis es la mayor susceptibilidad en las personas con piel pigmentada. Los filipinos y los negros tienen el riesgo más alto de diseminación de la enfermedad y la proporción es considerablemente menor para los indios y los mexicanos. Los blancos tienen la menor frecuencia de diseminación (77).

1.5 Métodos de diagnóstico de *C. immitis*.

1.5.1 Examen directo.

Debido a los riesgos que implica el manejo de cultivos de *C. immitis*, el examen directo de los materiales clínicos y los estudios histopatológicos son de gran importancia en el diagnóstico de la enfermedad (42). Las esférulas maduras del microorganismo son grandes (30-60 μm) y sus paredes son muy refringentes y gruesas, cuando están presentes en las muestras biológicas, se ven con facilidad en el examen microscópico directo.

1.5.2 Cultivo.

En casos en los cuales el microorganismo no se puede demostrar mediante examen directo, se debe realizar el cultivo de la muestra biológica. El hongo crece en casi todos los medios comunes de laboratorio. En general, el desarrollo se presenta entre el tercero o cuarto día y la conidiación del séptimo al décimo día. En agar Sabouraud la

colonia es húmeda, no vellosa y grisácea al inicio de su crecimiento, pero en forma rápida se vuelve abundante y recubierta de vello. Frecuentemente, el micelio es de color blanco, pero es común que se vuelva de color parduzco con la edad. La identificación depende del hallazgo de las artoconidias rectangulares de 2 a 4 por 3 a 6 μm (84).

1.5.3 Pruebas confirmatorias.

La forma sapróbica de *C. immitis* tanto colonial como microscópicamente es parecida a la de otros hongos del suelo (*Malbranchea* spp., y *Uncinocarpus* spp.) los cuales pueden ser aislados a partir de muestras biológicas, por lo tanto se requieren pruebas adicionales para la identificación definitiva de este organismo (65). La demostración del dimorfismo térmico es el único criterio absoluto de confirmación del agente etiológico. Lo cual puede llevarse a cabo mediante el uso de uno los siguientes procedimientos.

1.5.3.1 Infección en animales de laboratorio.

La enfermedad experimental se puede producir en muchos animales de laboratorio. Con la administración intravenosa, intraperitoneal o intranasal de 100 a 500 artoconidias de *C. immitis* se produce la enfermedad rápidamente mortal (24). Se hacen tinciones de hematoxilina eosina a partir de cortes de hígado y bazo para la búsqueda de esférulas y endosporas. Esta prueba tiene la desventaja de que es costosa, no se realiza rutinariamente en los laboratorios clínicos, además muchos laboratorios no están

equipados para el mantenimiento de una colonia de animales y es tardada ya que requiere de 1 a 3 semanas para la confirmación del agente etiológico.

1.5.3.2 Cultivo de esférulas.

Converse describió en 1957 un medio químicamente definido a base de una mezcla de sales, glucosa y un detergente (tamol) en el cual la fase micelial de *C. immitis* se convierte a la fase de esférulas endosporulantes (13). El cultivo requiere continua agitación a 40 °C y un 5 % de CO₂. Este procedimiento obvia la necesidad de la infección en animales, pero el método no es consistente en la transformación hacia la fase parasítica y los cultivos son muy peligrosos pues frecuentemente persisten fragmentos hifales.

1.5.3.3 Prueba de inmunoidentificación.

Con el fin de evitar los peligros en el manejo de cultivos vivos de *C. immitis*, Kaufman y col. desarrollaron la primera prueba rápida confirmatoria para este hongo (43). La prueba del exoantígeno o inmunoidentificación esta basada en la interacción entre antígenos liberados por el hongo en los cultivos y los anticuerpos homólogos que son específicamente generados para precipitarlos. A pesar de que el ensayo tiene un 100% de sensibilidad y especificidad, la prueba requiere cultivos de 7 a 10 días de incubación o 25 mm diámetro y el procedimiento demanda alrededor de 5 días.

1.5.3.4. Prueba de ácido desoxirribonucleico.

Más recientemente se han introducido las pruebas de ADN para la rápida identificación de *C. immitis*. Las pruebas usan una sonda de una cadena de ADN quimioluminiscente que es complementaria a secuencias específicas de ARN ribosomal del hongo. Cuando el ARN ribosómico es liberado del microorganismo el ADN marcado se combina con el ARN ribosomal para formar un híbrido estable de ADN-ARN que son medidos en un luminómetro (44). El procedimiento requiere colonias de 1 a 2 mm² y demanda alrededor de 2 h. A pesar que la prueba tiene una sensibilidad y especificidad de 100% es más costosa que la prueba del exoantígeno.

1.6 Tratamiento.

La coccidioidomicosis está caracterizada por un espectro de enfermedades que va desde una infección primaria no complicada de tracto respiratorio que se resuelve espontáneamente hasta una enfermedad pulmonar progresiva o diseminada. Por esta razón, el manejo médico varía ampliamente de paciente a paciente (80). La coccidioidomicosis puede ser manejada sin terapia específica, o puede ser tratada médicamente o quirúrgicamente. La decisión de administrar tratamiento y que tipo de terapia se va a aplicar depende del estado de la enfermedad, el reconocimiento de los factores de riesgo que influyen en la enfermedad y la naturaleza de las lesiones (25).

1.6.1 Antifúngicos convencionales.

Los individuos quienes desarrollan enfermedad pulmonar progresiva o enfermedad diseminada requieren terapia antifúngica. Varios compuestos antifúngicos están disponibles para tratar a la coccidioidomicosis. La anfotericina B (ANFB), el fluconazol (FLU) y el itraconazol (ITRA) han demostrado ser agentes activos para el tratamiento de muchas de las manifestaciones de esta enfermedad.

1.6.1.1 Polienos.

La ANFB fue la primera droga efectiva en la terapia de coccidioidomicosis pulmonar crónica o coccidioidomicosis diseminada (19, 25, 49). La ANFB es un polieno macrolido producido por un actinomiceto del suelo llamado *Streptomyces nodosus*. El compuesto es anfotérico, posee una cadena polihidroxilada hidrofílica y una cadena hidrocarbonada poliénica lipofílica (83). Debido a su pobre solubilidad en agua, la formulación clínica (Fungizone) consiste de micelas de ANFB acomplejadas con desoxicolato de sodio como agente solubilizante. La ANFB ejerce su acción por la unión al ergosterol de la membrana plasmática fúngica, incrementando la permeabilidad celular y promoviendo la pérdida de potasio y la salida de otras sustancias celulares y subsecuentemente la muerte celular (28). También interactúa con esteroides de la célula animal como el colesterol, lo cual contribuye para su conocida toxicidad. La ANFB ha permanecido como la droga de elección en infecciones fúngicas invasivas por mas de 40 años principalmente debido a su amplio espectro de actividad, razón por la cual ha sido considerada como el estándar de oro de la terapia (28, 29). Sin embargo, la utilidad de este polieno ha sido limitada, debido a su significativa toxicidad.

La aplicación de ANFB está asociada con un número de eventos adversos. Los efectos adversos agudos o aquellos relacionados con la infusión como fiebre, escalofríos, cefalea, tromboflebitis, se presentan entre un 70 a 90 % de los pacientes y usualmente empiezan de 1 a 3 h después de empezar la administración (6). El manejo médico de estos síntomas usualmente es suficiente para permitir la continuación del tratamiento (26). Los efectos adversos crónicos más importantes son insuficiencia renal en asociación con azoemia, acidosis tubular renal y desequilibrio electrolítico. Esto puede ser lo suficientemente severo como para llevar a una reducción en la dosis o a discontinuar prematuramente la droga. El daño de la función renal usualmente sobreviene dentro de las dos primeras semanas de tratamiento y puede presentarse en alrededor del 80% de los pacientes. La función renal puede retornar a niveles pre-tratamiento en algunos pacientes después de cesar la terapia. No obstante, si la dosis total de ANFB excede 3 a 5 g, el daño renal es generalmente irreversible (28).

La nistatina (NIS) es otro polieno macrólido derivado del metabolismo de *Streptomyces noursei*. Tiene estructura química y mecanismo de acción similar a la ANFB. Es activa contra un amplio espectro de hongos incluyendo, *C. albicans*, *C. immitis*, *C. neoformans* e *H. capsulatum*. La administración intravenosa de NIS está relacionada con reacciones tóxicas agudas y crónicas (72). Por esta razón, la aplicación clínica ha estado grandemente limitada a su uso tópico en piel y mucosas. Actualmente la NIS es utilizada para el tratamiento de candidiasis cutánea, oral y vaginal.

1.6.1.2 Azoles.

El miconazol (MICO) fue la primera alternativa a la administración de ANFB para el tratamiento de la coccidioidomicosis. Este agente fue eficaz y no presentó los

efectos tóxicos crónicos relacionados con la ANFB. Sin embargo, los efectos tóxicos agudos, la pobre solubilidad del compuesto, su rápida eliminación de la sangre, la necesidad de hospitalización de los pacientes, la baja tasa de respuesta en los pacientes con coccidioidomicosis y las frecuentes recaídas, limitaron grandemente el uso de este agente antifúngico (81).

La aparición en el mercado del ketoconazol (KETO) verdaderamente revolucionó en 1980 el tratamiento de la coccidioidomicosis (22, 23). La administración oral, la escasez de nefrotoxicidad y el tratamiento sin hospitalización hicieron de esta droga una alternativa muy atractiva frente a la ANFB. Sin embargo, su pobre eficacia terapéutica en pacientes con coccidioidomicosis (20-30%) y su marcada toxicidad (náusea, ginecomastia, azospermia e impotencia) al incrementar la dosis, estimularon la investigación de mejores alternativas. El FLU y el ITRA fueron los primeros triazoles introducidos en el tratamiento de la coccidioidomicosis en la década de los 90's (8, 32, 85). Actúan inhibiendo la síntesis de ergosterol al bloquear 14α demetilasa. La consecuente acumulación de esteroides no permite el metabolismo celular en la mayoría de los patógenos fúngicos. La respuesta clínica es lenta consiguiendo remisión en la mayoría de los pacientes hasta a los 12 meses de tratamiento. Ambos triazoles son bien tolerados, con muy pocos efectos adversos aún en tratamientos prolongados. Los triazoles han sido usados como tratamiento de infecciones pulmonares moderadas, para prevenir la diseminación de la enfermedad, para tratar formas limitadas de coccidioidomicosis diseminada y en el seguimiento de pacientes que no respondieron o respondieron parcialmente a la terapia con ANFB. La eficacia terapéutica en pacientes con coccidioidomicosis es alrededor del 60 % y las recaídas ocurren en cerca de un tercio de los pacientes tratados (19).

1.6.2 Antifúngicos en investigación.

Para contrarrestar las limitaciones en la terapia antifúngica actual, una serie de iniciativas terapéuticas han lanzado diversas formulaciones que no han sido valoradas en su eficacia terapéutica contra la *coccidioidomycosis*.

1.6.2.1 Polienos.

La pobre solubilidad en agua y la excelente solubilidad en lípidos ha hecho de los polienos los candidatos ideales para estudios de interacción lípido-droga (88). Tres formulaciones lipídicas de ANFB están en el campo de la investigación: anfotericina B complejo lipídico (ANFBCL), anfotericina B dispersión coloidal (ANFBDC), anfotericina B liposomal (ANFBL). Todas estas preparaciones parecen similares en el hecho que tienen un compartimiento compuesto por un antifúngico terapéuticamente activo, así como un compartimiento lipídico no terapéuticamente activo. Sin embargo, estas formulaciones lipídicas difieren ampliamente en la composición del acarreador, el contenido poliénico, la proporción molar polieno:acarreador, el tamaño de la partícula y la forma como el polieno interactúa con el lípido (39, 57).

Las preparaciones han sido desarrolladas específicamente para mejorar la *distribución en tejidos*, reducir la toxicidad de las formulaciones convencionales y mantener o mejorar la potencia terapéutica (88). Esto permite la administración de mayores dosis de droga con *menos efectos adversos*, resultando en una alternativa *mas segura y efectiva*.

Actualmente estas formulaciones están indicadas en pacientes que requieren ANFB y tienen una insuficiencia renal pre-existente, en pacientes con *alto riesgo de desarrollar*

nefrotoxicidad, en paciente intolerante a la ANFB y en pacientes cuya infección no ha mejorado después de la administración de ANFB (78).

Por otro lado, el éxito de las nuevas preparaciones de ANFB ha estimulado el interés en el desarrollo de una preparación parenteral menos tóxica de nistatina (NIS). La nueva formulación NIS en liposomas ha demostrado que puede administrarse intravenosamente a ratones con evidencia de buena actividad antifúngica y reducida toxicidad (56).

1.6.2.2 Triazoles

Las limitaciones en la eficacia y/o tolerabilidad de los triazoles actuales han estimulado la investigación de nuevos y mas potentes compuestos para proporcionar mas opciones terapéuticas frente a un amplio rango de agentes etiológicos y frente a una amplia variedad de situaciones clínicas. El voriconazol (VORI) (UK 109-496) es un compuesto triazólico derivado del FLU, del cual se reemplazó una molécula de triazol por un grupo fluoropirimidina y un grupo metilo añadido al esqueleto de propanol (53). Este cambio estructural dio por resultado un compuesto que exhibe una potente actividad antifúngica contra una diversidad de agentes patógenos y oportunistas fúngicos que comprenden *Candida* spp., incluyendo aquellas cepas que son resistentes al FLU, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. (21, 46, 54, 55, 90). Algunos estudios han descrito actividades fungistáticas y fungicidas contra *Aspergillus* spp. (58). La disponibilidad de formulaciones intravenosa y oral en investigación coloca a este triazol como un compuesto que tendrá un impacto significativo en el manejo de las infecciones fúngicas.

El posaconazol (POSA) (SCH 56592) es un nuevo triazol, es un derivado hidroxilado del ITRA (67). Posee un amplio espectro de actividad antifúngica contra una variedad de patógenos filamentosos y levaduras que incluyen *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Ramichloridium ohovoideum* (2, 14, 27, 45, 50, 52, 64, 68, 79).

Recientes estudios farmacocinéticos en voluntarios sanos han demostrado que POSA es bien tolerado, con una vida media prolongada que varía entre 19 y 30 horas, con excelente absorción después de su administración oral y que los niveles séricos de este antifúngico son superiores a la CMI de la mayoría de los patógenos fúngicos (63). Ambos triazoles actúan uniéndose a la enzima 14- α -esterol demetilasa, lo cual impide la conversión de lanosterol a ergosterol. Este efecto altera la función y permeabilidad de la membrana citoplasmática fúngica, impidiendo el desarrollo celular.

1.6.2.3 Péptidos.

La investigación de agentes antifúngicos que posean toxicidad selectiva contra la célula fúngica eucariótica es un importante reto científico. Aunque el tratamiento de las enfermedades micóticas ha progresado, la mayoría de los compuestos disponibles actúan sobre blancos que también se encuentran en las células del ser humano. La pared celular de los hongos es un blanco que terapéuticamente puede ser muy importante, ya que tiene componentes que no se encuentran en las células de los humanos (15, 16). En general, la pared celular está compuesta de glucanas, mananas y quitina, todos estos componentes juegan un importante papel en el mantenimiento de la integridad estructural de las células fúngicas.

Se han desarrollado una serie de compuestos que afectan la pared celular fúngica (38). Dentro de estas drogas se encuentra la caspofungina (CAS) (MK-0991), que previene la síntesis de pared celular bloqueando la β -1,3-glucan sintetasa (18, 48). El efecto es altamente específico y la breve exposición con la droga conduce a muerte celular, este grupo de drogas pueden representar el más importante avance en la terapia antifúngica desde el desarrollo del KETO. CAS ha demostrado ser muy eficaz *in vitro* (17) e *in vivo* en el tratamiento de aspergilosis, candidiasis e histoplasmosis sistémicas (1, 33, 34).

1.7 Pruebas de susceptibilidad con antifúngicos.

Una de las funciones del laboratorio de microbiología clínica es la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobianas en un determinado aislamiento. Para muchos clínicos, los resultados de estas pruebas son con frecuencia considerados tan importantes o más importantes aún que la identificación misma del patógeno involucrado (74). Esto es particularmente cierto en una era que muestra aumento en la resistencia antimicrobiana y en la que las opciones terapéuticas están a veces limitadas a los más nuevos y costosos antimicrobianos.

Uno de los objetivos de una prueba de susceptibilidad *in vitro* es ayudar en la predicción del efecto de un agente antimicrobiano de interés sobre la infección en un paciente con un patógeno específico, razón por la cual estas pruebas son consideradas como una valiosa guía para el clínico en la elección del compuesto más activo. Las pruebas de susceptibilidad también son útiles en el descubrimiento y en el posterior desarrollo de drogas así como en el monitoreo de poblaciones microbianas para el

reconocimiento de el desarrollo de resistencia entre una población inicialmente susceptible (71).

Las pruebas de susceptibilidad con antifúngicos son de diseño similar a las empleadas con antibacterianos, pero existen ciertas diferencias que hacen algo mas difíciles a las primeras (66). Las pruebas están influenciadas por diferentes tipos de variables, algunas relacionadas con el procedimiento de laboratorio elegido, dentro de este grupo se encuentran: la concentración y preparación de los inóculos, el medio de cultivo, el buffer, el pH, el tiempo y la temperatura de incubación y los criterios usados en la lectura para la determinación del punto final. Otro tipo de variables son aquellas implícitas con las características propias de los hongos, tales como su lenta tasa de crecimiento, las diferencias en el tipo de estructuras reproductivas, el dimorfismo, la producción de pigmentos y exudados durante su crecimiento y los requerimientos de temperatura específicos para su desarrollo. Finalmente, se encuentran las variables relacionadas con las propiedades básicas de los antifúngicos, como son: la solubilidad, la estabilidad química, la fotosensibilidad y la tendencia de algunos antimicóticos de producir inhibición parcial del crecimiento sobre un amplio rango de concentraciones. El desconocimiento de estas variables o el poco control ejercido sobre ellas hizo que en el pasado los resultados de estas pruebas fueran consideradas como desorientadores para el clínico, debido a la poca correlación observada entre los resultados *in vitro* y la respuesta en el manejo terapéutico de un paciente (26).

Por tales razones, en 1982 el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) en Estados Unidos de Norteamérica se inició una serie de estudios de susceptibilidad con antifúngicos que culminaron en 1992 con el desarrollo de un documento M27-P (59). Este documento fue la propuesta de estandarización de un

método de macrodilución en caldo para pruebas de susceptibilidad con antifúngicos en *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans*. Pasando por el proceso de evaluación del NCCLS el documento ascendió al nivel tentativo M27-T en 1995 (60) y a nivel aprobado M27-A en 1997 (61).

En 1998, el documento a nivel propuesta denominado M38-P describe las condiciones óptimas para las pruebas de susceptibilidad con hongos filamentosos (62). La estandarización ha sido realizada en hongos como: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizopus arrhizus* y *Pseudallescheria boydii*.

Para la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*, se requiere conocimiento acerca de la concentración del inóculo, ya que la escasez en la estandarización ha sido reportado como causa de variaciones en la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima letal (CML) (30, 73). Además de la concentración del inóculo, es conveniente especificar la forma del hongo filamentosos que se utiliza en los ensayos de susceptibilidad, ya que algunos investigadores han citado diferencias de la CMI y la CML dependiendo del uso de inóculos hifales o inóculos conidiales. Bezjak utilizó inóculos hifales y conidiales de *A. fumigatus* y *A. flavus* en las pruebas de susceptibilidad frente a ANFB (7). Variaciones de una dilución entre los inóculos conidiales y los inóculos hifales no representaron una diferencia significativa en la CMI y la CML. Sin embargo, Guarro et al evaluaron la CMI y la CML de ANFB, KETO, 5-FC, MICO e ITRA contra hongos oportunistas, tales como *Scopulariopsis* spp., *Paecilomyces* spp., *Cladosporium* spp. y *Cladophialophora* spp., usando inóculos con conidias e hifas independientemente. Contrario a Bezjak, Guarro demostró variaciones de CMI y CML dependiendo de la forma del hongo utilizado en los inóculos. Los inóculos hifales arrojaron resultados más altos que los inóculos conidiales (35).

Por otro lado, Manavathu et al mostraron que los inóculos a partir de conidias ya sea germinadas o no germinadas de *A. fumigatus* fueron igualmente susceptibles a la acción inhibitoria y fungicida de ANFB, ITRA, VORI y POSA (51).

Por lo anteriormente descrito se puede concluir que hay un desacuerdo sustancial acerca de la forma mas apropiada del hongo para ser utilizada en las determinaciones de CMI y CML.

Debido a lo anteriormente expuesto, es importante realizar la estandarización de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* que puedan utilizarse como un instrumento valioso en la predicción del efecto de un agente antimicrobiano determinado sobre una infección por *C. immitis*. Además, ya que en este momento se tienen grandes limitaciones en la terapia de la coccidioidomicosis es una tarea imprescindible estudiar la eficacia terapéutica *in vivo* de las nuevas formulaciones.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general.

Determinar si existe correlación entre los datos de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* y el resultado del tratamiento antifúngico en un modelo de coccidioidomicosis murina.

1.8.2 Objetivos específicos.

1. Determinar la concentración de UFC/mL en inóculos ajustados a diversos porcentajes de transmitancia con diferentes estadios morfológicos de la fase sapróbica de *C. immitis*.
2. Evaluar la variabilidad del método espectrofotométrico para la preparación de inóculos en las pruebas de susceptibilidad con *C. immitis*.
3. Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de nuevas formulaciones de polienos, azoles y péptidos y la de sus compuestos antecesores contra aislamientos clínicos de *C. immitis* utilizando los tres diferentes estadios morfológicos de la fase sapróbica:

Nuevas formulaciones

Compuestos antecesores

Anfotericina B complejo lipídico

Anfotericina B

Anfotericina B dispersión coloidal

Anfotericina B liposomal

Nistanina liposomal

Nistatina

Voriconazol

Fluconazol

Posaconazol

Itraconazol

Caspofungina

4. Establecer la influencia de las diferentes formas fúngicas de *C. immitis* utilizadas en los inóculos sobre los resultados de la CMI y la CML en las pruebas de susceptibilidad con los diversos antifúngicos.
5. Comparar la actividad *in vitro* de los compuestos antecesores y los respectivos compuestos derivados.
6. Determinar la DL₅₀ y DL₉₀ de las cepas de *C. immitis* clasificadas como resistentes y susceptibles para cada antifúngico en base a los resultados de CMI y CML en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.
7. Evaluar los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos anteriores de *C. immitis* y el impacto de tratamiento antifúngico *in vivo*.

1.9 Hipótesis

Los datos obtenidos de CMI y CML en las prueba de susceptibilidad *in vitro* con cepas de *C. immitis*, permiten predecir el efecto del tratamiento con compuestos antifúngicos *in vivo*, utilizando un modelo animal.

1.10 Justificación

Actualmente se considera que la terapia de la coccidioidomicosis tiene limitaciones significativas en términos de su toxicidad y de su pobre índice terapéutico.

Ante la multiplicidad de opciones terapéuticas, surge la creciente necesidad de implementar pruebas de susceptibilidad *in vitro*, que puedan utilizarse para ayudar en la selección de la mejor estrategia terapéutica en un paciente dado.

Es imperante la evaluación *in vitro* e *in vivo* de nuevas drogas antifúngicas, para determinar su probable utilidad en el tratamiento de la coccidioidomicosis.

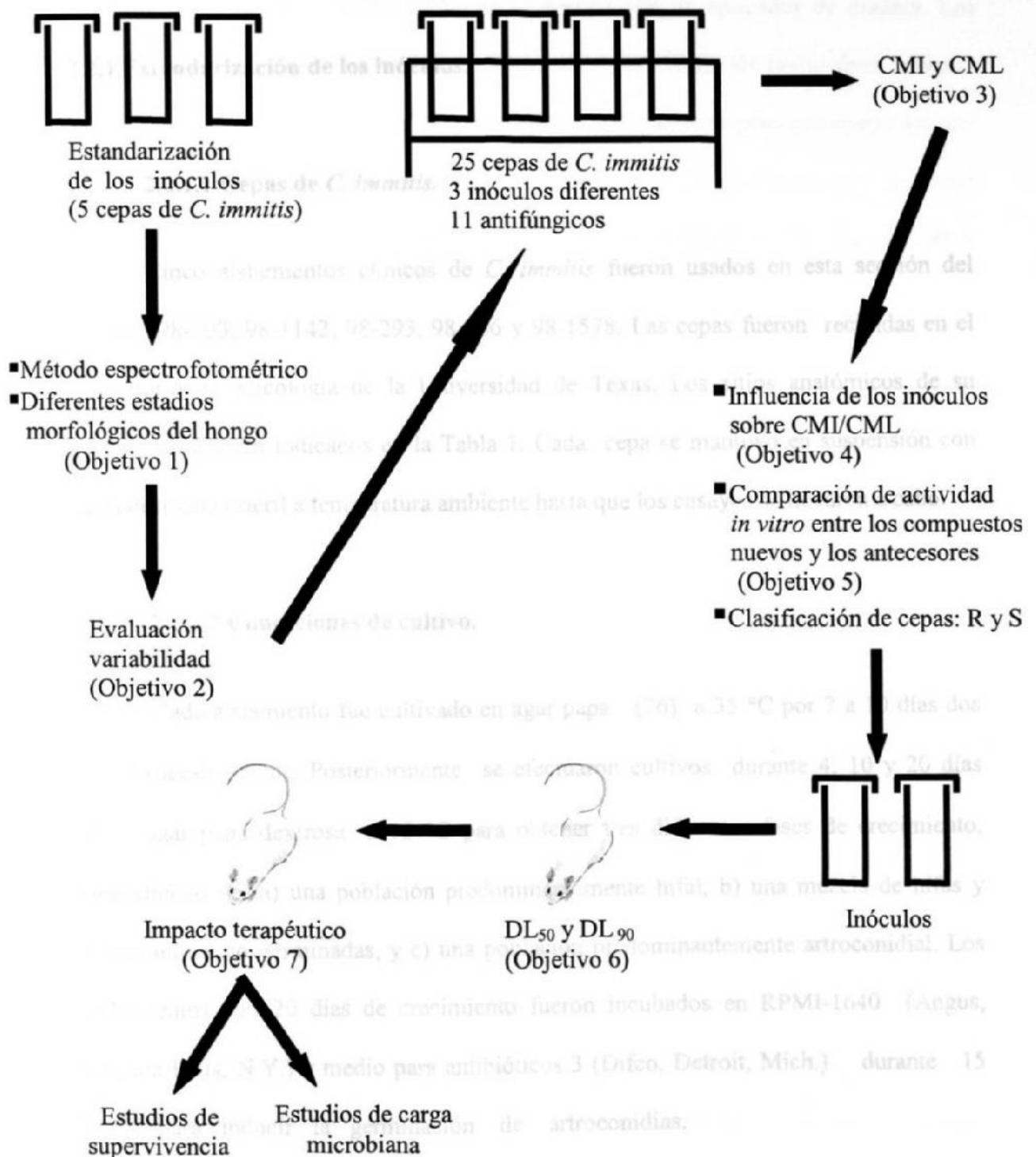
CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Estrategia general

En la figura 1 se muestra la estrategia general que seguimos para cumplir con los objetivos específicos que se plantearon. Trabajamos la estandarización de los inóculos con tres estadios morfológicos de la fase sapróbica de *C. immitis* para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Así tuvimos información de la concentración de los inóculos y la variabilidad intra e inter días. Posteriormente llevamos a cabo la determinación de la actividad *in vitro* de 11 compuestos antifúngicos contra 25 cepas de *C. immitis* en sus tres estadios morfológicos previamente estudiados. Los resultados de la CMI y la CML nos permitieron comparar la potencia de las nuevas formulaciones con respecto a los compuestos antecesores, así como, determinar la influencia que pudiera tener el uso de inóculos con diferente morfología del hongo sobre los resultados de la CMI y la CML. Posteriormente, llevamos a cabo la clasificación de cepas en resistentes y susceptibles a cada compuesto antifúngico. Determinamos las DL_{50} y DL_{90} para 6 cepas seleccionadas para los estudios *in vivo*. Después medimos la eficacia terapéutica de varios antifúngicos mediante estudios de supervivencia y estudios de carga microbiana. Por último, se realizó el análisis estadístico para evaluar la correlación entre los resultados *in vitro* de las pruebas de susceptibilidad y la información obtenida *in vivo* a partir de los estudios de eficacia terapéutica.

Figura 1. Esquema de la estrategia general seguida para la determinación de la correlación entre las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de *C. immitis* y el tratamiento antifúngico en un modelo animal.



2.2 Estudios *in vitro*.

2.2.1 Estandarización de los inóculos.

2.2.1.1 Cepas de *C. immitis*.

Cinco aislamientos clínicos de *C. immitis* fueron usados en esta sección del trabajo: 98-703, 98-1142, 98-293, 98-706 y 98-1578. Las cepas fueron recibidas en el laboratorio de Micología de la Universidad de Texas. Los sitios anatómicos de su recuperación están indicados en la Tabla 1. Cada cepa se mantuvo en suspensión con agua destilada estéril a temperatura ambiente hasta que los ensayos se llevaron a cabo.

2.2.1.2 Condiciones de cultivo.

Cada aislamiento fue cultivado en agar papa (76) a 35 °C por 7 a 10 días dos veces sucesivamente. Posteriormente se efectuaron cultivos durante 4, 10 y 20 días sobre agar papa dextrosa a 35 °C para obtener tres diferentes fases de crecimiento, consistiendo de: a) una población predominantemente hifal, b) una mezcla de hifas y artroconidias no germinadas, y c) una población predominantemente artroconidial. Los aislamientos con 20 días de crecimiento fueron incubados en RPMI-1640 (Angus, Niagara Falls, N.Y.) y medio para antibióticos 3 (Difco, Detroit, Mich.) durante 15 horas para inducir la germinación de artroconidias.

2.2.1.3 Suspensiones de los inóculos.

El crecimiento fúngico se cubrió con agua destilada estéril y se realizaron suspensiones mediante raspado suave de la colonia con un aplicador de madera. Los fragmentos fúngicos grandes se dejaron sedimentar y la suspensión homogénea restante se transfirió a tubos estériles. Las suspensiones conteniendo independientemente los tres estadios morfológicos de la fase sapróbica de *C. immitis* se ajustaron espectrofotométricamente (Spectronic 21; Milton Roy Company) a 75, 80, 85, 90 y 95 % de transmitancia a 530 nm.

2.2.1.4 Determinación de UFC/mL.

Cada suspensión fue diluida 1:10 y 1:100 con agua destilada estéril y 100 µL de cada dilución se sembraron en placas de agar Sabouraud a 35 °C durante 48 h para determinar las UFC/mL en cada suspensión.

Todo el proceso de estandarización de los inóculos se llevó a cabo tres veces en un mismo día y durante tres días diferentes.

2.2.1.5 Análisis estadístico.

Se determinó la media, desviación estándar y el coeficiente de variación con las UFC/mL de los diferentes estadios morfológicos del hongo obtenidas a diferentes porcentos de transmitancia para los ensayos de 3 muestras diferentes dentro de un mismo día (variación intra día), así como los ensayos de tres días diferentes (variación inter día).

2.2.2 Susceptibilidad antifúngica.

2.2.2.1 Cepas de *C. immitis*.

Las 25 cepas de *C. immitis* usadas en esta parte del estudio fueron obtenidas del laboratorio de Micología de la Universidad de Texas (ver Tabla 1). Los aislamientos fueron identificados como *C. immitis* mediante examen de morfología macroscópica y microscópica y la confirmación de su identidad se realizó mediante sondas de ADN (Accu Probe). Cada aislamiento permaneció en agua destilada estéril a temperatura ambiente hasta que los ensayos se llevaron a cabo.

2.2.2.2 Agentes antifúngicos.

Los antifúngicos probados fueron obtenidos de sus respectivas compañías farmacéuticas, estos fueron: ANFB (Bristol-Myers Squibb, Princeton, N. J.), ANFBCL (The Liposome, Princeton, N. J.), ANFBDC (Sequus Pharmaceuticals, Menlo Park, Calif.), ANFBL (NexStar Pharmaceuticals, San Dimas, Calif.), NIS (Sigma Chemical Co. St. Luis, Mo.), NISL (Aronex Pharmaceuticals, The Woodlands, Tex.), ITRA (JanssenPharmaceutica, Beerse, Belgium), POSA (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, N. J.), FLU (Pfizer Central Research, Groton, Conn.), VORI (Pfizer Central Research, Groton, Conn.), CAS (Merck Research Laboratories, Rahway, N.J.). Se prepararon diluciones seriadas de cada agente antifúngico y 0.1 ml de cada

dilución se colocó sobre tubos tapón de rosca (12 × 75) y permanecieron a -70 °C hasta que fueron utilizados.

2.2.2.3 Prueba de macrodilución.

Los aislamientos de *C. immitis* fueron evaluados usando el método de referencia macrodilución en caldo M38-P del NCCLS (62). Las cepas de *C. immitis* se cultivaron en agar papa, se incubaron a 35 °C durante 4, 10 y 20 días. Las colonias fúngicas se cubrieron con agua destilada estéril y las suspensiones se prepararon mediante el desprendimiento del micelio utilizando un aplicador de madera. Los fragmentos pesados se dejaron sedimentar y la parte superior homogénea fue transferida a tubos estériles. Las suspensiones hifales y/o conidiales fueron ajustadas espectrofotométricamente a 95 % de transmitancia a una longitud de onda de 530 nm. Las diferentes suspensiones fueron diluidas 1:10 en RPMI-1640 o medio para antibióticos 3. Los tubos con 0.1 ml de la droga antifúngica fueron inoculados con 0.9 mL de las suspensiones. Los tubos fueron incubados a 35 °C y las CMI y las CML fueron leídas a 24 y 48 h. Para los polienos la CMI fue definida como la concentración mas baja de droga que mostrara ausencia de crecimiento. Para los triazoles y el péptido la CMI fue definida como la más baja concentración de droga que mostrara un 80 % o más de reducción en el crecimiento al compararla con el tubo control libre de droga. La CML se llevó a cabo solo con los compuestos poliénicos y se definió como la más baja concentración de compuesto antifúngico que presentara un crecimiento de 5 o menos colonias sobre las placas de

Tabla 1. Cepas de *C. immitis* y sus orígenes obtenidas del laboratorio de Micología de la Universidad de Texas.

UTHSC #	ORIGEN
98-1884	Secreción de espalda
98-1895	Identificación de cepa
98-571	Líquido cefalorraquídeo
98-573	Sangre
98-1002	Líquido cefalorraquídeo
98-1889	Espujo
97-2532	Secreción de muñeca
98-1193	Lavado bronquial
98-1037	Identificación de cepa
98-1696	Espujo
98-7	Líquido cefalorraquídeo
98-293	Líquido cefalorraquídeo
98-706	Sangre
98-449	Biopsia pulmonar
98-1194	Biopsia pulmonar
97-960	Lavado bronquial
98-1412	Sangre
98-1142	Biopsia pulmonar
98-703	Biopsia pulmonar
98-572	Secreción de rodilla
97-2036	Espujo
98-1578	Absceso de pulmón
98-1208	Secreción de rodilla
97-817	Líquido cefalorraquídeo
97-1089	Absceso de axila

agar Sabouraud. Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. En la Tabla 2 se muestran las concentraciones utilizadas para cada compuesto antifúngico, así como las sustancias diluyentes y los medios de cultivos empleados en la determinación de susceptibilidad *in vitro*.

En el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* incluimos las cepas de *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Paecilomyces variotii* UT 90-459 cada vez que se llevaron a cabo las pruebas (5). Los rangos de susceptibilidad aceptados para los antifúngicos correspondientes se muestran en la Tabla 3. Los ensayos se trabajaron siguiendo los criterios de bioseguridad de un laboratorio nivel 3 (86).

2.2.2.4 Análisis estadístico.

Se determinó la media geométrica de la CMI y la CML para cada compuesto antifúngico ensayado y para cada estadio morfológico del ciclo sapróbico de *C. immitis*.

Tabla 2. Condiciones empleadas en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

ANTIFÚNGICO	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	DILUYENTE	MEDIO DE CULTIVO
ANFB	0.03-16	agua	MA-3
ANFBCL	0.03-16	agua	MA-3
ANFBDC	0.03-16	agua	MA-3
ANFBL	0.03-16	agua	MA-3
NIS	0.06-32	agua	MA-3
NISL	0.06-32	agua	MA-3
FLU	0.125-64	agua	RPMI-1640
VORI	0.125-64	peg	RPMI-1640
ITRA	0.015-8	peg	RPMI-1640
POSA	0.015-8	peg	RPMI-1640
CAS	0.125-64	agua	RPMI-1640

MA-3 = Medio para antibióticos 3, peg = polietilenglicol

Condiciones de incubación: temperatura = 35 ° C y

tiempo = 24 y 48 h

2.3 Estudios *in vivo*.

Tabla 3. Cepas de control de calidad y su rango de susceptibilidad *in vitro*.

2.3.1 Determinación de DI_{50} y DI_{90}

Antifúngico ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)	<i>Paecilomyces variotii</i> (UTHSC 90-459)
ANFB	0.25-1	0.5-2	0.5-1
FLU	2-8	16-64	4-8
ITRA	0.06-0.25	0.125-0.5	0.015-0.06
KETO	0.06-0.25	0.125-0.5	1-2
5-FC	0.125-0.5	4-16	8-16

2.3.1.2 Preparación de los inoculos.

2.2.2.5 Clasificación de las cepas.

Las cepas de *C. lusitana* seleccionadas para los estudios *in vitro* se sembraron en placas Petri con agar papa a 35 °C durante 4 a 6 horas. Las placas se incubaron a una placa mandarina. Las colonias se cultivaron en caldo de papa y se sembraron en una placa de vidrio estéril. Esto se hizo para mantener las hifas. A partir del filtrado se cuenta de artroconidias en un hematócrito.

2.3 Estudios *in vivo*.

2.3.1 Determinación de DL₅₀ y DL₉₀

2.3.1.1 Cepa de ratones.

Ratones ICR machos (Harlan Sprague Dawley Inc.) de 4 a 6 semanas de edad y con 25 a 30 g de peso, fueron utilizados para los estudios *in vivo*. Grupos de 10 ratones fueron incluidos en cada inóculo para la determinación de la DL₅₀ y DL₉₀. También, grupos de 10 ratones fueron reunidos para los tratamientos o controles en los estudios de supervivencia y en los estudios de carga microbiana. Se colocaron 5 ratones por jaula con suficiente agua y alimento durante todos los experimentos.

2.3.1.2 Preparación de los inóculos.

Las cepas de *C. immitis* seleccionadas para los estudios *in vivo*, se sembraron en placas Petri con agar papa a 35 °C durante 4 a 6 semanas. Las placas se colocaron sobre una placa magnética y las colonias se cubrieron con solución salina 0.85 %. El micelio se removió utilizando un magneto. La suspensión se transfirió a una columna con fibra de vidrio estéril, esto con el objeto de retener las hifas. A partir del filtrado se realizó la cuenta de artroconidias en un hematocitómetro.

2.3.1.3 Inoculación a ratones.

Se prepararon diluciones con 250, 500, 1000 y 2500 arthroconidias/mL. Se efectuaron cultivos cuantitativos a partir de las diluciones para confirmar la concentración de los inóculos. Los ratones recibieron una inyección intravenosa de 0.2 mL con los diferentes inóculos.

2.3.1.4 Registro de mortalidad.

Los animales muertos fueron registrados a lo largo de 30 días post infección. Los ratones moribundos fueron sacrificados y sus muertes se registraron como si hubieran sucedido al día siguiente.

2.3.2 Determinación de eficacia terapéutica.

2.3.2.1 Estudio de supervivencia.

2.3.2.1 Modelo animal.

Un modelo de coccidioidomicosis sistémica previamente descrito fue utilizado en esta investigación (24). Los ratones recibieron una inyección intravenosa de la DL_{50} en 0.2 mL de solución salina con las diferentes cepas de *C. immitis*, independientemente. Se realizaron cultivos cuantitativos de diluciones seriadas para confirmar la concentración del inóculo.

Los diversos tratamientos con los compuestos antifúngicos fueron administrados dos días post-infección. El seguimiento de los animales fue de 50 días. Al final de cada estudio, los animales sobrevivientes fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Bazo e hígado fueron removidos asépticamente. Los órganos fueron homogenizados en 2 mL de solución salina estéril y los órganos completos fueron colocados en placas de agar Sabouraud e incubados a 35 °C por una semana.

2.3.2.2. Regímenes terapéuticos.

En la Tabla 4, se muestran las dosis, vías de administración y duración del tratamiento para cada compuesto antifúngico utilizadas en los estudios de supervivencia. Todas las formulaciones lipídicas de ANFB fueron reconstituidas con solución estéril de dextrosa 5%, se prepararon una serie de diluciones para obtener las concentraciones requeridas y fueron administradas en 0.2 mL, tres veces por semana durante dos semanas. Este régimen es conocido como lunes, miércoles y viernes. El grupo control recibió 0.2 ml de la solución de dextrosa 5%.

ANFB a dosis de 0.5 mg/kg fue administrada intravenosamente y a dosis de 1 y 5 mg/kg fue aplicada intraperitonealmente. También se aplicaron las dosis tres veces por semana durante dos semanas.

POSA fue suspendido en agar Noble 0.3 % y administrado en un volumen de 0.2 mL, una vez diaria del día 2 al 22 post-infección. El grupo control recibió 0.2 mL de una suspensión de agar Noble al 0.3 %.

ITRA fue utilizada en una solución de hidroxipropil- β -ciclodextrina y diluida en agua destilada estéril para preparar las concentraciones requeridas. Se administró en un volumen de 0.2 mL, tres veces al día durante los días 2 al 22 posteriores a la infección. CAS fue reconstituida con agua destilada estéril y administrada en un volumen de 0.2 mL, una vez diariamente del día 2 al 22 post-infección. El grupo control recibió agua destilada estéril.

Tabla 4. Regímenes terapéuticos utilizados en los estudios de supervivencia.

ANTIFÚNGICO	DOSIS (mg/kg)	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DURACIÓN
ANFB	0.5, 1, 5	IV, IP	2 semanas: L, M, V
ANFBCL	1, 5, 10	IV	2 semanas: L, M, V
ANFBDC	1, 5, 10	IV	2 semanas: L, M, V
ANFBL	1, 5, 10	IV	2 semanas: L, M, V
Control	Dextrosa	IV	2 semanas: L, M, V
ITRA	10, 30	Oral	20 días
POSA	0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10	Oral	20 días
Control	Agar noble	Oral	20 días
CAS	0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10	IP	20 días
Control	Agua	IP	20 días

2.3.2.1.3 Registro de muertes.

Los animales muertos fueron registrados a lo largo de 50 días post-infección. Los ratones moribundos fueron sacrificados y sus muertes se registraron como sucedidas en el día siguiente.

2.3.2.1.4 Análisis estadístico.

Para los estudios de supervivencia se utilizó la prueba de Wilcoxon. Los valores de *P* para la determinación de significancia variaron debido a correcciones para múltiples comparaciones.

2.3.2.2 Estudio de carga microbiana.

2.3.2.2.1 Modelo animal.

Los ratones recibieron una inyección intravenosa de la DL_{90} de las diferentes cepas de *C. immitis*. Se realizaron cultivos cuantitativos de diluciones seriadas para confirmar la concentración del inóculo. Los animales fueron sacrificados el día 24 post-infección. Bazo, hígado y pulmones fueron removidos, pesados y homogenizados en 2-4 mL de solución salina estéril y diluciones seriadas fueron sembradas en placas de agar Sabouraud e incubadas a 35 °C por una semana para determinar el número de UFC en cada órgano.

2.3.2.2.2 Regímenes terapéuticos.

La Tabla 5 muestra las dosis, vías de administración y la duración de la terapia en todos los estudios de carga microbiana. Información acerca de la reconstitución de los compuestos antifúngicos y la frecuencia de las dosis está descrita en la sección de regímenes terapéuticos de los estudios de supervivencia.

2.3.2.2.3 Registro de mortalidad.

Los animales muertos fueron registrados durante 24 días post infección. Los ratones moribundos fueron sacrificados y sus muertes se registraron como sucedidas al día siguiente.

2.3.2.2.4 Análisis estadístico.

Para los estudios de carga microbiana fue utilizada la prueba de Dunnett. Un valor de P de ≤ 0.05 determinó el nivel de significancia de las diferencias con respecto al control.

Tabla 5. Regímenes terapéuticos seguidos en los estudios de carga microbiana.

ANTIFÚNGICO	DOSIS (mg/kg)	VIA DE ADMINISTRACIÓN	DURACIÓN
ANFB	0.5, 1	IV, IP	2 semanas: L, M, V
ANFBCL	1	IV	2 semanas: L, M, V
ANFBDC	1	IV	2 semanas: L, M, V
ANFBL	1	IV	2 semanas: L, M, V
Control	Dextrosa	IV	2 semanas: L, M, V
ITRA	10, 30	Oral	20 días
POSA	0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10	Oral	20 días
Control	Agar noble	Oral	20 días
CAS	0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10	IP	20 días
Control	Agua	IP	20 días

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Variabilidad de los inóculos.

3.1.1 Variación intra e inter días en inóculos con cultivos de 4, 10 y 20 días de crecimiento.

En las Tablas 6-11 se muestran las UFC/mL para los aislamientos de *C. immitis* trabajados en la estandarización de los inóculos a partir de cultivos con 4 días de crecimiento (población predominantemente hifal), 10 días de desarrollo (mezcla de hifas y artroconidias no germinadas) y 20 días de crecimiento (predominantemente artroconidias germinadas) frente a los diversos % T utilizados para la preparación los inóculos. También se muestran los coeficientes de variación. En las tablas se observa la considerable variación obtenida tanto intra día como inter días, cuando ajustamos las suspensiones espectrofotométricamente a 75, 80 y 85 % T. Unos coeficientes de variación más bajos fueron obtenidos para las suspensiones ajustadas a 90 y 95 % T.

Tabla 6. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de *C. immitis* de 4 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación intra día.

CEPAS	UFC/ mL/Coeficiente de Variación (%)				
	75 % T	80 % T	85 % T	90 % T	95 % T
98-703	$7.1 \times 10^5/54$	$6.5 \times 10^5/54$	$4 \times 10^5/42$	$1.1 \times 10^5/28$	$7.1 \times 10^4/16$
98-1142	$7.7 \times 10^5/57$	$6.9 \times 10^5/51$	$4.7 \times 10^5/42$	$9.4 \times 10^4/20$	$5.5 \times 10^4/14$
98-293	$8.5 \times 10^5/58$	$7.2 \times 10^5/51$	$5.3 \times 10^5/48$	$2.1 \times 10^5/18$	$6.6 \times 10^4/13$
98-706	$7.4 \times 10^5/62$	$7.1 \times 10^5/53$	$4.9 \times 10^5/49$	$3.4 \times 10^5/25$	$7.1 \times 10^4/14$
98-1579	$8.4 \times 10^5/50$	$6.5 \times 10^5/60$	$5.6 \times 10^5/49$	$8.8 \times 10^4/17$	$4.3 \times 10^4/12$

n = 3
1 día

Tabla 7. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de *C. immitis* de 4 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación entre días.

CEPAS	UFC/ mL/Coeficiente de Variación (%)				
	75 % T	80 % T	85 % T	90 % T	95 % T
98-703	$6.4 \times 10^5/44$	$5.7 \times 10^5/45$	$3.2 \times 10^5/32$	$7.1 \times 10^4/18$	$5.1 \times 10^4/14$
98-1142	$7 \times 10^5/47$	$6.4 \times 10^5/41$	$4.1 \times 10^5/32$	$9.2 \times 10^4/20$	$5.4 \times 10^4/15$
98-293	$7 \times 10^5/48$	$5.6 \times 10^5/41$	$2.8 \times 10^5/38$	$8.6 \times 10^4/22$	$4.3 \times 10^4/13$
98-706	$7.8 \times 10^5/52$	$6.1 \times 10^5/50$	$3.7 \times 10^5/39$	$7.7 \times 10^4/24$	$3.8 \times 10^4/14$
98-1579	$8.7 \times 10^5/40$	$7.5 \times 10^5/43$	$4.5 \times 10^5/39$	$8.5 \times 10^4/17$	$4.1 \times 10^4/12$

n = 9
3 días

Tabla 8. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de *C. immitis* de 10 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación intra día.

CEPAS	UFC/ mL/Coeficiente de Variación (%)				
	75 % T	80 % T	85 % T	90 % T	95 % T
98-703	$3.2 \times 10^6/41$	$7.1 \times 10^5/40$	$2.5 \times 10^5/34$	$8.6 \times 10^4/16$	$3.2 \times 10^4/12$
98-1142	$5.5 \times 10^6/39$	$8.6 \times 10^5/38$	$4.1 \times 10^5/34$	$8.1 \times 10^4/15$	$4.1 \times 10^4/13$
98-293	$3.7 \times 10^6/41$	$6.9 \times 10^5/38$	$3.3 \times 10^5/28$	$5.2 \times 10^4/13$	$3.8 \times 10^4/12$
98-706	$5 \times 10^6/46$	$8.4 \times 10^5/35$	$4.6 \times 10^5/29$	$6 \times 10^4/16$	$3.5 \times 10^4/12$
98-1579	$3.3 \times 10^6/37$	$7.7 \times 10^5/36$	$3.5 \times 10^5/33$	$7.1 \times 10^4/14$	$4.5 \times 10^4/13$

n = 3
1 día

Tabla 9. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de *C. immitis* de 10 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación entre días.

CEPAS	UFC/ mL/Coeficiente de Variación (%)				
	75 % T	80 % T	85 % T	90 % T	95 % T
98-703	$6.6 \times 10^6/50$	$9.5 \times 10^5/48$	$6.2 \times 10^5/38$	$8.8 \times 10^4/25$	$3.5 \times 10^4/12$
98-1142	$7.1 \times 10^6/45$	$1.2 \times 10^6/53$	$4.1 \times 10^5/42$	$7.1 \times 10^4/17$	$5.2 \times 10^4/15$
98-293	$5.9 \times 10^6/47$	$8.1 \times 10^5/51$	$5 \times 10^5/44$	$7 \times 10^4/23$	$5 \times 10^4/14$
98-706	$8.2 \times 10^6/56$	$7.2 \times 10^5/46$	$3.3 \times 10^5/39$	$6.2 \times 10^4/21$	$3.4 \times 10^4/10$
98-1579	$7.3 \times 10^6/48$	$6.1 \times 10^5/47$	$4 \times 10^5/43$	$8.1 \times 10^4/20$	$4.7 \times 10^4/13$

n = 9
3 días

Tabla 10. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de *C. immitis* de 10 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación intra día.

CEPAS	UFC/mL /Coeficiente de Variación (%)				
	75 % T	80 % T	85 % T	90 % T	95 % T
98-703	$3.2 \times 10^6/42$	$7.8 \times 10^5/44$	$2.9 \times 10^5/33$	$7.6 \times 10^4/21$	$3.1 \times 10^4/18$
98-1142	$2.1 \times 10^6/43$	$6.1 \times 10^5/43$	$1.5 \times 10^5/28$	$5.1 \times 10^4/15$	$1.2 \times 10^4/12$
98-293	$3.7 \times 10^6/42$	$4.2 \times 10^5/35$	$3.3 \times 10^5/33$	$8.2 \times 10^4/12$	$2.6 \times 10^4/12$
98-706	$2.9 \times 10^6/40$	$7.5 \times 10^5/32$	$3.7 \times 10^5/18$	$6.1 \times 10^4/11$	$2.7 \times 10^4/10$
98-1579	$1.8 \times 10^6/40$	$9.1 \times 10^5/37$	$2.2 \times 10^5/32$	$7.1 \times 10^4/15$	$3.3 \times 10^4/13$

n = 3
1 día

Tabla 11. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de *C. immitis* de 10 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación entre días.

CEPAS	UFC/ mL/Coeficiente de Variación (%)				
	75 % T	80 % T	85 % T	90 % T	95 % T
98-703	$3.9 \times 10^6/55$	$7.6 \times 10^5/48$	$2.7 \times 10^5/46$	$7.8 \times 10^4/26$	$4.3 \times 10^4/15$
98-1142	$1.1 \times 10^6/63$	$4.3 \times 10^5/44$	$1.1 \times 10^5/37$	$6.3 \times 10^4/22$	$3.6 \times 10^4/14$
98-293	$3.5 \times 10^6/52$	$5.5 \times 10^5/56$	$3.5 \times 10^5/41$	$8.1 \times 10^4/25$	$4.1 \times 10^4/16$
98-706	$2.2 \times 10^6/57$	$6.1 \times 10^5/58$	$1.5 \times 10^5/42$	$7.4 \times 10^4/19$	$3.1 \times 10^4/14$
98-1579	$3.2 \times 10^6/61$	$6.6 \times 10^5/55$	$2.3 \times 10^5/44$	$6.6 \times 10^4/18$	$3 \times 10^4/17$

n = 9
3 días

3.2 Actividad *in vitro*

La Tabla 12 condensa los resultados de las pruebas de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de las 25 cepas de *C. immitis* probadas. Los datos están reportados como la media geométrica de la CMI ($\mu\text{g/mL}$).

De las preparaciones de los dos polienos, las formulaciones de ANFB fueron más activas que las de NIS. Enfocándonos solamente en las formulaciones de ANFB, la ANFBCL y ANFBDC parecen ser las más activas *in vitro* en comparación con la ANFB convencional. La ANFBL parece ser la menos activa *in vitro* de las cuatro formulaciones de ANFB.

De las dos formulaciones de NIS, la NISL exhibió más actividad que la NIS convencional. En comparación, la NIS convencional fue consistentemente dos veces más alta en susceptibilidad *in vitro*.

De los cuatro triazoles, el FLU mostró la menor actividad *in vitro*. ITRA, POSA y VORI mostraron la mayor actividad, exhibiendo CMI muy similares entre ellos. Si comparamos los resultados de susceptibilidad entre FLU y su compuesto derivado VORI, la actividad antifúngica de éste se incrementó por un factor alrededor de 32. La comparación de ITRA y su compuesto derivado POSA no es tan dramática como la de los compuestos anteriores, como puede observarse, los resultados de susceptibilidad son muy semejantes entre ellos.

Los resultados de este estudio demostraron una pobre actividad *in vitro* de CAS contra los aislamientos clínicos de *C. immitis*.

Tabla 12. CMI de las cepas de *C. immitis* en varios estadios morfológicos de su fase aspróbica.

ANTIFÚNGICOS	MEDIA GEOMÉTRICA (µg/mL)		
	4 días	10 días	20 días
ANFB	0.38	0.36	0.40
ANFBCL	0.14	0.15	0.18
ANFBDC	0.14	0.14	0.18
ANFBL	0.54	0.56	0.57
NIS	4.63	4.89	6.02
NISL	2.38	2.51	3.54
FLU	26.48	30.32	28.2
VORI	0.54	0.50	0.50
ITRA	0.42	0.39	0.41
POSA	0.52	0.51	0.53
CAS	19.25	17.4	20.32

Los resultados de CMI y CML de todos los compuestos antifúngicos ensayados. La Tabla 13 resume los resultados de la media geométrica de la CML para los compuestos antifúngicos poliénicos. Semejante a los resultados de la CMI, la CML entre los dos polienos muestra que las formulaciones de NIS fueron menos activas *in vitro* que las preparaciones de ANFB. Nuevamente la NISL exhibió mejor actividad *in vitro* en comparación a la NIS convencional, aunque los resultados muestran un incremento de actividad que va solo de una dilución del antifúngico.

Con respecto a las cuatro preparaciones de ANFB, la ANFB convencional mostró la mejor actividad *in vitro* en comparación a sus formulaciones lipídicas. Similar a los resultados de CMI, la ANFBBL mostró la menor actividad *in vitro*.

Tabla 13. CML de las cepas de *C. immitis* en varios estadios morfológicos de su fase sapróbica.

ANTIFÚNGICOS	MEDIA GEOMÉTRICA (µg/mL)		
	4 días	10 días	20 días
ANFB	0.72	0.62	0.73
ANFBCL	1.58	1.47	1.34
ANFBDC	1.06	1	1.14
ANFBBL	2	2	2.09
NIS	7.78	8.75	8.93
NISL	3.78	4.46	4.22

Los resultados de CMI y CML de todos los compuestos antifúngicos ensayados utilizando inóculos de *C. immitis* a los 4 días de crecimiento (población predominantemente hifal), 10 días de crecimiento (mezcla de hifas y artroconidias no geminadas) y 20 días de crecimiento (artroconidias germinadas), muestran pequeñas diferencias de actividad, solo del orden de una dilución entre los tres diferentes estadios morfológicos del ciclo sapróbico de *C. immitis*, utilizados como inóculos en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

3.2.3 Clasificación de las cepas.

Las Tablas 14 y 15 muestran las cepas elegidas para los estudios *in vivo*. Las cepas susceptibles fueron aquellas que mostraron la mayor actividad *in vitro* y las cepas resistentes fueron aquellas que exhibieron la menor actividad *in vitro*. En los casos de CAS y POSA el parámetro utilizado fue la CMI. En el caso de las formulaciones lipídicas la medida que utilizamos fue la CML, pues el rango con la CMI estuvo muy estrecho.

Tabla 14. Clasificación de las cepas de *C. immitis* seleccionadas para los estudios *in vivo* de acuerdo a su CMI.

ANTIFÚNGICO	CEPA SUSCEPTIBLE/ CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CEPA RESISTENTE/ CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
CAS	98-449/8	98-571/64
POSA	97-960/0.25	97-2036/1
ANFBCL	98-1037/0.125	98-293/0.25
ANFBDC	98-1037/0.06	98-293/0.125
ANFBL	98-1037/0.5	98-293/1

Tabla 15. Clasificación de las cepas de *C. immitis* seleccionadas para los estudio *in vivo* de acuerdo a la CML.

ANTIFÚNGICO	CEPA SUSCEPTIBLE/ CML ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CEPA RESISTENTE/ CML ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
ANFBCL	98-1037/0.5	98-293/2
ANFBDC	98-1037/0.5	98-293/2
ANFBL	98-1037/1	98-293/4

3.3 Actividad *in vivo*

3.3.1 Determinación de DL_{50} y DL_{90} .

En la tabla 16 se muestran los resultados de las determinaciones de las DL_{50} y DL_{90} en las cepas de *C. immitis* utilizadas en los estudios *in vivo*. Puede observarse la uniformidad en la mortalidad en las diferentes cepas cuando la administración intravenosa de los inóculos fueron 50 y 200 artoconidias. Puede considerarse que las cepas poseen una virulencia similar que se refleja en una DL_{50} casi equivalente. Por otro lado, cuando administramos intravenosamente 200 artoconidias para cada ratón conseguimos una mortalidad entre el 90 y 100% a lo largo de 30 días. Este inóculo fue considerado como la dosis de conidias necesaria para producir entre el 90 y 100 % de mortalidad (DL_{90}) en los grupos controles (sin tratamiento antifúngico) aproximadamente dentro de los 12 y 24 días post infección. Por lo tanto, la administración de 200 conidias fue el inóculo para llevar a cabo los estudios de eficacia terapéutica.

Para llevar a cabo las mediciones de DL_{50} y DL_{90} , administramos otros dos inóculos diferentes: 100 y 500 conidias. Nuestros resultados mostraron que la inoculación de 100 conidias con las distintas cepas independientemente produjo alrededor de un 70 % de mortalidad en un período de 30 días post infección. La inyección de 500 artoconidias produjo una mortalidad entre el 90 y 100 % en un tiempo de 10 a 15 días post infección.

Tabla 16. Mortalidad en ratones infectados con cepas de *C. immitis* de diferente susceptibilidad antifúngica.

Cepas	Concentración de los Inóculos	
	50 conidias	200 conidias
	Muertos/totales	Muertos/totales
98-449 (S)	5/10	10/10
98-571 (R)	4/10	10/10
97-960 (S)	4/10	9/10
97-2036 (R)	4/10	10/10
98-1037 (S)	4/10	9/10
98-293 (R)	4/10	10/10

3.3.2 Determinación de la eficacia terapéutica.

3.3.2.1 Estudios de supervivencia.

3.3.2.1.1 Tratamiento con caspofungina.

Los resultados del estudio de supervivencia con la cepa 98-449 se muestran en la Figura 2. Todos los ratones del grupo control murieron entre los días 12 y 22. Todos los ratones sometidos al tratamiento con CAS a 1, 5 y 10 mg/kg sobrevivieron al día 50.

CAS a dosis ≥ 0.5 mg/kg significativamente prolongaron la supervivencia ($P \leq 0.0085$).

La Figura 3 muestra los resultados del estudio de supervivencia obtenidos con la cepa 98-571. Los ratones del grupo control murieron entre los días 14 y 22. Todos los ratones tratados con CAS a 10 mg/kg sobrevivieron hasta el día 50. Un 20 % de los ratones tratados con CAS a 1 y 5 mg/kg murieron entre los días 27 y 45. CAS fue ligeramente menos efectiva en el estudio de supervivencia con la cepa 98-571 que con la cepa 98-449.

Figura 2. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con *C. immitis* cepa 98-449 (CMI = $8 \mu\text{g/mL}$) y su tratamiento con caspofungina.

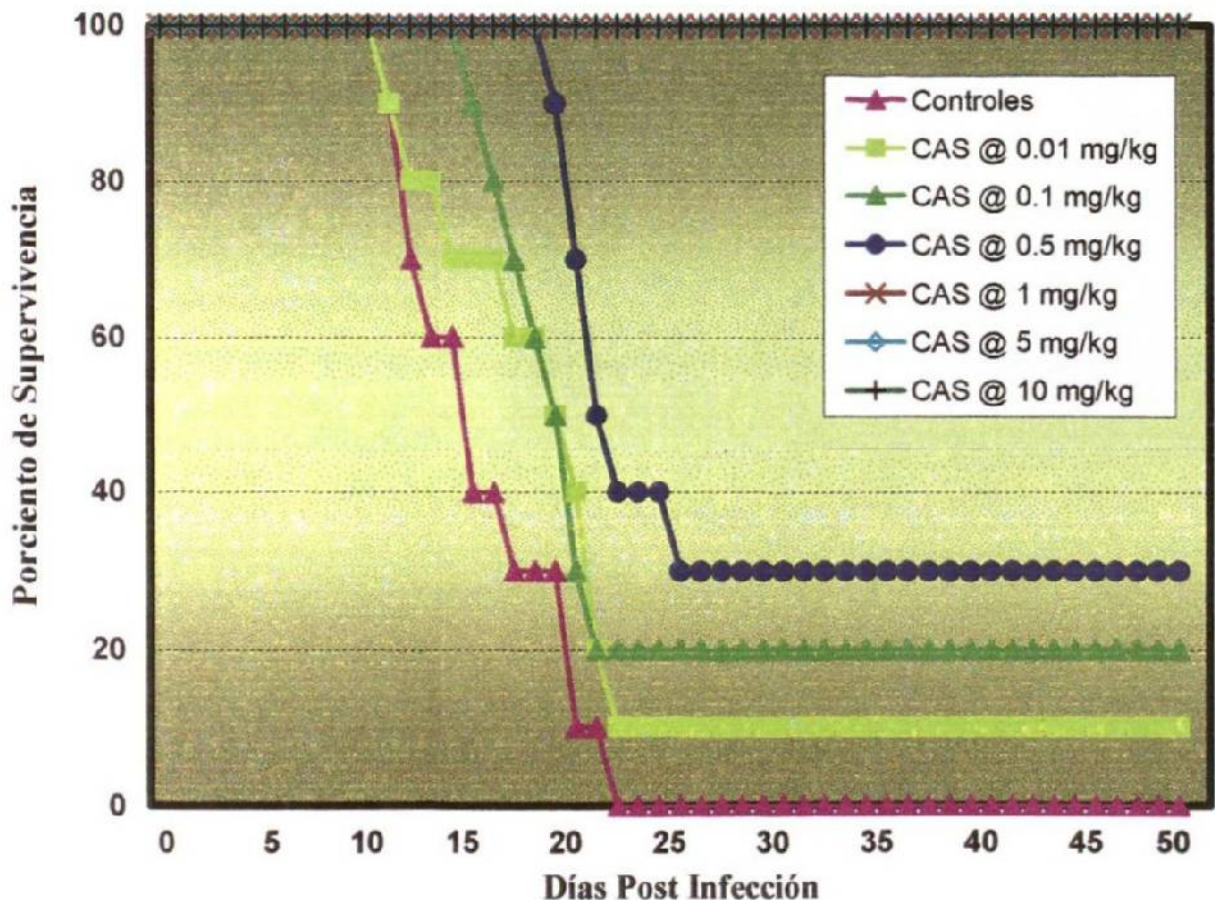
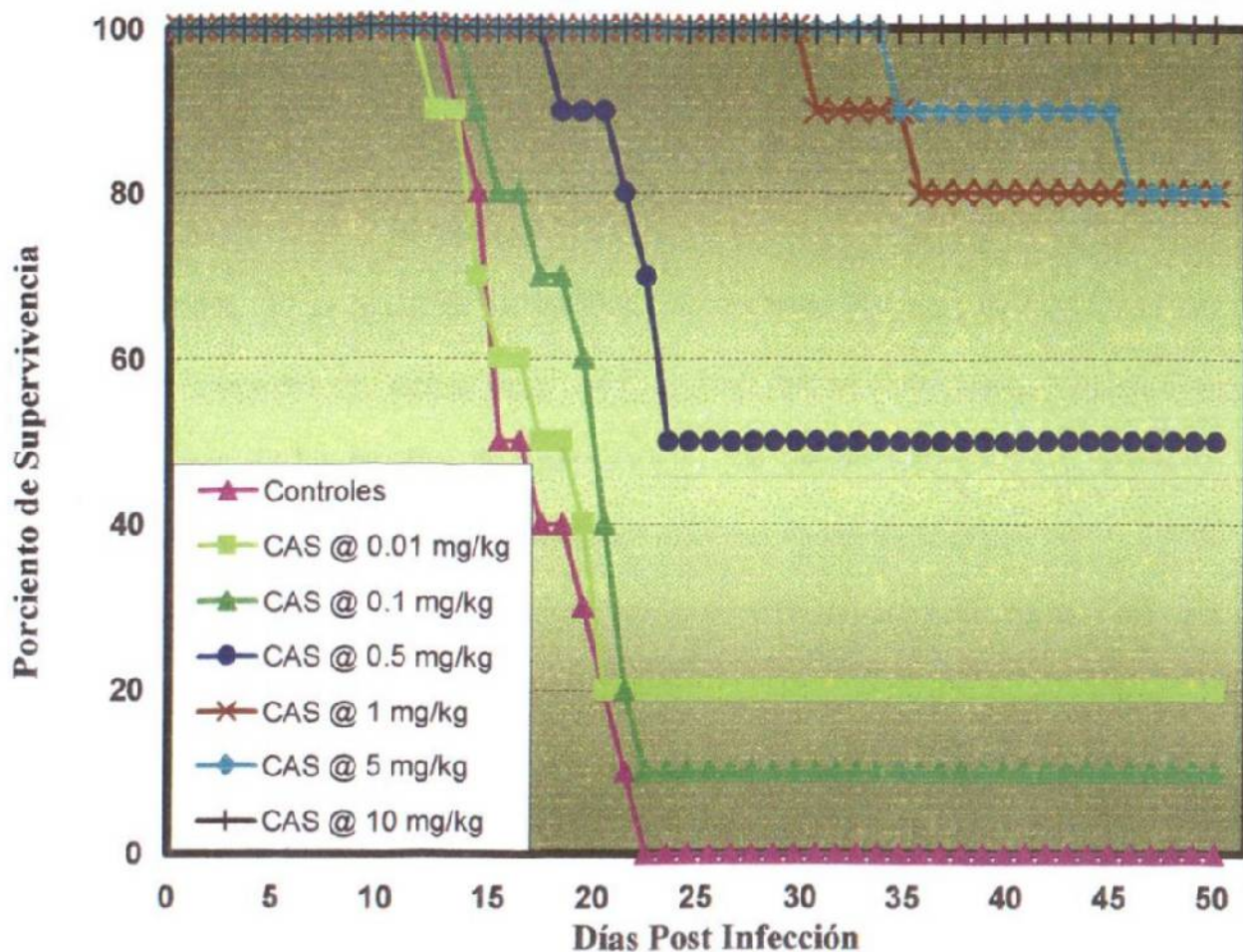


Figura 3. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con *C. immitis* cepa 98-571 (CMI = 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y su tratamiento con caspofungina.



3.3.2.1.2 Tratamiento con posaconazol.

El estudio de supervivencia con la cepa 97-960 se muestra en la Figura 4. Todos los animales del grupo control murieron entre los días 12 y 25. Los ratones mostraron

100 % de supervivencia al día 50 cuando se trataron con ≥ 0.5 mg/kg de POSA y 30 mg/kg de ITRA. Dosis ≥ 0.1 mg/kg de POSA así como 10 y 30 mg/kg de ITRA significativamente prolongaron la supervivencia ($P \leq 0.05$). El estudio de supervivencia con los ratones infectados con la cepa 97-2036 se muestra en la Figura 5.

Los animales pertenecientes al grupo control murieron entre los días 14 a 27. Los ratones tratados con POSA ≥ 0.5 mg/kg mostraron de 90 a 100 % de supervivencia. Significativa prolongación de la supervivencia fue observada a dosis ≥ 0.01 mg/kg de POSA y a su vez 10 y 30 mg/kg de ITRA ($P \leq 0.05$).

En la Tabla 17 se muestran los resultados de los homogenizados de órganos de los ratones infectados con ambas cepas de *C. immitis* independientemente. Los animales provinieron de los estudios de supervivencia. Se obtuvo entre un 30 y 80 % de esterilización en ambos órganos cuando los animales fueron tratados con 5 y 10 mg/kg de POSA, respectivamente. Este efecto no se observó en los grupos de animales tratados con ITRA.

Figura 4. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con *C. immitis* cepa 97-960

(CMI = 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y su tratamiento con posaconazol.

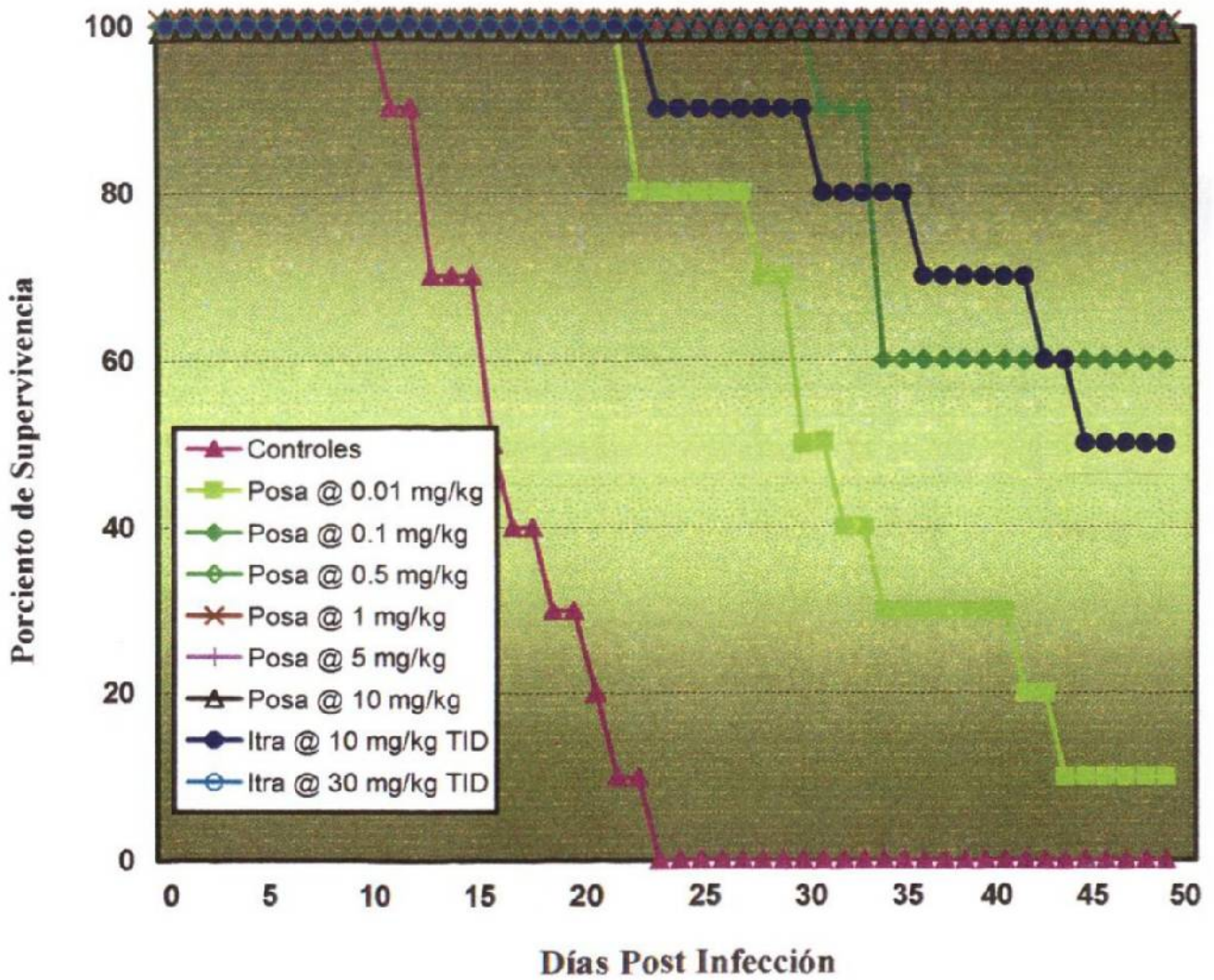


Figura 5. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con *C. immitis* cepa 97-2036 (CMI = 1 µg/mL) y su tratamiento con posaconazol.

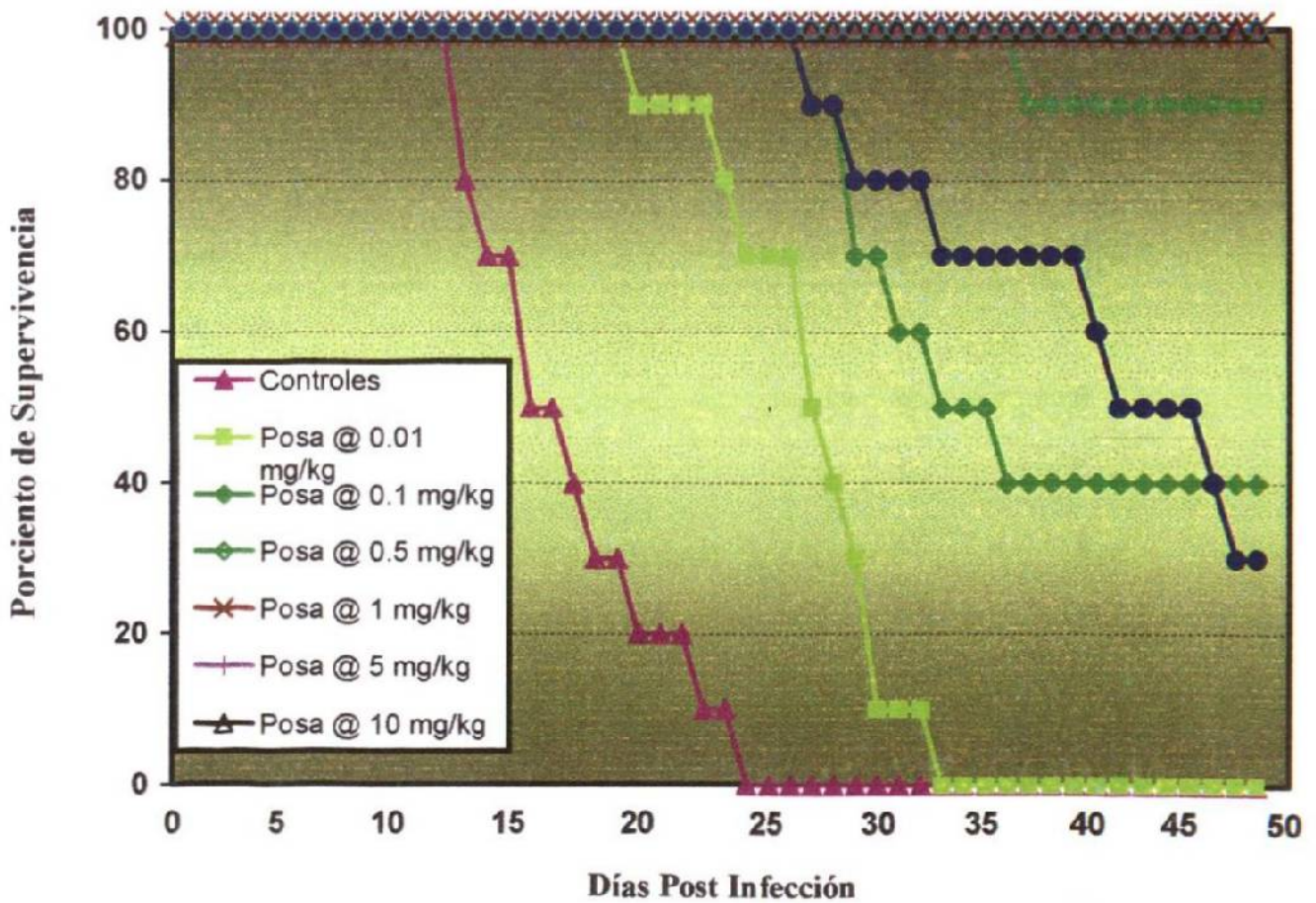


Tabla 17. Recuperación de *C. immitis* en ratones tratados con posaconazol e itraconazol del estudio de supervivencia.

Tratamiento (mg/kg)	% Esterilización			
	Cepa 97-960 (CMI= 0.25 µg/mL)		Cepa 97-2036 (CMI= 1 µg/mL)	
	Bazo	Hígado	Bazo	Hígado
Controles	0	0	0	0
Posa @ 0.01	0	0	0	0
Posa @ 0.1	0	0	0	0
Posa @ 0.5	0	0	0	0
Posa @ 1	0	0	0	0
Posa @ 5	60	50	50	30
Posa @ 10	80	70	80	80
Itra @ 10	0	0	0	0
Itra @ 30	0	0	0	0

3.3.2.1.3 Tratamiento con las formulaciones lipídicas.

Los resultados del estudio de supervivencia con la cepa 98-1037 se muestran en la tabla 18. Los animales del grupo control murieron entre los días 14 y 24. Todos los regímenes terapéuticos prolongaron significativamente la supervivencia ($P < 0.0001$) sobre el grupo control. No hubo diferencias significativas en la supervivencia entre los diversos grupos que recibieron tratamiento. El cultivo de homogenizados de bazo e hígado procedentes del estudio de supervivencia mostró 100% de esterilización en ambos órganos, cuando los ratones fueron tratados con 10 mg/kg de cualquiera de las preparaciones lipídicas y un 50 a 70 % de esterilización en ambos órganos, cuando los animales fueron tratados con 5 mg/kg de las formulaciones lipídicas. 25 % de esterilización en bazo e hígado fue demostrado cuando se administró 1 mg/kg de ANFB_{CD}, pero este efecto no se observó en los animales que recibieron 1 mg/kg de ANFB_L y ANFB_{CL}. ANFB convencional no mostró esterilización de tejidos ni aún a dosis de 5 mg/kg. Los resultados del estudio de supervivencia con la cepa 98-293 fueron muy similares a los obtenidos con la cepa anterior, ver tabla 19. Sin embargo, dos ratones se murieron 15 minutos después de la aplicación de la cuarta y quinta dosis de ANFB a 0.5 mg/kg (IV) y 1 mg/kg (IP).

Tabla 18. Supervivencia y recuperaci3n de *C. immitis* en ratones infectados con la cepa 98-1037 y su tratamiento con las formulaciones de anfotericina B.

TRATAMIENTO (mg/kg)	NÚMERO DE SOBREVIVIENTES	% ESTERILIZACIÓN	
		BAZO	HÍGADO
CONTROL	0	0	0
ANFBCL			
1	10	40	0
5	10	60	50
10	10	100	100
ANFBDC			
1	9	50	10
5	10	80	60
10	10	100	100
ANFBL			
1	10	50	0
5	10	80	60
10	10	100	100
ANFB			
0.5	10	70	30
1	10	60	10
5	10	60	20

3.3.2.2 Efectos de carga microbiana.

Tabla 19. Supervivencia y recuperaci3n de *C. immitis* en ratones infectados con la cepa

3.3.2.2.1 Transmisión de esporozoitos.

98-293 y su tratamiento con las formulaciones de anfotericina B.

La carga microbiana de animales infectados con la cepa 98-293 fue determinada

TRATAMIENTO (mg/kg)	NÚMERO DE SOBREVIVIENTES	% ESTERILIZACIÓN BAZO HÍGADO	
CONTROL	1	0	0
ANFBCL			
1	10	50	0
5	10	60	50
10	10	100	100
ANFBDC			
1	9	60	20
5	9	80	50
10	9	100	100
ANFBL			
1	9	60	0
5	10	80	70
10	10	100	100
ANFB			
0.5	9	60	30
1	9	50	10
5	10	60	30

3.3.2.2 Estudio de carga microbiana.

3.3.2.2.1 Tratamiento de caspofungina.

La carga microbiana de animales infectados con la cepa 98-449 fue determinada cuando los animales murieron o sobre el día 24 post-infección para aquellos que sobrevivieron a ese día. El tratamiento con CAS a dosis ≤ 0.01 mg/kg no redujo la carga fúngica y no hubo diferencia significativa con respecto al grupo control ($P \leq 0.05$). Los ratones tratados con CAS a dosis ≥ 0.5 mg/kg significativamente redujeron la carga microbiana en bazo, hígado y pulmones en una forma claramente dependiente de la dosis. Estos resultados se muestran en la Tabla 20.

Los resultados de animales infectados con la cepa 98-571 fueron muy similares a los resultados anteriores. El tratamiento con CAS a 0.01 mg/kg fue inefectivo en la reducción de la carga microbiana y tampoco mostró diferencia significativa con respecto al grupo control ($P \leq 0.05$). El tratamiento con CAS a dosis ≥ 0.1 mg/kg fue muy activo en la disminución de la carga fúngica a niveles más bajos que el grupo control, y observándose este efecto de una manera dependiente de la dosis.

Tabla 20. Carga microbiana en bazo, hígado y pulmones de ratones tratados con caspofungina.

Tratamiento (mg/kg)	Log ₁₀ Media UFC/órgano					
	Cepa 98-449 (CMI=8 µg/mL)			98-571 (CMI=64 µg/mL)		
	Bazo	Hígado	Pulmones	Bazo	Hígado	Pulmones
Controles	6.979	6.886	7.106	6.974	7.123	7.114
Cas @ 0.01	6.661	6.787	6.985	6.885	7.122	7.043
Cas @ 0.1	6.489	6.491	6.553	6.576*	6.527*	6.463*
Cas @ 0.5	5.385*	5.352*	5.440*	5.419*	5.480*	5.546*
Cas @ 1	4.579*	4.532*	4.565*	4.660*	4.549*	4.459*
Cas @ 5	4.079*	4.128*	4.024*	4.007*	3.964*	4.003*
Cas @ 10	2.450*	3.070*	2.980*	2.977*	2.906*	3.071*

Prueba de Dunnett

* $P \leq 0.05$ al comparar con el grupo control

3.3.2.2.2 Tratamiento con posaconazol.

El tratamiento con POSA a dosis ≥ 0.1 mg/kg significativamente disminuyó las UFC en bazo, hígado y pulmones en una forma dependiente de la dosis con ambas

cepas ensayadas (97-960 y 97-2036). El tratamiento con ITRA a 10 mg/kg y 30 mg/kg también redujo significativamente la carga microbiana con ambos aislamientos de *C. immitis*. POSA administrado a dosis de 0.1, 0.5 y 1 mg/kg fue más potente que ITRA a 10 mg/kg en la reducción de carga microbiana en todos los órganos ($P < 0.01$ a < 0.0001). No se observó diferencia estadísticamente significativa entre POSA dado a 0.1 y 0.5 mg/kg e ITRA administrado a 30 mg/kg ($P > 0.0001$). Sin embargo, una significativa mejoría en la reducción de la carga microbiana se observó en todos los órganos con 1 mg/kg de POSA en comparación con 30 mg/kg de ITRA ($P < 0.0001$).

Tabla 21. Carga microbiana en bazo, hígado y pulmones de ratones tratados con posaconazol.

Tratamiento (mg/kg)	Log ₁₀ Media UFC/órgano					
	Cepa 97-960			Cepa 97-2036		
	Bazo	Hígado	Pulmones	Bazo	Hígado	Pulmones
Controles	6.147	6.317	6.165	6.139	6.296	6.143
Posa @ 0.1	4.366*	4.505*	4.450*	4.316*	4.448*	4.408*
Posa @ 0.5	3.382*	3.489*	3.445*	3.403*	3.515*	3.394*
Posa @ 1	2.068*	2.305*	2.212*	2.100*	2.068*	2.082*
Itra @ 10	5.134*	5.277*	5.459*	5.089*	5.272*	5.244*
Itra @ 30	3.380*	3.432*	3.437*	3.305*	3.506*	3.597*

Prueba de Dunnett

* $P \leq 0.05$ al comparar con el grupo control

3.3.2.2.3 Tratamiento con las formulaciones lipídicas de anfotericina B.

La Tabla 22 muestra los resultados derivados del estudio cuantitativo de carga microbiana en bazo, hígado y pulmones de los animales infectados con las cepas 98-1037 y 98-293 y sus respectivos tratamientos. Los órganos en el grupo control tuvieron altas cuentas de UFC de *C. immitis* por órgano. Comparaciones de cada régimen terapéutico de las formulaciones lipídicas de ANFB (1 mg/kg) y la ANFB convencional en ambas dosis (0.5 y 1 mg/kg), significativamente redujeron la carga microbiana sobre los grupos control. Sin embargo, los ratones que recibieron ANFB a 0.5 y 1 mg/kg tuvieron las más bajas cuentas de UFC de *C. immitis* en todos los órganos estudiados que la dosis de 1 mg/kg de cualesquiera de las formulaciones lipídicas.

Tabla 22. Carga microbiana en bazo, hígado y pulmones de ratones tratados con las preparaciones lipídicas de anfotericina B.

Log₁₀ Media UFC/órgano						
Tratamiento	Cepa 98-293			Cepa 98-1037		
	Bazo	Hígado	Pulmones	Bazo	Hígado	Pulmones
Controles	6.276	6.451	6.911	6.141	6.812	6.112
ANFBCL 1 mg/ kg	1.521*	3.331*	3.984*	1.471*	3.416*	3.789*
ANFBDC 1 mg/kg	1.043*	2.871*	3.010*	1.214*	2.627*	3.152*
ANFBL 1 mg/kg	1.162*	3.074*	3.315*	1.394*	3.119*	3.297*
ANFB 0.5 mg/kg (IV)	0.314*	1.177*	1.482*	0.352*	1.391*	1.084*
1 mg/kg (IP)	0.391*	1.989*	1.861*	0.416*	2.458*	2.458*

Prueba de Dunnett

* $P \leq 0.05$ al comparar con el grupo control

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En este estudio utilizamos el método espectrofotométrico para la preparación de los inóculos y para realizar las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Este método es fácil de manejar, rápido y ampliamente conocido por el personal que trabaja en los laboratorios clínicos. Está publicado que el método espectrofotométrico proporciona en forma reproducible suspensiones homogéneas en células de levaduras y en conidias de hongos filamentosos. Pfaller et al (68) realizaron un estudio comparativo de 4 métodos para la preparación de inóculos con levaduras: el método espectrofotométrico, la tarjeta de Wickerham, el hematocitómetro y el sistema Prompt. Las levaduras incluidas en el estudio fueron *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* y *Saccharomyces cerevisiae*. La menor variación se obtuvo con el método espectrofotométrico, el promedio de los coeficientes de variación intra día fue 6.1 % (rango de 1-18 %) y la variación promedio inter días fue 10 % (rango de 3-51 %). Por otro lado, Espinel-Ingroff et al (20) utilizaron el método espectrofotométrico para la preparación de inóculos conidiales con 29 cepas de hongos filamentosos clínicamente importantes (*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Mucor* spp., *Pseudallescheria boydii*, *Rhizopus* spp., y *Sporothrix schenckii*), los coeficientes de variación estuvieron en el rango de 24.0 a 47.7 %.

Independientemente de los estadios morfológicos de *C. immitis* ensayados, a 90 y 95 % T obtuvimos los más bajos valores de coeficiente de variación tanto en los datos intra como inter días. Nuestros resultados fueron muy semejantes a la variabilidad obtenida en la estandarización de inóculos con levaduras y conidias de hongos diferentes a *C. immitis*.

En general, la preparación de los inóculos con una población predominantemente hifal (4 días) fue mas tardada debido a la dificultad para conseguir suspensiones homogéneas, especialmente a 75 y 80 % T. A pesar de que *C. immitis* crece rápido, en 4 días de incubación algunas colonias no están suficientemente desarrolladas para conseguir suspensiones fúngicas a esos % T y frecuentemente se necesitó mas de un tubo de cultivo para alcanzar tales concentraciones. Sin embargo, creemos que esta fase debe considerarse en las pruebas de susceptibilidad porque se produce rápidamente en este hongo y es menos peligrosa, además en algunos otros hongos filamentosos el desarrollo de estructuras fructificantes toma un tiempo prolongado y por otro lado, las hifas son las únicas estructuras producidas en otros hongos. La preparación de inóculos con cultivos de 10 y 20 días de incubación fueron más fáciles de preparar y estandarizar que la de 4 días. La ventaja de trabajar con conidias germinadas en los ensayos de susceptibilidad *in vitro* es la mayor uniformidad de edad de las células pero las desventajas son el prolongado tiempo de incubación, la peligrosidad de los cultivos y en el laboratorio la germinación de las conidias involucra un paso mas en la preparación de los inóculos.

Con respecto a la actividad *in vitro*, estudiamos el impacto de la incorporación de los polienos en los portadores lipídicos sobre el resultado de las pruebas de susceptibilidad. Este estudio demostró que el portador lipídico de las diversas preparaciones de

ANFB interfiere con los resultados *in vitro*. Si la ANFB permanece sin cambios químicos en su asociación con las moléculas lipídicas, cualquier diferencia en las pruebas *in vitro* puede atribuirse a la interferencia con el portador (1). Bajo condiciones de laboratorio estandarizadas, POSA exhibió una actividad antifúngica muy similar al ITRA. Sin embargo, POSA fue considerablemente más efectivo que ITRA en el modelo murino de coccidioidomicosis sistémica. VORI mostró mayor potencia *in vitro* contra los aislamientos de *C. immitis* que el FLU. Debido a que la vida media del VORI en el ratón es muy corta, este animal no es el indicado para medir la actividad antifúngica *in vivo*, razón por la cual no llevamos a cabo los estudios en animales para este antifúngico en particular.

Por otro lado, determinamos que los varios estadios morfológicos de *C. immitis* ensayados como inóculos en las pruebas *in vitro* no ejercieron una diferencia sobre los resultados de CMI/CML entre los inóculos hifales y conidiales y entre los inóculos con conidias germinadas y conidias no germinadas. Aunque hubo diferencias en la metodología ensayada y los hongos evaluados, nuestros datos *in vitro* son muy similares a los obtenidos por Bezjak (7) y Manavathu (51) pero diferentes a los conseguidos por Guarro (35).

Para la realización de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* con los antifúngicos elegidos para esta investigación, decidimos ajustar los inóculos a 95 % T debido a los menores coeficientes de variación conseguidos y también porque a este % T las UFC/mL estuvieron en el rango de 1×10^4 - 7×10^4 UFC/mL, concentración muy cercana a la recomendada en el documento M38-P del NCCLS (62).

Este estudio demostró una pobre actividad *in vitro* de la CAS contra *C. immitis*, con CMI en el rango de 8 a 64 µg/mL. Sin embargo, CAS fue altamente efectiva en el tratamiento de la coccidioidomicosis experimental, a pesar de las diferencias en CMI de las cepas elegidas para los estudios en animales. La CMI fue determinada de acuerdo a los criterios convencionales seguidos por la metodología del documento M38-P del NCCLS. El NCCLS no ha evaluado ningún compuesto péptido con actividad antifúngica. Inferimos que el uso de un determinado punto de corte para un compuesto antifúngico puede no ser válido para otros compuestos antimicóticos. Por lo que pensamos que para desarrollar pruebas de susceptibilidad con antifúngicos relevantes clínicamente, nuevos criterios totalmente diferentes pueden establecerse para estos nuevos compuestos.

Estudios con *Aspergillus* spp. han mostrado que la lectura de corte para los nuevos péptidos han sido modificados para obtener correlación con otros parámetros de actividad antifúngica. Kurtz et al (47) hicieron observaciones microscópicas de los pozos de la placa de micro dilución y mostraron que en la presencia de CAS, las hifas estaban distalmente divididas y muy engrosadas en las puntas. Macroscópicamente, estos cambios correspondieron a la producción de grumos del crecimiento fúngico en los pozos de las placas. Ellos propusieron el uso de la concentración mínima efectiva (CME) como el nuevo punto de corte en la determinación de susceptibilidades frente a compuestos de naturaleza peptídica.

CAS es un compuesto antifúngico que representa un reto para la metodología presente utilizada en los estudios *in vitro*. Los criterios de punto de corte parecen ocupar una

posición importante entre las numerosas variables que pueden influir los resultados de actividad *in vitro*.

En este estudio se detectaron diferentes actividades *in vitro* de CAS frente a *C. immitis*, pero no se detectaron diferencias de comportamiento de las cepas en los estudios de eficacia terapéutica *in vivo*. Los ratones tratados con CAS a 1, 5 y 10 mg/kg sobrevivieron mas tiempo que el grupo control. CAS fue ligeramente menos efectiva en el estudio de supervivencia con la cepa 98-571 que con la 98-449. Sin embargo, cuando se compararon los resultados de los estudios de carga microbiana, CAS no mostró diferencias estadísticamente significativas en la eficacia de la disminución fúngica en las dos cepas estudiadas.

Con respecto al POSA, los dos aislamientos de *C. immitis* utilizados *in vivo* mostraron perfiles de susceptibilidad muy estrechos (0.25 y 1 µg/mL). El estudio de supervivencia realizado con la cepa 97-960 (S), POSA dosis ≥ 0.5 mg/kg/día así como ITRA a 30 mg/kg/tres veces al día fue capaz de prevenir la muerte con un 100 % de supervivencia al día 50. El estudio con el segundo aislamiento, 97-2036 (R) mostró que a dosis ≥ 1 mg/kg/día e ITRA a 30 mg/kg/tres veces diariamente fueron efectivos en prolongar la supervivencia al 100% al día 50. El cultivo de órganos de ratones tratados con 5 y 10 mg/kg/día con ambos aislamientos de *C. immitis* mostraron altos porcentajes de esterilización. ITRA no mostró esterilización aún a dosis de 30 mg/kg/tres veces al día. La potente actividad de POSA fue evidente en su efecto de esterilización, efecto no demostrado actualmente por ningún triazol. En el estudio de carga microbiana de ambos aislamientos, todas las dosis de POSA (0.1, 0.5 y 1mg/kg) e ITRA (10 y 30

mg/kg) significativamente redujeron la carga microbiana en bazo, hígado y pulmones. No hubo diferencia significativa en los estudios de carga microbiana entre las dos cepas. Las tres formulaciones lipídicas de ANFB fueron toleradas, aún mejor que la ANFB convencional ya que mayores dosis de la droga pudieron administrarse con una reducción de los efectos adversos. La ANFB convencional administrada ya sea intravenosamente o intraperitonealmente fue muy potente en la disminución de la carga fúngica en los animales. Sin embargo, la ANFB convencional no fue suficiente para lograr la esterilización de los órganos ensayados. Las tres preparaciones de ANFB asociadas con lípidos al aplicarse en dosis mayores si lograron la esterilización de bazo e hígado. A pesar de que algunas de estas preparaciones han sido reportadas como eficaces en el tratamiento de la coccidioidomicosis experimental (9, 10, 11), este es el primer estudio *in vivo* que llevó a cabo la evaluación de las eficacias de las tres preparaciones lipídicas así como de la ANFB convencional.

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* llevadas a cabo en este estudio bajo las condiciones ya descritas proporcionaron rangos de CMI/CML muy estrechos para todos los antifúngicos ensayados, este hecho dificultó la clasificación de cepas de *C. immitis* como resistentes o susceptibles para cada compuesto antifúngico. Probablemente esta es la razón más importante por la que las pruebas *in vitro* no tuvieron el efecto predictivo del resultado del tratamiento antifúngico en los estudios *in vivo* utilizando el modelo murino de coccidioidomicosis sistémica.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. No se obtuvo una correlación entre las pruebas de susceptibilidad *in vitro* y los resultados del tratamiento antifúngico *in vivo* en este modelo murino de coccidioidomicosis sistémica
2. La metodología aceptada actualmente generó rangos estrechos de susceptibilidad en términos de CMI y CML con los compuestos antifúngicos ensayados. Nuestros datos indican que los parámetros convencionales de las pruebas de susceptibilidad deben re-evaluarse para el caso específico de este hongo.
3. Caspofungina, posaconazol y las formulaciones lipídicas de anfotericina B pueden incrementar el armamento de drogas antifúngicas en el tratamiento de coccidioidomicosis humana.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Actualmente los estudios de correlación *in vivo-in vitro* han estado enfocados principalmente a infecciones por *Candida* spp. y en menor grado a infecciones producidas por *Cryptococcus neoformans*. Se ha realizado muy poco trabajo para establecer la correlación *in vivo-in vitro* para infecciones producidas por hongos filamentosos y los pocos esfuerzos se han encaminado a infecciones invasivas por *Aspergillus* spp.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que deben ensayarse variaciones en los diversos parámetros de las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. El estudio de diferentes medios de cultivo, un rango amplio de pH en los medios de cultivo, una variedad de temperaturas y tiempos de incubación, diferentes concentraciones de inóculos, diferentes formas de evaluar las lecturas de punto final probablemente proporcionen rangos amplios de CMI/CML en cepas de *C. immitis* y sea más factible la categorización de cepas resistentes o susceptibles para este hongo. El estudio profundo de estos parámetros podría transformar una prueba de susceptibilidad *in vitro* en una prueba clínicamente relevante.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

1. Abruzzo, G. K., A. M. Flattery, C. J. Gill, L. Kong, J. G. Smith, V. B. Pikounis, J. M. Balkovec, A. F. Bouffard, J. F. Dropinski, H. Rosen, H. Kropp, and K. Bartizal. 1997. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergilosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob. Agents Chemother*, 41: 2333-2338.
2. Al-Abdely, H. M., L. K. Najvar, R. Bocanegra, A. Fothergill, D. Loebenberg, M. G. Rinaldi, and J. R. Graybill. 2000. SCH 56592, amphotericin B, or itraconazole therapy of experimental murine cerebral phaeohyphomycosis due to *Ramichloridium obovoideum* (*Ramichloridium mackenziei*). *Antimicrob. Agents Chemother*. 44: 1159-1162.
3. Anaissie, E., V. Paetznick, R. Proffitt, J. Adler-Moore, and G. P. Bodey. 1991. Comparison of the *in vitro* antifungal activity of free and liposome-encapsulated amphotericin B. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 665-668.
4. Barbee, R. A., M. J. Hicks, D. Grosso, and C. Sandel. 1991. The maternal immune response in coccidioidomycosis. *Chest*..100: 709-715.

5. Barry, A. L., M. A. Pfaller, S. D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, C. Knapp, R. P. Rennie, J. H. rex, and M. G. Rinaldi. 2000. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3457-3459.
6. Bates, D. W., L. Su, D. T. Yu, G. M. Chertow, D. L. Seger, D. R. Gomes, E. J. Dasbach, and R. Platt. 2001. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32: 686-689.
7. Bezjak, V. 1985. Standardization of a hyphal inoculum of aspergilli for amphotericin B susceptibility testing. *J. Clin. Microb.* 21: 509-512.
8. Catanzaro, A. J. N. Galgiani, B. E. Levine, P. K. Sharkey-Mathis, J. Fierer, D. A. Stevens, S. W. Chapman, G. Cloud and The NIAID Mycoses Study Group. 1995. Fluconazole in the treatment of chronic pulmonary and non meningeal disseminated coccidioidomycosis. *Am. J. Med.* 98: 249-256.
9. Clemons, K. V. and D. A. Stevens. 1991. Comparative efficacy of amphotericin B colloidal dispersion and amphotericin B deoxycholate suspension in treatment of murine coccidioidomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1829-1833.
10. Clemons K. V. and D. A. Stevens. 1992. Efficacies of amphotericin B lipid complex (ABLC) and conventional amphotericin B against murine coccidioidomycosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 30: 353-363.

11. Clemons K. V. and D. A. Stevens. 1998. Comparison of fungizone, amphotec, ambisome, and abelcet for treatment of systemic murine cryptococcosis. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 42: 899-902.
12. Cole, G. T. and S. H. Sun. 1985. Arthroconidium-spherule-endospore transformation in *Coccidioides immitis*. In: Szanislo P.J , Harris L editors. *Fungal dimorphism: with emphasis on fungi pathogenic in humans*. New York:Plenum, 281-333.
13. Converse, J. L. 1957. Effect of surface active agents on endosporulation of *Coccidioides immitis* in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 74: 106-107.
14. Connoly, 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.
15. Current, W. L., J. Tang, C. Boylan, P. Watson, D. Zeckner, W. Turner, M. Rodriguez, C. Dixon, D. Ma, and J. A. Radding. 1995. Glucan biosynthesis as a target for antifungals: the echinocandin class of antifungal agents, p. 143-157. In G. K. Dixon, L. G. Copping, and D. W. Hollomon (ed.), *Antifungal agents*, 1st ed. Bios Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom.

16. Debono, M and R. S. Gordee. 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 471-497.
17. Del Poeta, M., W. A. Schell, and J. R. Perfect. 1997. *In vitro* antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1835-1836.
18. De Lucca, A. J., and T. J. Walsh. 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1-11.
19. Drutz, D. J. 1983. Amphotericin B in the treatment of coccidioidomycosis. *Drugs* 26: 337-346.
20. Espinel-Ingroff, A. And T. M. Kerkering. 1991. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 29: 393-394.
21. Espinel-Ingroff, A. 1998. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J. clin. Microbiol.* 36: 198-202.

22. Galgiani, J. N. 1983. Ketoconazole in the treatment of coccidioidomycosis. *Drugs* 26: 355-363.
23. Galgiani, J. N., D. A. Stevens, J. R. Graybill, W. E. Dismukes, G. A. Cloud, and The NIAID Mycoses Study Group. 1988. Ketoconazole therapy of progressive coccidioidomycosis. Comparison of 400- and 800-mg doses and observations at higher doses. *Am. J. Med.* 84: 603-610.
24. Galgiani, J. N., S. H. Sun, K. V. Clemons, and D. A. Stevens. 1990. Activity of cilofungin against *Coccidioides immitis*: differential *in vitro* effects on mycelia and spherules correlated with *in vivo* studies. *J. Infect. Dis.* 162: 944-948.
25. Galgiani, J. N. 1992. Coccidioidomycosis: changes in clinical expression, serological diagnosis, and therapeutic options. *Clin. Infect. Dis.* 14 (Suppl 1): S100-105.
26. Galgiani, J. N. 1993. Susceptibility testing of fungi: current status of the standadization process. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2517-2521.
27. Galgiani, J. N. and M. L. Lewis. 1997. *In vitro* studies of activities of the antifungal traizoles SCH 56592 and itraconazole against *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and other pathogenic yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 180-183.

28. Gallis, H. A., R. H. Drew, and W. W. Pickard. 1990. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.* 12: 308-329.
29. Gallis, H. A. 1996. Amphotericin B: A commentary on its role as an antifungal agent and as a comparative agent in clinical trials. *Clin. Infect. Dis.* 22 (Suppl. 2): S145-147.
30. Gehrt, A., J. Peter, P. A. Pizzo, and T. J. Walsh. 1995. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1302-1307.
31. Ghannoum, M. A., J. H. Rex, and J. N. Galgiani. 1996. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of *in vitro* data with clinical outcome. *J. Clin. Microbiol.* 34: 489-495.
32. Graybill, J. R., D. A. Stevens, J. N. Galgiani, E. E. Dismukes, G. A. Cloud, and The NIAID Mycoses Study Group. 1990. Itraconazole treatment of coccidioidomycosis. *Am. J. med.* 89: 282-290.
33. Graybill, J. R., L. K. Najvar, M. F. Luther, and A. W. Fothergill. 1997. Treatment of murine disseminated candidiasis with L-743,872. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1775-1777.

34. Graybill, J. R., L. K. Najvar, E. M. Montalbo, F. J. Barchiesi, M. F. Luther, and M. G. Rinaldi. 1998. Treatment of histoplasmosis with MK-991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 151-153.
35. Guarro, J., C. Llop, C. Aguilar, and I. Pujol. 1997. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2760-2762.
36. Hall, G. S., C. Myles, K. J. Pratt, and J. A. Washington. 1988. Cilofungin (LY121019), an antifungal agent with specific activity against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1331-1335.
37. Hanson, L. H., and D. A. Stevens. 1989. Evaluation of cilofungin, a lipopeptide antifungal agent, *in vitro* against fungi isolated from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1391-1392.
38. Hector, R. F. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 1-21.
39. Hiemenz, J. W. And T. J. Walsh. 1996. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin. Infect. Dis.* 22 (Suppl. 2): S133-144.
40. Hobbs, E. R. 1989. Coccidioidomycosis. *Dermatol. Clin.* 7: 227-239.

41. Johnson, W. M. 1982. Racial factors in coccidioidomycosis: mortality experience in Arizona. *Arizona Med.* 39: 18-24.
42. Kaufman, L. and P. G. Standard. 1987. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 209-225.
43. Kaufman, L. 1992. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clin. Infect. Dis.* 14 (Suppl. 1): S23-29
44. Kirkland, T. N. and J. Fierer. 1996. Coccidioidomycosis: A reemerging infectious disease. *Emerging Infectious Disease.* 2: 192-199.
45. Kirkpatrick, W. R., R. K. McAtee, A. Fothergill, D. Loebenberg, M. G. Rinaldi, and T. F. Patterson. 2000. Efficacy of SCH 56592 in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 780-782.
46. Kirkpatrick, W. R., R. K. McAtee, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, and T. F. Patterson. 2000. Efficacy of voriconazole in guinea pig model of disseminated invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemotehr.* 44: 2865-2868.

47. Kurtz, M. B., I. B. Heath, J. Marrinan, S. Dreikron, J. Onishi, and C. Douglas. 1994. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)- β -D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1480-1489.
48. Kurtz, M. B., and C. M. Douglas. 1997. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J. Med. Vet. Mycol.* 35: 79-86.
49. Littman, M. L., P. L. Horowitz, and J. G. Swadey. 1958. Coccidioidomycosis and its treatment with amphotericin B. *Am. J. Med.* 32: 568-591.
50. Lutz, J. E., K. V. Clemons, B. H. Aristizabal, and D. A. Stevens. 1997. Activity of the triazole SCH 56592 against disseminated murine coccidioidomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1558-1561.
51. Manavathu, E. K., J. Cutright, and P. H. Chandrasekar. 1999. Comparative of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 37: 858-861.
52. Marco, F., M. A. Pfaller, S. A. Mecer & R. N. Jones. 1998. *In vitro* activity of a new triazole antifungal agent, Sch 56592, against clinical isolates of filamentous fungi. *Mycopathologia.* 141: 73-77.

53. McGinnis, M. R., L. Pasarell, D. A. Sutton, A. W. Fothergill, C. R. Cooper Jr., and M. G. Rinaldi. 1997. *In vitro* evaluation of voriconazole against some clinically important fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1832-1834.
54. McGinnis, M. R. L. Pasarell, D. A. Sutton, A. W. Fothergill, C. R. Cooper Jr, and M. G. Rinaldi. 1998. *In vitro* activity of voriconazole against selected fungi. *Med. Mycol.* 36: 239-242.
55. McGinnis, M. R. and L. Pasarell. 1998. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voricinazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2353-2355.
56. Metha, R. T., R. L. Hopper, T. McQueen, R. L. Juliano, and G. Lopez-Berestein. 1987. Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated nystatin for systemic fungal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1901-1903.
57. Metha, J. 1997. Do variations in molecular structure affect the clinical efficacy and safety of lipid-based amphotericin B preparations ?. *Leukemia Research.* 21: 183-188.
58. Murphy, M. E. M. Bernard, T. Ishimaru, and D. Armstrong. 1997. Activity of voriconazole (UK-109,496) against clinical isolates of *Aspergillus* species and its effectiveness in an experimental model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents chemother.* 41: 696-698.

59. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts; Proposed standard. NCCLS document M27-P. NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085.
60. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts; Tentative standard. NCCLS document M27-T. NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085.
61. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts; Approved standard. NCCLS document M27-A. NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085.
62. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard. NCCLS document M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
63. Nomeir, A. A., P. Kumari, M. J. Hilbert, S. Gupta, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, R. Hare, G. H. Miller, Ch-Ch. Lin, and M. N. Cayen. 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.

64. Oakley, K. L., C. B. Moore, and D. W. Denning. 1997. *In vitro* activity of SCH-56592 and comparison with activities of amphotericin B and itraconazole against *Aspergillus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1124-1126.
65. Pappagianis, D. 1993. Coccidioidomycosis. *Semin. Dermatol.* 12: 301-309.
66. Perfect, J. R. G. M. Cox, R. K. Dodge, and W. A. Schell. 1996. *In vitro* and *in vivo* efficacies of the azole SCH 56592 against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1910-1913.
67. Peterson C. M., K. Schuppert, P. C. Kelly, and D. Pappagianis. 1993. Coccidioidomycosis and pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* 48: 149-156.
68. Pfaller, M. A., L. Burmeister, M. S. Bartlett, and M. G. Rinaldi. 1988. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1437-1441.
69. Pfaller, M. A. and M. G. Rinaldi. 1993. Antifungal susceptibility testing: current state of technology, limitations and standardization. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 7: 435-444.
70. Pfaller, M. A., J. H. Rex, and M. G. Rinaldi. 1997. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin. Infect. Dis.* 24: 776-784.

71. Pfaller, M. A., S. Messer, and R. N. Jones. 1997. Activity of a new triazole, Sch 56592, compared with those of four other antifungal agents tested against clinical isolates of *Candida* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 233-235.
72. Proknow, J. J. and C. G. Clayton. 1958. Treatment of the deep mycoses. *Arch. Intern. Med.* 101: 765-802.
73. Pujol, I. J. Guarro, J. Sala, and M. D. Riba. 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.
74. Rex, J. H., M. A. Pfaller, M. Rinaldi, A. Polak, and J. N. Galgiani. 1993. Antifungal susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 367-38.
75. Rex, J. H., M. A. Pfaller, J. N. Galgiani, M. S. Bartlett, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, M. Lancaster, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, T. J. Walsh, and A. L. Barry. 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin. Infect. Dis.* 24: 235-247.

76. Rinaldi, M. G. 1982. Use of potato flakes agar in clinical mycology. *J. Clin. Microbiol.* 15: 1159-1160.
77. Rippon, J. W. *Tratado de micología médica.* 1990. Interamericana McGraw-Hill. 3ª ed. 467-510.
78. Robinson, R. F. And M. C. Nahata. 1999. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. *J. Clin. Pharm. Ther.* 24; 249-257.
79. Sugar, A. M. and X-P. Liu. 1996. *In vitro* and *in vivo* activities of SCH 56592 against *Blastomyces dermatitidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1314-1316.
80. Stevens, D. A. 1983. Coccidioidomycosis and the indications for chemotherapy. *Drugs* 26: 334-336.
81. Stevens, D. A. 1983. Miconazole in the treatment of coccidioidomycosis. *Drugs* 26: 347-354.
82. Stevens, D. A. 1995. Coccidioidomycosis. *N. Engl. J. Med.* 32: 1077-1082.
83. Storm, G., and E. van Etten. 1997. Biopharmaceutical aspects of lipid formulations of amphotericin B. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 64-73.

84. Sutton, D. A., A. W. Fothergill, and M. G. Rinaldi. **Guide to clinically significant fungi.** 1998. Williams & Wilkins. 1st ed. 136-137.
85. Tucker, R. M., J. N. Galgiani, D. W. Denning, L. H. Hanson, J. R. Graybill, K. Sharkey, M. R. Eckeman, C. Salemi, R. Libke, R. A. Klein and D. A. Stevens. 1990. Treatment of coccidioidal meningitis with fluconazole. *Rev. Infect. Dis.* 12 (Suppl.3): S380-389.
86. U. S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 4th Ed. p. 17-52. U. S. Government Printing office, Washington DC.
87. Walsh, T. J., J. W. Hiemenz, N. L. Seibel, J. R. Perfect, G. Horwith, L. lee, J. L. Silber, M. J. DiNubile, A. Reboli, E. Bow, J. Lister, and E. J. Anaissie. 1998. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1383-1396.
88. Wasan, K. M. and G. Lopez-Berestein. 1997. Diversity of lipid-based polyene formulations and their behavior in biological systems. *Eur. J. Clin. Microbial. Infect. Dis.* 16: 81-92.
89. Werner, S. B., D. Pappagianis, I. Heindl and A. Mickel. 1972. An epidemic of coccidioidomycosis among archeology students in northern California. *N. Engl. J. Med.* 286: 507-512.

90. Wildfeuer, A., H. P. Seidl, I. Paule, and A. Haberreiter. 1997. *In vitro* evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses*. 41: 309-319
91. Wong-Beringer, A., R. a. Jacobs, and B. J. Guglielmo. 1998. Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. 27: 603-618.



