Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Ιατρικής

The University of Texas
MD Anderson Cancer Center

Department of Infectious Diseases,

Infection Control & Employee Health

Η ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΜΙΔΙΝΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΦΟΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΜΕ ΔΙΗΘΗΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΦΟΥΣΑΡΙΩΣΗ

Διδακτορική Διατριβή

Μιχαήλ Σ. Λιονάκης

Ιατρός

Ηράκλειο Κρήτης, Δεκέμβριος 2007

Αφιερώνεται
στο Στέλιο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

Όρκος Ιπποκράτη 8

Χαρακτηριστικά διδακτορικής διατριβής 9

Βιογραφικό σημείωμα 10

Ευχαριστίες 19

Ελληνική περίληψη 21

Αγγλική περίληψη (English summary) 24

Πρόλογος 27

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 29

1. Επιδημιολογία της διηθητικής φουσαρίωσης 29

2. Παθογένεση της διηθητικής φουσαρίωσης: Ομάδες ασθενών σε αυξημένο κίνδυνο 34

2α. Χαρακτηριστικά του ξενιστή 34

α1. Κορτικοστεροειδή 34

α2. Ουδετεροπενία 35

α3. Άλλα χαρακτηριστικά του ξενιστή 36

2β. Χαρακτηριστικά του υφομύκητα *Fusarium* 38

β1. Παραγωγή τοξινών 38

1. Διατροφική τοξική αλευκία (alimentary toxic aleukia - ATA) 41

2. Νόσος *Kashin-Beck* 42

3. Νόσος *Akakabi-byo* 42

β2. Παραγωγή κυκλοσπορίνης και αγγειοτρόπες ιδιότητες 43

β3. Προσκολλητικές ιδιότητες 44

1. Κερατίτιδα σε χρήστες φακών επαφής 45
2. Περιτονίτιδα σε χρήστες συνεχούς περιτοναϊκής αιμοκάθαρσης 46
3. Μυκηταιμία σε ασθενείς με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες 46

3. Κλινικές εκδηλώσεις της διηθητικής φουσαρίωσης 48

3α. Εισαγωγή 48

3β. Πυρετός αγνώστου αιτιολογίας 48

3γ. Πνευμονία με ή χωρίς συμμετοχή των παραρρίνιων κόλπων 48
3δ. Άλλες κλινικές εκδηλώσεις της διηθητικής φουσαρίωσης 54
4. Εργαστηριακή διάγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης: Διαφορική διάγνωση από διηθητικές μυκητιασικές λοιμώξεις 57
4α. Εισαγωγή 57
4β. Ιστοπαθολογία 57
4γ. *In situ* υβριδισμός 59
4δ. Καλλιέργεια 60
4ε. Μέτρηση επιπέδων β-γλυκάνης 64
4ζ. Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης 64
4η. Επαναλαμβανόμενη (*repetitive*) αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (*rep-PCR*) με βάση την τεχνική *Diversi Lab* 64
4θ. Άλλες τεχνικές 65
4ι. Διαφορές μεταξύ διηθητικής φουσαρίωσης και ασπεργίλλωσης 65
1. Θετικές αιμοκαλλιέργειες 65
2. Δερματική συμμετοχή 68
5. Ευαισθησία του υφομύκητα *Fusarium* σε αντιμυκητιασικά φάρμακα – Θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης 72
5α. Εισαγωγή 72
5β. Αμφοτερικίνη Β 73
5γ. Ναταμυκίνη και θεραπεία κερατίτιδας από τον υφομύκητα *Fusarium* 76
5δ. Νυστατίνη 78
5ε. Αζόλες 79
5ζ. Εχινοκανδίνες και νικκομυκίνη Ζ 81
5η. Άλλα φάρμακα και πειραματικές ουσίες με αντιμυκητιασική δράση έναντι του υφομύκητα *Fusarium* 81
5θ. Συνδυαστική αντιμυκητιασική θεραπεία 82
5ι. Μέτρα για την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος 84
5κ. Χειρουργική θεραπεία 85
5λ. Σύνοψη 85

6. Πρόληψη φουσαρίωσης 88

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 90

Πενταμιδίνη 90

α. Εισαγωγή 90

β. Φαρμακολογία 90

γ. Παρενέργειες 92

δ. Αντιμικροβιακό φάσμα 94

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α′: *In vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* 95

1. Μέθοδοι πειραμάτων Ειδικού Μέρους Α′ 95

1α. Στελέχη *Fusarium* 95

1β. Μέθοδος *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (*NCCLS*) *M38-P* 96

1γ. Χρωματομετρική μέθοδος *XTT* 99

1δ. Χρώση των στελεχών *Fusarium* με *CFDA* και *DiBAC* 100

1ε. *Time-kill* μέθοδος με τη χρήση *XTT* 102

1ζ. Δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών *Fusarium* σε ένα θάλαμο με χαμηλή τάση οξυγόνου 103

1η. Μέθοδος *disk diffusion susceptibility testing* 103

1θ. Στατιστική ανάλυση 105

2. Αποτελέσματα πειραμάτων Ειδικού Μέρους Α′ 107

2α. Ευαισθησία των στελεχών *Fusarium* στα αντιμυκητιασικά φάρμακα και την πενταμιδίνη 107

2β. Σύγκριση των οπτικών (μέθοδος *NCCLS*) και σπεκτροφωτομετρικών (μέθοδος *XTT*) τιμών ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*MIC*) έναντι του υφομύκητα *Fusarium* 110

2γ. Φαρμακοδυναμική ανάλυση της δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* με βάση τη μέθοδο *XTT* 111

2δ. Χρώση στελεχών *Fusarium* με *CFDA* και *DiBAC* 113

2ε. Δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* υπό συνθήκες υποξίας 116

3. Συμπεράσματα πειραμάτων Ειδικού Μέρους Α′ 119

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β′: *In vitro* αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium* 126

1. Μέθοδοι πειραμάτων Ειδικού Μέρους Β′ 127

1α. Στελέχη *Fusarium* 127

1β. Μέθοδος *checkerboard* 127

1γ. Μέθοδος *disk diffusion susceptibility testing* 128

1δ. Στατιστική ανάλυση 129

2. Αποτελέσματα πειραμάτων Ειδικού Μέρους Β′ 130

2α. Η πενταμιδίνη δρα συνεργικά με την αμφοτερικίνη Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium* σύμφωνα με τη μέθοδο *checkerboard* 130

2β. Αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium* με βάση τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing* 132

3. Συμπεράσματα πειραμάτων Ειδικού Μέρους Β′ 135

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Γ′: *In vivo* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* σε ουδετεροπενικό πειραματικό μοντέλο ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση 141

1. Μέθοδοι πειραμάτων Ειδικού Μέρους Γ′ 141

1α. Στέλεχος *Fusarium* 141

1β. Ποντίκια 142

1γ. Ανοσοκαταστολή 142

1δ. Αντιμυκητιασικά φάρμακα 143

1ε. Καλλιέργεια κονιδίων *Fusarium* 145

1ζ. Διαλύματα κονιδίων *Fusarium* με διαφορετικές συγκεντρώσεις 145

1η. Εγκατάσταση της πνευμονικής λοίμωξης 146

1θ. Προφύλαξη και θεραπεία με πενταμιδίνη και αμφοτερικίνη Β 147

1ι. Ποσοτικοποίηση του εύρους πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* με βάση τη μέθοδο της ποσοτικής αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης (*qPCR*) 148

1κ. Ιστοπαθολογική ανάλυση 150

1λ. Στατιστική ανάλυση 150

2. Αποτελέσματα πειραμάτων Ειδικού Μέρους Γ' 151

2α. Εγκατάσταση ουδετεροπενικού πειραματικού μοντέλου ποντικού *Balb-c* με οξεία διηθητική πνευμονική φουσαρίωση 151

2β. Η προφύλαξη με πενταμιδίνη έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση των ποντικών *Balb-c* και την ελάττωση του εύρους της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* σε σχέση με την προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β και τα ποντίκια-μάρτυρες 152

2γ. Η θεραπεία με πενταμιδίνη έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση των ποντικών *Balb-c* αλλά δεν επηρεάζει το εύρος της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες 153

3. Συμπεράσματα πειραμάτων Ειδικού Μέρους Γ' 158

Σύνοψη συμπερασμάτων διδακτορικής διατριβής 161

Βιβλιογραφικές αναφορές 165

Ευρετήριο 204

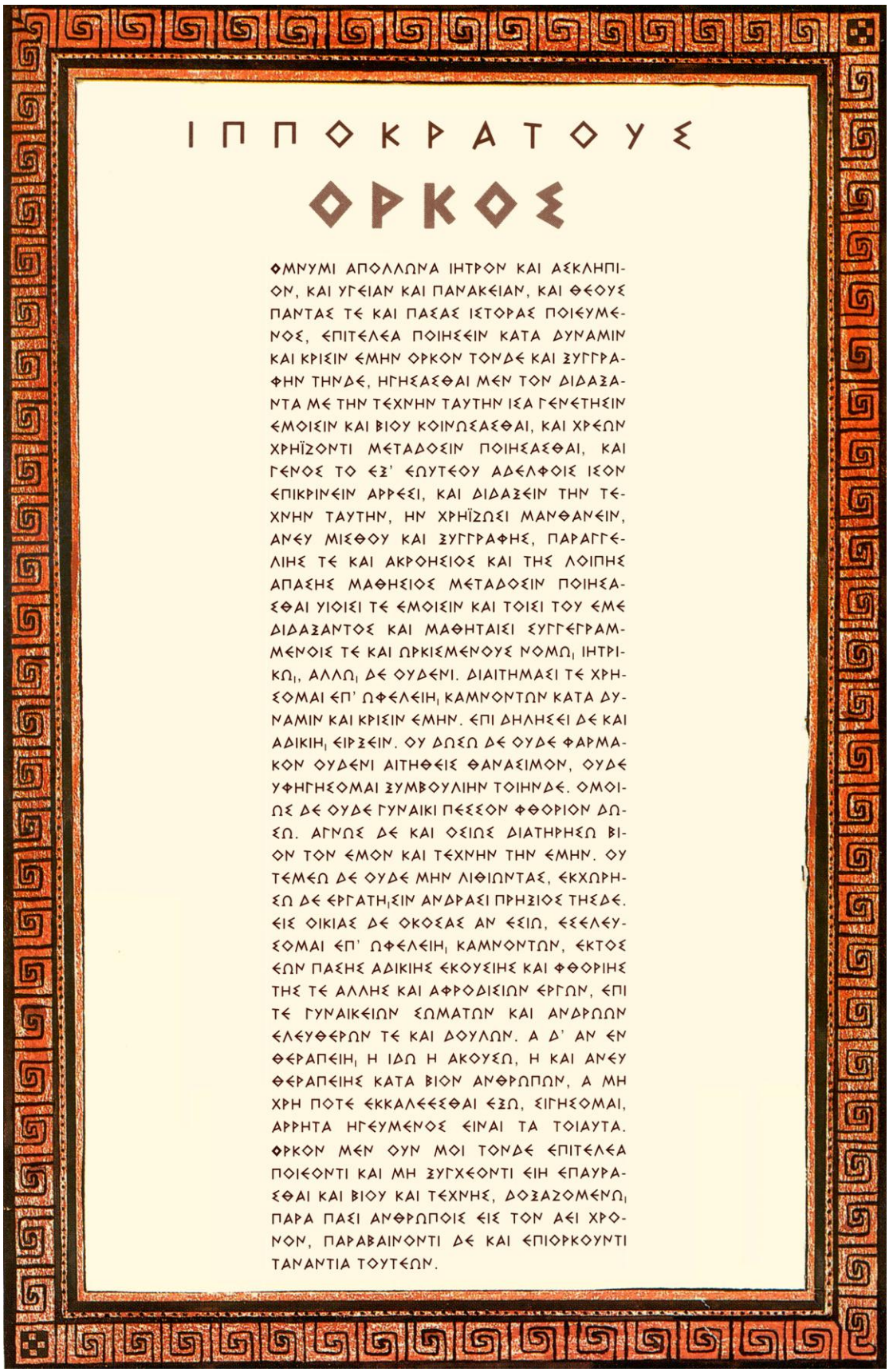
Βιβλιογραφικές αναφορές που προέκυψαν κατά τη διενέργεια της διδακτορικής διατριβής 212

1. Lionakis MS, Lewis RE, Samonis G and Kontoyiannis DP. Pentamidine is active *in vitro* against *Fusarium* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47, 3252-3259.

2. Lionakis MS and Kontoyiannis DP. *Fusarium* infections in critically ill patients. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25, 159-169.

3. Lionakis MS, Chamilos G, Lewis RE, Wiederhold NP, Raad II, Samonis G and Kontoyiannis DP. Pentamidine is active in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50, 294-297.

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ



ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ, ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ, ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙΝ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΪΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ' ΕΩΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΪΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙΝ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΥΣ ΝΟΜΩι ΙΗΤΡΙΚΩι, ΑΛΛΩι ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗι ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ. ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗι ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗιΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΙΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗι ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ, ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗι Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩι ΠΑΡΑ ΠΑΣΙ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

του Ιατρού Μιχαήλ Σ. Λιονάκη

ΤΙΤΛΟΣ: Η δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium in vitro* και *in vivo* σε πειραματικό μοντέλο ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση.

Παρέχεται από το τμήμα Λοιμωξιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επιβλέπων:

Καθηγητής Γεώργιος Σαμώνης

Τριμελής Επιτροπή:

Καθηγητής Γεώργιος Σαμώνης

Καθηγητής Βασίλειος Γεωργούλιας

Καθηγήτρια Μαρία Καλμαντή

Μέλη Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Καθηγητής Γεώργιος Σαμώνης

Καθηγητής Βασίλειος Γεωργούλιας

Καθηγήτρια Μαρία Καλμαντή

Καθηγητής Δημήτριος Μπούμπας

Καθηγήτρια Ελένη Παπαδάκη

Καθηγητής Αχιλλέας Γκίκας

Αναπληρωτής Καθηγητής Δημήτριος Μαυρουδής

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. Εκπαίδευση	**Τίτλος**	**Έτος**
Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Κρήτης	Πτυχίο Ιατρικής	1994 – 2000
Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο Κατερίνης και Περιφερειακό Ιατρείο Αλωνίων Πιερίας	Αγροτικός Ιατρός	2000 – 2002
Έναρξη της διδακτορικής διατριβής		2002
The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Department of Infectious Diseases, Infection Control & Employee Health, Houston, Texas, USA	Μεταδιδακτορικός ερευνητής	2002 – 2004
Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA	Ειδικευόμενος Παθολογίας	2004 – 2007
National Institutes of Allergy & Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA	Ειδικευόμενος Λοιμωξιολογίας	2007 – 2010
Ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής		2007

2. Διακρίσεις – Υποτροφίες

1. Henry D. McIntosh Award for Outstanding Resident in Internal Medicine, Baylor College of Medicine (2007).
2. Κατάταξη στην 99η εκατοστιαία θέση στις εξετάσεις ειδικευομένων σε όλη την Αμερική για το έτος 2006, Baylor College of Medicine (2006).
3. 1ος νικητής του διαγωνισμού American College of Physicians (ACP) Associates Day 2006 για την εργασία "Pentamidine has activity in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis", Texas Academy of Internal Medicine (TAIM). Clear Lake City, TX, USA (2006).
4. 1ος νικητής του διαγωνισμού American College of Physicians (ACP) Associates Day 2006 για την παρουσίαση "A 53 year old smoker with weight loss and a lung mass", Texas Academy of Internal Medicine (TAIM). Clear Lake City, TX, USA (2006).
5. Επιλεγείς για το διαγωνισμό Medical Jeopardy Competition του American College of Physicians (ACP) Associates Day 2006, Texas Academy of Internal Medicine (TAIM), Clear Lake City, TX, USA (2006) όπου το Baylor College of Medicine κατετάγει στην 1η θέση.
6. Κατάταξη στην 95η εκατοστιαία θέση στις εξετάσεις ειδικευομένων σε όλη την Αμερική για το έτος 2005, Baylor College of Medicine (2005).
7. 1ος νικητής του διαγωνισμού της Ακαδημίας Παθολογίας του Τέξας [Texas Academy of Internal Medicine (TAIM)], American College of Physicians (ACP) Associates Day 2005 για την εργασία " Combinatorial selection of targeting peptides in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis ", The Woodlands, TX, USA (2005).
8. Πρόταση για Chief Medical Residency στο Baylor College of Medicine (2005).
9. 1ος νικητής του διαγωνισμού American College of Physicians (ACP) Associates Day 2005 για την εργασία "*Toll*-deficient fruit flies as a fast, high-throughput model for the study of

antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence", Texas Academy of Internal Medicine (TAIM), Galveston, TX, USA (2005).

10. 1ος νικητής του Bristol-Myers Squibb Award in Clinical/Translational Research για την εργασία "*Drosophila melanogaster* as an alternative *in vivo* model to study candidiasis", 9th Trainee Recognition Day, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center (2005).
11. Κατάταξη στην 98η εκατοστιαία θέση στις εξετάσεις ειδικευομένων σε όλη την Αμερική για το έτος 2004, Baylor College of Medicine (2004).
12. 1ος νικητής του Bristol-Myers Squibb Award in Clinical/Translational Research για την εργασία "*Drosophila melanogaster*: A mini-host *in vivo* model to study *Aspergillus* virulence and the efficacy of antifungals in invasive aspergillosis", 8th Trainee Recognition Day, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center (2004).
13. Certificate of Achievement, Department of Infectious Diseases, Infection Control & Employee Health, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center (2004).
14. Κατάταξη στην 99η εκατοστιαία θέση στις εξετάσεις United States Medical Licensure Exams (USMLE) Step 2 (2003).
15. Κατάταξη στην 98η εκατοστιαία θέση στις εξετάσεις USMLE Step 1 (2002).
16. Patent αίτηση για την εργασία "Biopanning as an approach to study the pathogenesis of and produce novel treatment modalities for invasive aspergillosis", Kontoyiannis DP, Arap W, Pasqualini R, Lionakis MS, Lahdenranta J, Patent Serial No: 60/502,509 (2003).
17. Απονομή της υποτροφίας χρηματοδότησης έρευνας (*research grant*) "M. D. Anderson Cancer Center/PRS grant" in translational research ως *Co-Investigator*: για την εργασία "*Drosophila* as an alternative *in vivo* model for large-scale screening of the efficacy of absorbed antifungal agents in invasive aspergillosis", (2003) – (*Principal Investigator*: Δημήτριος Π. Κοντογιάννης).
18. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Program Committee Award από την American Society of Microbiology for Outstanding Research in the *Pathogenesis of Microbial Diseases* για την εργασία "A non-vertebrate *in vivo* model to study invasive aspergillosis (IA) and its treatment with oral antifungals: Early experience with *Drosophila*", 43rd ICAAC, Chicago, IL, USA (2003).
19. Press Release Abstract για την εργασία "The significance of isolation of rare molds from the respiratory tract in patients with cancer", 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, IL, USA (2003).
20. Press Release Abstract για την εργασία "Biopanning as an approach to study the pathogenesis of invasive aspergillosis", 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, IL, USA (2003).
21. Υποτροφία *"Γεώργιος Γεννηματάς"*, Αγροτική Τράπεζα της Ελλάδας (2002).
22. Ορκισθείς με τη μεγαλύτερη βαθμολογία (8.66/10) μεταξύ των αποφοιτησάντων του Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης (2000).
23. Τιμητική υποτροφία της *"GlaxoWellcome Pharmaceutical"* για διεξαγωγή μεταπτυχιακών σπουδών στο εξωτερικό (απονέμεται στον πρώτο απόφοιτο του κάθε ακαδημαϊκού έτους) (2000).
24. Υποτροφία Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ακαδημαϊκό έτος 1995 – 1996).
25. Εισαχθείς στο Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Κρήτης με τη μεγαλύτερη βαθμολογία μεταξύ των εισαχθέντων στην ιατρική σχολή (1994).
26. Υποτροφία Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών για την εισαγωγή με τη μεγαλύτερη βαθμολογία στο Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Κρήτης (1994).

27. Τιμητική υποτροφία του Ιδρύματος *"Λίλιαν Βουδούρη"* για την επίτευξη μίας εκ των 50 μεγαλύτερων βαθμολογιών μεταξύ όλων των εξεταζομένων κατά τις Πανελλήνιες Εξετάσεις του ακαδημαϊκού έτους 1993 – 1994 (1994).

3. Ενεργός άδεια εξασκήσεως επαγγέλματος

Ελληνική, #7957, 7/8/2000
State of Maryland Medical License, #D66010, 5/7/2007

4. Συμμετοχή σε επιστημονικούς συλλόγους/οργανισμούς

Ιατρικός Σύλλογος Χανίων (2000 – σήμερα)
American College of Physicians (2004 – σήμερα)
American Society for Microbiology (2005 – σήμερα)
Infectious Diseases Society of America (2007 – σήμερα)

5. Άλλα Διπλώματα

Advanced Cardiovascular Life Support (ACLS) Certificate, 3/2006
Educational Commission for Foreign Medical Graduates (ECFMG) Certificate, 1/2004

6. Reviewer σε Επιστημονικά Περιοδικά

Medical Mycology (2007)

7. Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά (University of Cambridge First Certificate in English το 1989, University of Cambridge Certificate of Proficiency το 1994, TOEFL Certificate το 2003, ACTFL OPI Certificate το 2007)
Ισπανικά

8. Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

1. **Lionakis MS**, Lewis RE, Samonis G and Kontoyiannis DP. Pentamidine is active *in vitro* against *Fusarium* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(10): 3252-3259.
2. Kontoyiannis DP, Lewis RE, **Lionakis MS**, May GS, Albert ND and Raad II. Sequential exposure of *Aspergillus fumigatus* to itraconazole and caspofungin: evidence of enhanced *in vitro* activity. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(2): 415-419.
3. **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet.* 2003; 362(9398): 1828-1838.
4. **Lionakis MS**, Liu W, Lewis RE, Wiederhold NP and Kontoyiannis DP. Attenuation of itraconazole fungicidal activity following pre-exposure of *Aspergillus fumigatus* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(11): 3592-3597.
5. **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. The significance of isolation of saprophytic molds from the lower respiratory tract in patients with cancer. How do the European

Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group criteria apply? *Cancer.* 2004; 100(1): 165-172.

6. **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. *Fusarium* infections in critically ill patients. *Sem Resp Crit Care Med.* 2004; 25(2): 159-169.
7. Liu W, May GS, **Lionakis MS**, Lewis RE and Kontoyiannis DP. Extra copies of the *Aspergillus fumigatus* squalene epoxidase gene confer resistance to terbinafine: A genetic approach to study gene dose-dependent resistance to antifungals in *Aspergillus fumigatus. Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(7): 2490-2496.
8. Steinbach WJ, Benjamin DK Jr, Kontoyiannis DP, Perfect JR, Lutsar I, Marr KA, **Lionakis MS**, Torres HA, Jafri HS and Walsh TJ. Infections due to *Aspergillus terreus:* A multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(2): 192-198.
9. **Lionakis MS**, Bodey GP, Tarrand JJ, Raad II and Kontoyiannis DP. The significance of blood cultures positive for emerging saprophytic molds in patients with cancer. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10(10): 922-925.
10. **Lionakis MS,** Lewis RE, May GS, Wiederhold NP, Albert ND, Halder G and Kontoyiannis DP. *Toll*-deficient fruit flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *J Infect Dis*. 2005; 191(7): 1188-1195.
11. Kontoyiannis DP, **Lionakis MS,** Lewis RE, Chamilos G, Healy M, Perego C, Safdar A, Kantarjian H, Champlin G, Walsh TJ and Raad II. Zygomycosis in the era of *Aspergillus*-active therapy in a tertiary care cancer center: A matched case-control observational study of 27 recent patients. *J Infect Dis*. 2005; 191(8): 1350-1360.
12. **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. Sinus zygomycosis in a patient receiving voriconazole prophylaxis. *Br J Haematol.* 2005; 129(1): 2.
13. **Lionakis MS**, Lewis RE, Torres HA, Albert ND, Raad II and Kontoyiannis DP. Increased frequency of non-*fumigatus Aspergillus* species in amphotericin B– or triazole–pre-exposed cancer patients with positive cultures for aspergilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 52(1): 15-20.
14. **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2005; 43(S1): 111-114.
15. Chamilos G, Marom E, Lewis RE, **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. Predictors of pulmonary zygomycosis versus invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(1): 60-66.
16. **Lionakis MS**, Lewis RE, Chamilos G and Kontoyiannis DP. *Aspergillus* susceptibility testing in cancer patients with invasive aspergillosis: Difficulties in establishing correlation between *in vitro* susceptibility data and the outcome of initial amphotericin B therapy. *Pharmacotherapy.* 2005; 25(9): 1174-1180.
17. **Lionakis MS**, Lahdenranta J, Sun J, Liu W, Lewis RE, Albert ND, Pasqualini R, Arap W and Kontoyiannis DP. Development of a ligand-directed approach to study the pathogenesis of invasive aspergillosis. *Infect Immun.* 2005; 73(11): 7747-7758.
18. Lewis RE, Wiederhold NP, **Lionakis MS**, Prince RA and Kontoyiannis DP. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(12): 6120-6122.

19. **Lionakis MS**, Chamilos G, Lewis RE, Wiederhold NP, Raad II, Samonis G and Kontoyiannis DP. Pentamidine is active in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(1): 294-297.
20. Chamilos G, **Lionakis MS**, Lewis RE, Halder G and Kontoyiannis DP. *Drosophila melanogaster* is a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and drug efficacy in *Candida. J Infect Dis.* 2006; 193(7): 1014-1022.
21. Chamilos G, **Lionakis MS**, Lewis RE and Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(1): 42-55.
22. **Lionakis MS** and Hamill RJ. Pulmonary actinomycosis masquerading as lung cancer. *CMAJ*. Accepted with revisions.

8. Εργασίες σε διεθνή συνέδρια

1. **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. The significance of isolation of rare molds from the respiratory tract in patients with cancer. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago, IL, USA. Abstract # M-2055, 2003.
   [Press Release Abstract – Slide Presentation]
2. **Lionakis MS**, Halder G, Lewis RE, May GS, Albert ND and Kontoyiannis DP. A non-vertebrate *in vivo* model to study invasive aspergillosis and its treatment with oral antifungals: Early experience with *Drosophila*. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago, IL, USA. Abstract # M-477, 2003.
   [ICAAC Program Committee Award from the American Society of Microbiology for Outstanding Research in the *Pathogenesis of Microbial Diseases* – Slide Presentation]
3. **Lionakis MS**, Lahdenranta J, Liu W, Lewis RE, Pasqualini R, Arap W and Kontoyiannis DP. Biopanning as an approach to study the pathogenesis of invasive aspergillosis. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago, IL, USA. Abstract # M-472, 2003.
   [Press Release Abstract – Slide Presentation]
4. **Lionakis MS**, Lewis RE, Torres HA, Rolston KV, Raad II and Kontoyiannis DP. *In vitro* susceptibility of *Aspergillus* clinical isolates to amphotericin B, itraconazole and voriconazole by E-test and the effect of prior antifungal exposure. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago, IL, USA. Abstract # M-1248, 2003.
5. **Lionakis MS**, Lewis RE and Kontoyiannis DP. Pentamidine is active *in vitro* against *Fusarium* species. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago, IL, USA. Abstract # M-962, 2003.
6. **Lionakis MS**, Lewis RE, Liu W, Bodey GP, Albert ND, Rolston KV, Raad II and Kontoyiannis DP. Comparison of the *in vitro* activities of modern antifungals against *Aspergillus* isolates from cancer patients. 41st Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America (IDSA). San Diego, CA, USA. Abstract # 142, 2003.
7. **Lionakis MS**, Tarrand JJ, Bodey GP, Raad II and Kontoyiannis DP. The significance of blood cultures positive for *Scedosporium* species and other rare molds in cancer patients. 41st Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America (IDSA). San Diego, CA, USA. Abstract # 396, 2003.

8. Kontoyiannis DP, **Lionakis MS** and Halder G. *Toll* pathway in *Drosophila melanogaster:* A possible role to study the impact of immune senescence in poor responses against *Aspergillus fumigatus*. 14th Focus on Fungal Infections, New Orleans, LA, USA, Abstract # 31, 2004.
9. **Lionakis MS**, Lewis RE and Kontoyiannis DP. *In vitro* susceptibility testing of *Aspergillus* to amphotericin B: Correlation with outcome of initial amphotericin B therapy in cancer patients with invasive aspergillosis. 13th International Symposium on Infections in the Immunocompromised Host. Granada, Spain, 2004.
   [Abstract published in *Int J Infect Dis*. 2004; 8 Suppl: S51]
10. Kontoyiannis DP, **Lionakis MS**, Lewis RE, Walsh TJ and Raad II. Zygomycosis in the era of voriconazole use in a tertiary care cancer center: A matched case-control observational study of 27 recent patients. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, DC, USA. Abstract # M-665, 2004.
    [Slide Presentation]
11. Lewis RE, Wiederhold, NP, **Lionakis, MS**, Chi J, Prince RA and Kontoyiannis DP. Frequency and distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary care cancer center. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, DC, USA. Abstract # M-245, 2004.
12. **Lionakis MS**, Halder G, Lewis RE, Wiederhold NP, May GS and Kontoyiannis DP. Experimental aspergillosis in *Drosophila*: Influence of mode of infection on *Aspergillus* virulence. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, DC, USA. Abstract # M-223, 2004.
13. **Lionakis MS**, Halder G, Lewis RE, Wiederhold NP and Kontoyiannis DP. Efficacy of voriconazole in experimental aspergillosis in *Drosophila*. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, DC, USA. Abstract # M-1139, 2004.
    [Slide Presentation]
14. Chamilos G, **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. *Drosophila melanogaster* as an alternative *in vivo* model to study candidiasis. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, DC, USA. Abstract # M-240a, 2004.
    [Late-Breaker Abstract]
15. Tarrand JJ, **Lionakis MS**, Han XY and Kontoyiannis DP. *Aspergillus* galactomannan detection: A new sensitive micro-agglutination procedure. 42nd Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America (IDSA). Boston, MA, USA. Abstract # 618, 2004.
16. **Lionakis MS**, Lahdenranta J, Pasqualini R, Chamilos G, Arap W and Kontoyiannis DP. Combinatorial selection of targeting peptides in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, DC, USA, 2005.
17. **Lionakis MS**, Chamilos G, Lewis RE, Samonis G, Raad II and Kontoyiannis DP. Pentamidine has activity in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, DC, USA, 2005.
    [Slide Presentation]

18. Chamilos G, Lewis RE, **Lionakis MS**, May GS, Halder G and Kontoyiannis DP. Experimental zygomycosis in *Drosophila melanogaster*. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington, DC, USA, 2005.
19. Moran A, **Lionakis MS**, Mastrangelo MM, Wu Y and Tweardy DJ. Increased susceptibility to and mortality from *Pseudomonas aeruginosa* (PA) pneumonia following hemorrhagic shock (HS)-induced lung apoptosis. 45th Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America (IDSA). San Diego, CA. 2007.

9. Εργασίες σε άλλα συνέδρια

1. Παπουτσιδάκης Ε, **Λιονάκης Μ**, Σμπυράκις. Παιδική κακοποίηση. Πρακτικά 7ου Πανελλήνιου Συνέδριου Φοιτητών Ιατρικής. Λάρισα, 2001, σελίδα 162.
2. **Lionakis MS**, Liu W, Lahdenranta J, Lewis RE, Pasqualini R, Arap W and Kontoyiannis DP. Biopanning as an approach to study the pathogenesis of invasive aspergillosis. 7th Trainee Recognition Day, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, 2003.
3. **Lionakis MS**, Lewis RE and Kontoyiannis DP. Pentamidine is active *in vitro* against *Fusarium* species and acts in a synergistic manner with amphotericin B. 7th Trainee Recognition Day, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, 2003.
4. **Lionakis MS**, Halder G and Kontoyiannis DP. *Drosophila melanogaster:* A mini-host *in vivo* model to study *Aspergillus* virulence and the efficacy of antifungals in invasive aspergillosis. 8th Trainee Recognition Day, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, 2004.
   [1st place winner of the Bristol-Myers Squibb Award in Clinical/Translational Research – Presented at The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center Institutional Grand Rounds]
5. **Lionakis MS**, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W and Kontoyiannis DP. Combinatorial selection of targeting peptides in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. American College of Physicians (ACP) Associates Day 2005, Texas Academy of Internal Medicine (TAIM). Galveston, TX, USA, 2005.
6. **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. *Toll*-deficient fruit flies as a fast high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. American College of Physicians (ACP) Associates Day 2005, Texas Academy of Internal Medicine (TAIM). Galveston, TX, USA, 2005.
   [1st place winner of the Associates' Research Poster Competition]
7. Chamilos G, **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. *Drosophila melanogaster* as an alternative *in vivo* model to study candidiasis. 9th Trainee Recognition Day, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, 2005.
   [1st place winner of the Bristol-Myers Squibb Award in Clinical/Translational Research]
8. **Lionakis MS**, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W and Kontoyiannis DP. Combinatorial selection of targeting peptides in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. 2005 Annual Meeting of the Texas Academy of Internal Medicine (TAIM), American College of Physicians (ACP) Texas Chapter, The Woodlands, TX, USA, 2005.
   [1st place winner of the Associates' Poster Competition]

9. **Lionakis MS** and Kontoyiannis DP. *Toll*-deficient fruit flies as a fast high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. 2005 Annual Meeting of the Texas Academy of Internal Medicine (TAIM), American College of Physicians (ACP) Texas Chapter, The Woodlands, TX, USA, 2005.
10. **Lionakis MS**, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W and Kontoyiannis DP. Combinatorial selection of targeting peptides in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. 58th Annual Symposium on Cancer Research, "*Discovery validation and integration of molecular markers and molecular imaging: Toward an implementation into clinical practice*", M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA, 2005.
11. **Lionakis MS**, Chamilos G and Kontoyiannis DP. Pentamidine has activity in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. American College of Physicians (ACP) Associates Day 2006, Texas Academy of Internal Medicine (TAIM). Clear Lake City, TX, USA, 2006.
    [1st place winner of the Associates' Poster Competition]
12. **Lionakis MS** and Hamill RJ. A 53 year old smoker with weight loss and a lung mass. American College of Physicians (ACP) Associates Day 2006, Texas Academy of Internal Medicine (TAIM). Clear Lake City, TX, USA, 2006.
    [Oral Presentation – 1st place winner of the Clinical Vignette Oral Presentation Competition]
13. **Lionakis MS**, Chamilos G and Kontoyiannis DP. Pentamidine has activity in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. Annual Meeting of the Texas Academy of Internal Medicine (TAIM), American College of Physicians (ACP) Texas Chapter. Horseshoe Bay, TX, USA (2006)
    [3rd place winner of the Associates' Poster Competition]
14. **Lionakis MS** and Hamill RJ. A 53 year old smoker with weight loss and a lung mass. Annual Meeting of the Texas Academy of Internal Medicine (TAIM), American College of Physicians (ACP) Texas Chapter. Horseshoe Bay, TX, USA (2006).
    [Oral Presentation – 2nd place winner of the Clinical Vignette Oral Presentation Competition]
15. **Lionakis MS** and Shandera WX. "Can't walk, can't pee…" American College of Physicians (ACP) Associates Day 2007, Texas Academy of Internal Medicine (TAIM). Galveston, TX, USA, 2007.
16. **Lionakis MS** and Graham WR. An usual cause of upper gastrointestinal bleeding. American College of Physicians (ACP) Associates Day 2007, Texas Academy of Internal Medicine (TAIM). Clear Lake City, TX, USA, 2007.

8. Προσκεκλημένος ομιλητής

1. Invited Lecturer, Departmental Research Seminar Meeting, Department of Infectious Diseases, Infection Control & Employee Health, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, "*Drosophila melanogaster*: A mini-host *in vivo* model to study *Aspergillus* virulence and the efficacy and toxicity of antifungals in invasive aspergillosis". 4/2004.

2. Invited Lecturer, Advances in Oncology Institutional Grand Rounds, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center: "*Drosophila melanogaster*: A mini-host *in vivo* model to study *Aspergillus* virulence and the efficacy of antifungals in invasive aspergillosis". 5/2004.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα καταρχήν να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή Παθολογίας – Λοιμωξιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Γεώργιο Σαμώνη, όχι μόνο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή, αλλά και επειδή από τα πρώτα μου φοιτητικά χρόνια έχει υπάρξει ακατάπαυστος δάσκαλος και καθοδηγητής. Είναι ο άνθρωπος στον οποίο οφείλω την όμορφη περιπέτεια μου στην Αμερική για τη διενέργεια της διδακτορικής διατριβής και την πραγματοποίηση της ειδικότητας Παθολογίας και υποειδικότητας Λοιμωξιολογίας καθώς παντά με παρότρυνε για αυτό και είναι αυτός ο οποίος με γνώρισε στον κ. Κοντογιάννη και με έστειλε στην Αμερική.

Εξίσου θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή Παθολογίας – Λοιμωξιολογίας στο *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* στο Χιούστον του Τέξας κ. Δημήτριο Π. Κοντογιάννη, για τη δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω τη διδακτορική διατριβή στο εργαστήριο του, αλλά κυρίως για τη συνεχή καθοδήγηση και αμέριστη βοήθεια του κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στην Αμερική. Στον κ. Κοντογιάννη οφείλω τη διαμόρφωση της επιστημονικής μου σκέψης καθώς έχει αποτελέσει ανεκτίμητο και σπάνιο μέντορα σε κάθε επιστημονικό μου βήμα και είναι ο άνθρωπος στον οποίο οφείλω πολλά από όσα έχω καταφέρει στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καλό μου φίλο και συνάδελφο Γεώργιο Χαμηλό για την πολύτιμη βοήθεια του στη διεξαγωγή ορισμένων πειραμάτων αυτής της διδακτορικής διατριβής. Παράλληλα, θα ήταν παράλειψη να μην ανέφερα άλλους πολύτιμους συνεργάτες μου στο εργαστήριο του κ. Κοντογιάννη όπως ο Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας στο *College of Pharmacy* του *University of Houston Russell E. Lewis*, ο Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας στο *University of Texas at Austin Nathan P. Wiederhold*, και ο *Nathaniel D. Albert* για τη βοήθεια τους στην περάτωση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστίες επίσης θα ήθελα να απευθύνω στην Καθηγήτρια Παιδιατρικής κ. Μαρία Καλμαντή και στον Καθηγητή Ογκολογίας κ. Βασίλειο Γεωργούλια που αποτελούν μαζί με τον κ. Σαμώνη την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή στο Πανεπιστήμιο της Κρήτης για την

διατριβή αυτή καθώς και στους Καθηγητες κκ. Δημήτριο Μπούμπα, Αχιλλέα Γκίκα, Δημήτριο Μαυρουδή και Ελένη Παπαδάκη που συμπληρώνουν την επταμελή συμβουλευτική επιτροπή. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ταμείο Υγείας των Υπαλλήλων της Αγροτικής Τράπεζας της Ελλάδας (ΤΥΠΑΤΕ) το οποίο μου απένειμε την υποτροφία *"Γεώργιος Γεννηματάς"* και τη φαρμακευτική εταιρεία *GlaxoWelcome* για την απονομή υποτροφίας για διενέργεια έρευνας στο εξωτερικό κατά την ορκομωσία μου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης. Και οι δύο αυτές υποτροφίες ήταν σημαντικοί οικονομικοί αρωγοί για την επιτυχημένη περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα με την ευκαιρία αυτή να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου, Αθηνά και Σπύρο Λιονάκη, χωρίς την οικονομική και, κυρίως, ηθική υποστήριξη των οποίων δεν θα είχα καταφέρει να φέρω σε πέρας όλο αυτό το εγχείρημα, καθώς επίσης και τον αδελφό μου Στέλιο, στον οποίο είναι εξαιρετικά αφιερωμένη η παρούσα διδακτορική διατριβή.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, η διηθητική φουσαρίωση έχει εξελιχθεί σε μια σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας σε ασθενείς με σημαντικού βαθμού ανοσοκαταστολή όπως είναι ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες και αποδέκτες αλλογενούς μεταμόσχευσης του μυελού των οστών. Τα χρησιμοποιούμενα αντιμυκητιασικά φάρμακα έχουν μικρή δραστικότητα έναντι του υφομύκητα *Fusarium* με αποτέλεσμα την πολύ υψηλή θνητότητα της ευκαιριακής αυτής λοίμωξης.

Μέθοδοι

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκε η *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι 10 κλινικών στελεχών *Fusarium* (5 στελέχη *Fusarium solani* και 5 non-*Fusarium solani* στελέχη) χρησιμοποιώντας διάφορες μικροβιολογικές τεχνικές (*NCCLS M-38P*, *disk diffusion susceptibility testing*, χρήση φθορίζουσων χρωστικών *CFDA* και *DiBAC*) σε διαφορετικά μέσα καλλιέργειας (*RPMI*, *RPMI-2*, *YNB*) και υπό διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου (αερόβιες, μικροαεροφιλικές, αναερόβιες). Επίσης, μελετήθηκε η *in vitro* αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β έναντι των στελεχών *Fusarium* με τη χρήση των μεθόδων *checkerboard* και *disk diffusion susceptibility testing*. Στη συνέχεια έγινε μελέτη της *in vivo* δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* ως προφύλαξη ή θεραπεία σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με οξεία διηθητική πνευμονική φουσαρίωση. Συγκεκριμένα, σε *Balb-c* ποντίκια προκλήθηκε ουδετεροπενία με χορήγηση ενδοπεριτοναϊκής (*IP*) κυκλοφωσφαμίδης και 96 ώρες αργότερα τα ποντίκια μολύνθηκαν μέσω της ενδορινικής/αναπνευστικής οδού με κονίδια ενός κλινικού στελέχους *Fusarium oxysporum*, ακολουθούμενο από μια ακόμα *IP* ένεση κυκλοφωσφαμίδης 24 ώρες αργότερα. Διαφορετικές ομάδες ποντικών (10 σε κάθε ομάδα) έλαβαν: (α) προφύλαξη με πενταμιδίνη (8.5 mg/kg/24 ώρες ενδοφλέβια [*IV*] ξεκινώντας 24 ώρες πριν την εγκατάσταση της λοίμωξης), ή (β) θεραπεία με πενταμιδίνη (8.5 mg/kg/24 ώρες IV ξεκινώντας 6 ώρες μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης), ή (γ) προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β (1.5 mg/kg/24 ώρες IP ξεκινώντας 24 ώρες πριν την εγκατάσταση της λοίμωξης), ή (δ) φυσιολογικό ορό (μάρτυρας). Η επιβίωση των ποντικών καταγράφηκε κάθε 12 ώρες μέχρι 96 ώρες μετά την

εγκατάσταση της λοίμωξης οπότε τα εναπομείναντα ζωντανά ποντίκια θανατώθηκαν με ευθανασία. Οι πνεύμονες των ποντικών συλλέγθηκαν με σκοπό την ποσοτικοποίηση του εύρους της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* με βάση την ποσοτική αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (*qPCR*) όπως επίσης και για την ποιοτική ανάλυση της πνευμονικής διήθησης με τη χρήση ιστοπαθολογίας.

Αποτελέσματα

Η πενταμιδίνη είχε *in vitro* δραστικότητα έναντι και των 10 κλινικών στελεχών *Fusarium*. Τα στελέχη non-*Fusarium solani* ήταν πιο ευαισθητα στην πενταμιδίνη από ότι τα αντίστοιχα στελέχη *Fusarium solani* ($P < 0.05$). Επιπλέον, η πενταμιδίνη είχε μυκητοκτόνο δράση έναντι των non-*Fusarium solani* στελεχών, ενώ ήταν μυκητοστατική έναντι 4 εκ των 5 στελεχών *Fusarium solani*. Η πενταμιδίνη είχε μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι των κονιδίων του υφομύκητα σε σχέση με τη δραστικότητα της έναντι των υφών *Fusarium*. Η μυκητοκτόνος δράση της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών non-*Fusarium solani* επιβεβαιώθηκε εν συνεχεία μικροσκοπικά με χρώση υφών *Fusarium oxysporum* οι οποίες είχαν εκτεθεί προηγουμένως σε πενταμιδίνη με τις φθορίζουσες χρώσεις *5,(6)-carboxyfluorescein diacetate* (*CFDA*) και *bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol* (*DiBAC*). Οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της πενταμιδίνης στις οποίες το 50% των στελεχών είχαν αναστολή της ανάπτυξης τους (MIC_{50}: 2 μg/ml για τα στελέχη non-*Fusarium solani* και 4 μg/ml για τα στελέχη *Fusarium solani*) όπως και η τιμή της ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης της πενταμιδίνης στην οποία το 50% των στελεχών θανατώθηκαν (MFC_{50}: 8 μg/ml για τα στελέχη non-*Fusarium solani*) ήταν κατά πολύ μικρότερες από τις συγκεντρώσεις της πενταμιδίνης οι οποίες μπορούν να επιτευχθούν στους ιστούς ασθενών οι οποίοι λαμβάνουν συνήθεις δόσεις ενδοφλέβιας πενταμιδίνης (4 mg/kg/ημέρα) στην κλινική πράξη. Επιπλέον, η πενταμιδίνη ήταν πιο δραστική έναντι των στελεχών *Fusarium* σε ένα *in vitro* περιβάλλον με συνθήκες χαμηλής τάσης οξυγόνου ($P < 0.05$). Το συγκεκριμένο εύρημα είναι πιθανό να έχει κλινική σημασία καθώς ο υφομύκητας *Fusarium* έχει αγγειοτρόπες ιδιότητες με αποτέλεσμα να προκαλεί ιστικά έμφρακτα και χαμηλή ιστική αιμάτωση. Επιπρόσθετα, η πενταμιδίνη και η αμφοτερικίνη Β είχαν συνεργική αλληλεπίδραση έναντι της πλειοψηφίας των στελεχών *Fusarium* κυρίως με τη μέθοδο *checkrboard* αλλά και σε μικρότερο βαθμό και με τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing*. Στο *in vivo* τμήμα των πειραμάτων της διδακτορικής διατριβής, βρέθηκε ότι ο

ενδορινικός/αναπνευστικός ενοφθαλμισμός ποντικών *Balb-c* με ~ 70 x 10^5 κονίδια *Fusarium oxysporum* (35 μl από ένα διάλυμα με συγκέντρωση ίση με 2 x 10^8 κονιδίων/ml) οδήγησε σε οξεία νεκρωτική πνευμονία με θνητότητα 90 – 100% 96 ώρες μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης. Ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη είχαν πολύ καλύτερη επιβίωση 96 ώρες μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης (77%) σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία προφύλαξη (10%; P = 0.003) ή έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β (33%; P = 0.01). Επιπλέον, τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με πενταμιδίνη είχαν καλύτερη επιβίωση (33%) σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία θεραπεία (33%; P = 0.01). Το εύρος της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* στα ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με το αντίστοιχο εύρος διήθησης στα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία προφύλαξη τόσο με βάση τη χρήση *qPCR* όσο και με βάση την ιστοπαθολογική ανάλυση.

Συμπεράσματα

Η πενταμιδίνη είχε σημαντική *in vitro* δραστικότητα έναντι όλων των κλινικών στελεχών του υφομύκητα *Fusarium* που μελετήθηκαν στη παρούσα διδακτορική μελέτη και είχε συνεργική αλληλεπίδραση με την αμφοτερικίνη Β έναντι των περισσότερων κλινικών στελεχών *Fusarium*. Επιπλέον, η πενταμιδίνη, τόσο ως προφύλαξη όσο και ως θεραπεία, είχε σημαντική *in vivo* δραστικότητα σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού *Balb-c* με οξεία διηθητική πνευμονική φουσαρίωση. Τα επιστημονικά αύτα ευρήματα υποστηρίζουν την ανάγκη διενέργειας κλινικών μελετών για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της χρήσης πενταμιδίνης σε περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης σε ασθενείς με τη θανατηφόρο αυτή λοίμωξη.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ENGLISH SUMMARY)

Background

Fusariosis is an opportunistic mycosis that has emerged as a significant cause of morbidity and mortality in immunosuppressed patients with hematological malignancies and recipients of bone marrow transplantation. Currently used antifungal agents have limited activity against *Fusarium* species accounting for the exceedingly high mortality of this mycosis.

Methods

In the present work, we first investigated the *in vitro* activities of pentamidine (PNT) against 10 clinical isolates of *Fusarium* species (five *Fusarium solani* isolates and five non-*Fusarium solani* isolates) by using the NCCLS microdilution method in three different media (RPMI, RPMI-2, YNB), disk diffusion susceptibility testing, and viability dye staining. We also tested the *in vitro* interaction of PNT and amphotericin B (AMB), the current mainstay of treatment of fusariosis in clinical practice. We then investigated the *in vivo* activity of PNT, as prophylaxis or early treatment in a murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. *Balb-c* mice were rendered neutropenic by intraperitoneal (IP) cyclophosphamide and 96 hours later were infected intranasally with conidia of a *Fusarium oxysporum* isolate, followed by IP cyclophosphamide 24 hours post-infection. Groups of 10 mice each were given: (1) PNT prophylaxis (8.5 mg/kg/day intravenously [IV] starting 24 hours prior to infection), or (2) PNT treatment (8.5 mg/kg/day IV starting 6 hours post-infection), or (3) AMB prophylaxis (1.5 mg/kg/day IP starting 24 hours prior to infection), or (4) IV saline (control). Survival was assessed until 96 hours post-infection when surviving mice were euthanized. Lungs from euthanized mice were harvested for quantification of tissue fungal burden by qPCR and histopathology analysis.

Results

PNT had significant *in vitro* activities against all 10 *Fusarium* isolates. Non-*Fusarium solani* isolates were more susceptible than *Fusarium solani* isolates ($P < 0.05$). Additionally, PNT

was fungicidal against all non-*Fusarium solani* isolates, whereas it had fungistatic effects against four of the five *Fusarium solani* isolates. PNT also exhibited greater activity against conidial than against hyphal developmental program of growth of the fungus. This fungicidal activity against non-*Fusarium solani* isolates was confirmed microscopically after staining of PNT-treated *Fusarium oxysporum* hyphae with the fluorescent viability dyes 5,(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC). The MICs at which 50% of the isolates were inhibited (MIC_{50}: 2 μg/ml for non-*F. solani* isolates and 4 μg/ml for *Fusarium solani* isolates) and the minimum fungicidal concentration at which 50% of the isolates were killed (MFC_{50}: 8 μg/ml for non-*Fusarium solani* isolates) were much lower than the PNT tissue concentrations previously reported in humans using conventional daily intravenous PNT dosing (4 mg/Kg/day). In addition, PNT was more active against *Fusarium* isolates in a hypoxic environment of *in vitro* growth ($P < 0.05$). This finding may be clinically significant, because *Fusarium*, an angiotropic mold, causes tissue infarcts with resultant low tissue perfusion. Also, PNT and AMB were synergistic against the majority of tested *Fusarium* isolates, mainly by using the checkerboard method but also, to a lesser extent by using the disk diffusion susceptibility testing method. In the *in vivo* part of this work, it was found that intranasal inoculation of mice with ~ 70 x 10^5 conidia of a *Fusarium oxysporum* clinical isolate (35 μl from a 2 x 10^8 conidia/ml solution) resulted in an acute necrotizing pneumonia with reproducible mortality of 90 – 100% 96 hours post-infection. Mice given PNT prophylaxis had significant better survival 96 hours post-infection (77%) compared to control mice (10%; $P = 0.003$) or mice given AMB prophylaxis (33%; $P = 0.01$). PNT-treated mice had better survival (30%) than untreated controls (10%; $P = 0.01$). The tissue fungal burden of mice given PNT prophylaxis was significantly lower compared to control mice or mice given AMB prophylaxis by both histopathology and qPCR analysis.

Conclusions

PNT had significant *in vitro* activity against all tested *Fusarium* clinical isolates and had synergistic effects with AMB against the majority of the tested isolates. In addition, PNT given as prophylaxis or early treatment had substantial *in vivo* activity in a neutropenic

murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. These findings suggest that clinical studies are warranted to explore the potential of PNT in the management of human invasive fusariosis.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τελευταία χρόνια έχουν παρατηρηθεί ορισμένες μεταβολές στο φάσμα των ευκαιριακών λοιμώξεων που πλήττουν ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες και μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ή μυελού των οστών (1–7). Συγκεκριμένα, μεταξύ άλλων, έχει καταγραφεί μια σταθερή αύξηση της επίπτωσης ευκαιριακών λοιμώξεων από υφομύκητες όπως είναι οι *Aspergillus, Zygomycetes, Fusarium* και *Scedosporium* (1–7). Μεταξύ αυτών των μυκητιασικών λοιμώξεων η διηθητική ασπεργίλλωση, η οποία προκαλείται από τον υφομύκητα *Aspergillus,* είναι μακράν η πιο συχνή (1, 5, 6). Όμως, σε αρκετά τριτοβάθμια αντικαρκινικά κέντρα ανά τον κόσμο η διηθητική φουσαρίωση, η οποία προκαλείται από τον υφομύκητα *Fusarium,* έχει αναδειχθεί ως η δεύτερη συχνότερη αιτία διηθητικών μυκητιασικών λοιμώξεων από υφομύκητες σε αυτές τις ομάδες ασθενών (8–24).

Η συγκεκριμένη ευκαιριακή μυκητιασική λοίμωξη έχει υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα (8–24). Τα χρησιμοποιούμενα αντιμυκητιασικά φάρμακα συμπεριλαμβανομένου της αμφοτερικίνης Β και των τριαζολών έχουν μικρή δραστικότητα σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση με αποτέλεσμα η θνητότητα της λοίμωξης αυτής να ξεπερνά το 70 – 80% παρά τη χρήση αντιμυκητιασικής θεραπείας (8, 10–13). Μάλιστα, πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση είναι η έγκαιρη αποκατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος και των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, πολύ περισσότερο και από την ίδια τη χορήγηση αντιμυκητιασικής αγωγής (25, 26).

Το θέμα που πραγματεύεται η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι η δραστικότητα της πενταμιδίνης, ενός αντιβιοτικού φαρμάκου με ευρέως-φάσματος δραστικότητα έναντι πολλών μικροοργανισμών (27), έναντι του υφομυκητα *Fusarium* τόσο *in vitro* στο εργαστήριο με βάση διάφορες μικροβιολογικές τεχνικές όσο και *in vivo* σε ένα ουδετεροπενικό πειραματικό μοντέλο ποντικού με οξεία διηθητική πνευμονική φουσαρίωση. Η πενταμιδίνη έχει στο παρελθόν δειχθεί ότι έχει σημαντική *in vitro* δραστικότητα έναντι αρκετών μυκητιασικών μικροοργανισμών, τόσο υφομυκήτων όσο και ζυμομυκήτων, και αποτελεί μια από τις θεραπείες εκλογής για την προφύλαξη και την αντιμετώπιση της πνευμονίας από *Pneumocystis jiroveci* (μέχρι πρόσφατα ονομαζόμενο *Pneumocystis carinii*) ενός

μικροοργανισμού που πρόσφατα ταξινομήθηκε στο βασίλειο των μυκήτων (27). Επίσης, στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάζεται η *in vitro* αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β, καθώς η τελευταία αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπευτικής αντιμετώπισης της διηθητικής φουσαρίωσης στην κλινική πρακτική σήμερα (8, 10–13).

Στο Γενικό Μέρος που ακολουθεί καταγράφεται μια σύνοψη της πιο πρόσφατης επιστημονικής γνώσης αναφορικά με την επιδημιολογία, την παθογένεση, τις κλινικές εκδηλώσεις, τις διαγνωστικές μεθόδους και τις θεραπευτικές πρακτικές που χρησιμοποιούνται για τη διηθητική φουσαρίωση σήμερα. Στο Ειδικό Μέρος περιγράφονται οι πειραματικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων της διατριβής, τα αποτελέσματα της μελέτης καθώς επίσης και η συζήτηση των συμπερασμάτων τους. Ακολουθεί η καταγραφή της υπάρχουσας σχετικής βιβλιογραφίας.

Η παρούσα διδακτορική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μυκητολογίας (*Molecular Mycology Laboratory*) του κ. Δημητρίου Π. Κοντογιάννη στο *Department of Infectious Diseases, Infection Control* & *Employee Health* του *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* στο *Houston* του *Texas* των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής σε συνεργασία με το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την πολύτιμη εποπτεία και καθοδήγηση των Καθηγητών Παθολογίας και Λοιμωξιολογίας Δημητρίου Π. Κοντογιάννη και Γεώργιου Σαμώνη.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΗΣ ΦΟΥΣΑΡΙΩΣΗΣ

Ο υφομύκητας (*filamentous mold*) *Fusarium* είναι από πολύ παλιά γνωστό ότι αποτελεί σαπρόφυτο του εδάφους και παθογόνο μικροοργανισμό των φυτών (*Εικόνα 1*) και των προκαρυωτικών μικροβίων όπως η ψευδομονάδα (*Pseudomonas aeruginosa*) (9). Εκτός από το έδαφος και τα φυτά, ο υφομύκητας *Fusarium* είναι διενεμημένος στη φύση σε κάθε μορφή οργανικής ύλης. Είναι παρόν τόσο σε τροπικά και εύκρατα κλίματα, όσο και σε ερήμους και αρκτικές περιοχές με ακραίες κλιματικές συνθήκες (9). Πολλά από τα είδη του γένους *Fusarium* βρίσκονται εν αφθονία σε καλλιεργημένα εδάφη αλλά όχι σε δασικά εδάφη. Η διάχυτη αυτή διασπορά του υφομύκητα *Fusarium* οφείλεται πιθανότατα τόσο στην ικανότητα του να αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων όσο και στους αποδοτικούς μηχανισμούς διασποράς του (8, 9).

Εικόνα 1. Χαρακτηριστικές εικόνες από νόσους των φυτών από τον υφομύκητα *Fusarium* (π.χ., *Fusarium ear rot, Fusarium wilt*)

Ανάμεσα στα περισσότερα από 50 είδη του γένους *Fusarium*, μόνο τα παρακάτω έχουν περιγραφεί ως παθογόνα (*pathogenic*) σε ανθρώπους: *Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Fusarium verticilloides, Fusarium dimerum, Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum, Fusarium chlamidosporum, Fusarium nygamai, Fusarium napiforme, Fusarium semitectum, Fusarium*

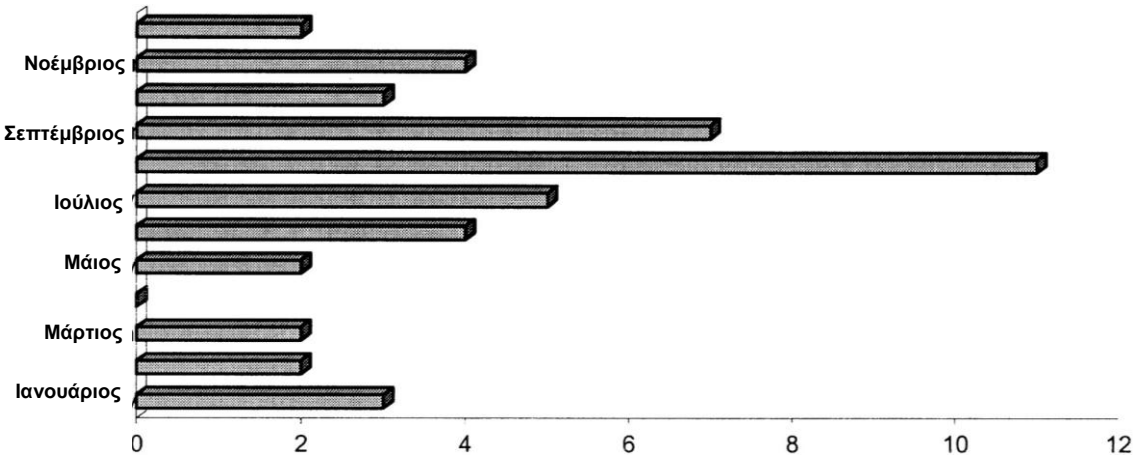
anthophilum, Fusarium lichenicola και *Fusarium equiseti* (8–13, 18–21). Ανάμεσα στα ανωτέρω είδη, το είδος *Fusarium solani* είναι υπεύθυνο για περίπου 50% των περιπτώσεων διηθητικής φουσαρίωσης (*invasive fusariosis*) που έχουν περιγραφεί σε ανθρώπους, ενώ ακολουθούν κατά σειρά τα είδη *Fusarium oxysporum* (14%), *Fusarium verticilloides* (11%) και *Fusarium moniliforme* (10%) (8–10). Αυτή η ανισομερής κατανομή των ειδών *Fusarium* στις περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης σε ανθρώπους σχετίζεται πιθανότατα με τη μεγαλύτερη λοιμογόνο ικανότητα (*virulence*) του είδους *Fusarium solani* όπως έχει δειχθεί σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με διηθητική διασπαρμένη φουσαρίωση σε σχέση με τα είδη *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* και *Fusarium verticilloides* (28).

Η επίπτωση (*incidence*) και ο επιπολασμός (*prevalence*) της φουσαρίωσης στους ανθρώπους δεν είναι απολύτως γνωστή, καθώς δεν έχει υπάρξει συστηματική και ακριβής καταγραφή των κλινικών περιπτώσεων διηθητικής φουσαρίωσης. Από το 1973, όταν η πρώτη κλινική περίπτωση διασπαρμένης φουσαρίωσης περιγράφηκε από τους *Cho* και συνεργάτες σε ένα παιδί με οξεία λευχαιμία (29), οι βιβλιογραφικές αναφορές περιπτώσεων φουσαρίωσης έχουν αυξηθεί κατακόρυφα. Πράγματι, αυτή τη στιγμή, η διηθητική φουσαρίωση αποτελεί σε αρκετά τριτοβάθμια αντικαρκινικά κέντρα τη δεύτερη πιο συχνή αιτία διηθητικής λοίμωξης από υφομύκητες σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, δεύτερη πίσω μόνο από την πολύ πιο συχνή διηθητική ασπεργίλλωση (*invasive aspergillosis*) (1–5, 10–14, 18–24).

Φαίνεται ότι υπάρχει μια μοναδική εποχιακή (*seasonal*) και γεωγραφική (*geographic*) διασπορά της διηθητικής φουσαρίωσης (9, 10). Συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των περιπτώσεων διηθητικής φουσαρίωσης έχει περιγραφεί κατά τη διάρκεια των βροχερών καλοκαιρινών μηνών όταν η διασπορά των κονιδίων (*conidia*) του υφομύκητα *Fusarium* στον αέρα είναι ιδιαίτερα αυξημένη (*Εικόνα 2*) (9, 10, 30). Επιπρόσθετα, η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων φουσαρίωσης έχει περιγραφεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (50 – 85% των περιπτώσεων) (9). Παρόλα αυτά, δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο αυτό αποτελεί ένδειξη μιας ξεχωριστής οικολογικής δεξαμενής (*niche*) για το συγκεκριμένο υφομύκητα ή αν αυτό είναι απλά αποτέλεσμα συστηματικότερης διάγνωσης και καταγραφής της συγκεκριμένης λοίμωξης στη χώρα αυτή ("*reporting bias*"). Ακόμα και μέσα στις ΗΠΑ, η επιδημιολογική διασπορά της φουσαρίωσης είναι ετερογενής, καθώς οι περισσότερες περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης έχουν περιγραφεί σε συγκεκριμένα

ογκολογικά κέντρα, όπως είναι το *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* στο Χιούστον της πολιτείας του Τέξας (9, 10). Εκτός των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, οι περισσότερες περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης έχουν περιγραφεί στην περιοχή της Μεσογείου (Ιταλία, Γαλλία) και σε τροπικές χώρες όπως η Βραζιλία (*Εικόνα 3*) (12, 14, 16, 20, 22, 24).

Εικόνα 2. Εποχιακή κατανομή 43 περιπτώσεων διηθητικής φουσαρίωσης από το *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* όπως έχουν δημοσιευθεί από τους *Boutati* & *Anaissie* [10]. Απεικονίζεται η μεγαλύτερη κατανομή κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών (οι αριθμοί στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύουν τις περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης που παρατηρήθηκαν σε κάθε μήνα του έτους).



Το δέρμα (*skin*) και η αναπνευστική οδός (*respiratory tract*) των ασθενών είναι οι κυρίαρχες πύλες εισόδου (*entry sites*) για τις λοιμώξεις από τον υφομύκητα *Fusarium* (8, 9). Για παράδειγμα, η χρήση κεντρικών φλεβικών καθετήρων (*central venous catheters; CVC*) (31, 32) και καθετήρων συνεχούς περιτοναϊκής αιμοκάθαρσης (*continuous ambulatory peritoneal dialysis; CAPD*) (33, 34) έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διηθητικής φουσαρίωσης. Επιπλέον, ασθενείς με εκτεταμένα εγκαύματα (*burns*) είναι σε αυξημένο κίνδυνο αποικισμού (*colonization*) από τον υφομύκητα *Fusarium* και είναι δυνατόν να αναπτύξουν διηθητική λοίμωξη αρχικά των μαλακών μορίων και εν συνεχεία διασπαρμένη φουσαρίωση (35–37). Εντοπισμένες λοιμώξεις στο δέρμα (38) ή τα νύχια με τη μορφή παρωνυχίας (*paronychia*) ή ονυχομύκωσης (*onychomycosis*) (39) μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε διασπορά του υφομύκητα *Fusarium* όταν ο ασθενής καταστεί ουδετεροπενικός κατά τη διάρκεια χορήγησης χημειοθεραπευτικής αγωγής (*Εικόνα 4*). Μάλιστα, ο υφομύκητας *Fusarium* αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες ονυχομύκωσης

καθώς είναι υπεύθυνος για περίπου 9 – 44% των κλινικών περιπτώσεων ονυχομύκωσης αν εξαιρεθούν αυτές οι οποίες είναι προκαλούμενες από δερματόφυτα (*dermatophytes*) (40–43). Η κυρίαρχη πύλη εισόδου, εκτός διαμέσου του δέρματος, για την εμφάνιση διηθητικής φουσαρίωσης είναι το αναπνευστικό σύστημα μέσω της εισπνοής κονιδίων (σπορίων) του υφομύκητα *Fusarium* από το περιβάλλον (8, 9). Πιο σπάνια, οι παραρρίνιοι κόλποι (*paranasal sinuses*) ή ο γαστρεντερικός σωλήνας (*gastrointestinal tract*) έχουν αναφερθεί ως πύλες εισόδου σε διάφορες κλινικές περιπτώσεις φουσαρίωσης (8, 9). Αναφορικά με το γαστρεντερικό σωλήνα, σε μια μελέτη 27 υγιών ενηλίκων, σε 17% από αυτούς ο υφομύκητας *Fusarium* ήταν φυσιολογικός αποικιστής της στοματικής κοιλότητας και του οροφάρυγγα (44).

Εικόνα 3. Χώρες στις οποίες έχουν περιγραφεί κλινικές περιπτώσεις φουσαρίωσης. Στο χάρτη με μαύρο χρώμα απεικονίζοναι ο Καναδάς, οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, το Μεξικό, η Παραγουάη, η Ισπανία, η Γαλλία, η Μεγάλη Βρετανία, η Δανία, η Ελβετία, η Γερμανία, η Ιταλία, η Γκαμπόν, η Σαουδική Αραβία, το Ισραήλ, το Νεπάλ, η Ινδία, η Σρι Λάνκα, το Μπαγκλαντές, η Αυστραλία και η Ιαπωνία.
Το γράφημα προέρχεται από τη δημοσίευση των *Nelson* και συνεργατών [9]

Επειδή οι κυριότερες πύλες εισόδου για τις λοιμώξεις από τον υφομύκητα *Fusarium* είναι η αναπνευστική οδός και το δέρμα, η πλειοψηφία των περιπτώσεων διηθητικής φουσαρίωσης θεωρείται ότι έχει προέλευση την κοινότητα (9). Όμως, όπως συμβαίνει και με τη διηθητική ασπεργίλλωση, η περίοδος επώασης (*incubation period*) της λοίμωξης και η ελάχιστη απαιτούμενη έκθεση σε κονίδια *Fusarium* ώστε να προκληθεί διηθητική λοίμωξη

δεν είναι γνωστά με ακρίβεια. Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να γίνει διαχωρισμός μεταξύ λοιμώξεων προερχόμενων από την κοινότητα (*community-acquired*) και νοσοκομειακών (*nosocomial*) λοιμώξεων. Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες λοιμώξεις από τον υφομύκητα *Fusarium* είναι προερχόμενες από την κοινότητα, νοσοκομειακές λοιμώξεις έχουν επίσης αναφερθεί και τεκμηριωθεί, όπως είναι περιπτώσεις μετεγχειρητικής κερατίτιδας (*keratitis*) (45), ενδοφθαλμίτιδας (*endopthalmitis*) (46, 47) και οστεομυελίτιδας (*osteomyelitis*) (48, 49).

Το σύστημα ύδρευσης των νοσοκομείων έχει επίσης ενοχοποιηθεί ως πιθανή εστία πρόκλησης και διασποράς νοσοκομειακής λοίμωξης από τον υφομύκητα *Fusarium* (όπως και από άλλους υφομύκητες όπως ο *Aspergillus*) σε διάφορες μελέτες (50–53). Όμως, μια άλλη πιο πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη από το *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* δεν επιβεβαίωσε αυτή την αρχική υπόθεση (54). Ως εκ τούτου, περισσότερες μελέτες χρειάζονται για να ξεκαθαρίσει αυτή η αντίθεση στα επιδημιολογικά συμπεράσματα των παραπάνω μελετών.

Εικόνα 4. Εικόνες ονυχομύκωσης και παρωνυχίας από τον υφομύκητα *Fusarium* σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με λευχαιμία

2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΗΣ ΦΟΥΣΑΡΙΩΣΗΣ: ΟΜΑΔΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΕ ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΚΙΝΔΥΝΟ

2α. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΞΕΝΙΣΤΗ

α1. Κορτικοστεροειδή

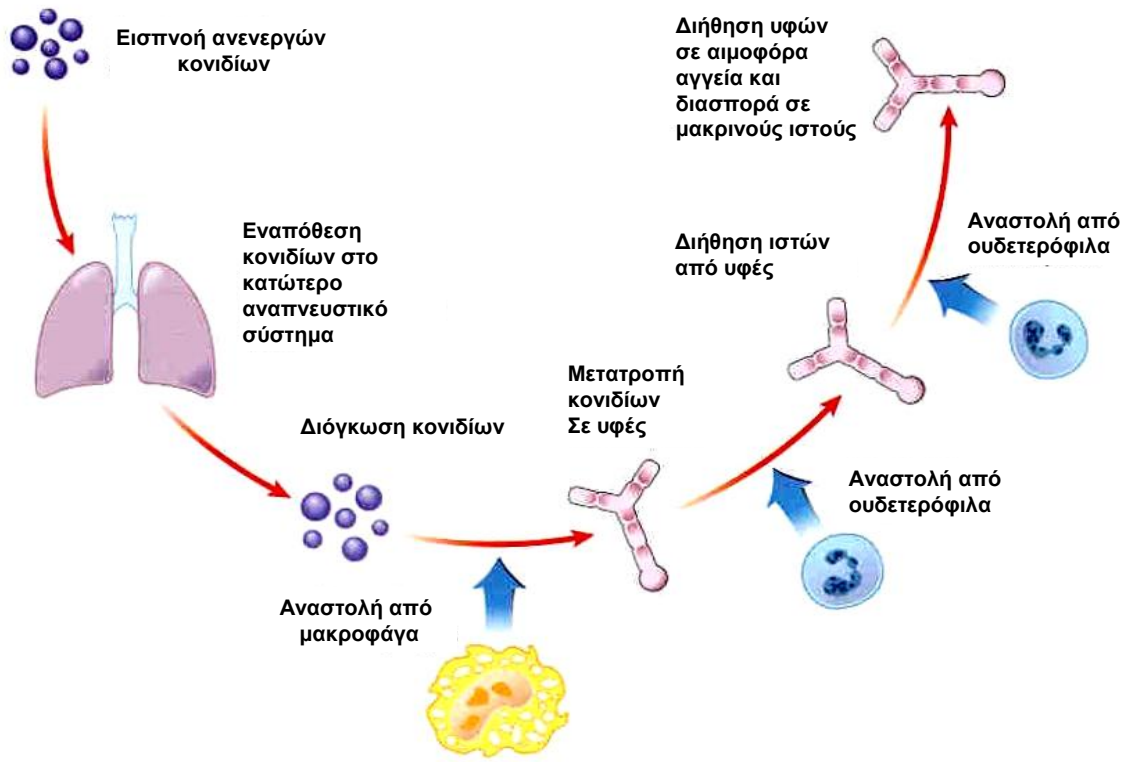
Υπάρχουν δύο μορφές ανάπτυξης του υφομύκητα *Fusarium* όπως συμβαίνει και στους άλλους υφομύκητες: τα κονίδια (*conidia*) ή σπόρια (*spores*) και οι υφές (*hyphae*) (9). Σε ανθρώπους με ακέραιο ανοσοποιητικό σύστημα υπάρχουν δύο βασικές μορφές άμυνας έναντι των εισπνεόμενων από το περιβάλλον κονιδίων *Fusarium* (55). Αρχικά, τα μόνιμα μακροφάγα κύτταρα των πνευμόνων (*resident lung macrophages*) συμμετέχουν στη φαγοκυττάρωση (*phagocytosis*) και εν συνεχεία στην καταστροφή των κονιδίων κυρίως μέσω μη-οξειδωτικών μηχανισμών (*Εικόνα 5*) (55). Παρά τη μεγάλη αποτελεσματικότητα αυτής της φαγοκυτταρικής διαδικασίας [είναι αξιοσημείωτη η ικανότητα των μακροφάγων κυττάρων να καταστρέφουν μέχρι και 10^8 κονίδια/ημέρα (56)], μερικά κονίδια διαφεύγουν της φαγοκυττάρωσης, μετατρέπονται σε υφές και εγκαθιστούν διηθητική λοίμωξη (9, 55).

Η χρήση κορτικοστεροειδών (*corticosteroids*) προδιαθέτει ασθενείς σε ανάπτυξη διηθητικής φουσαρίωσης κυρίως μέσω της διαταραχής της αντικονιδιακής φαγοκυτταρικής ικανότητας των μακροφάγων κυττάρων (57, 58). Η διαταραχή της έκκρισης κυττοκινών (*cytokines*) από τα CD_4 βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα (*T-helper lymphocytes*) εξαιτίας της χορήγησης κορτικοστεροειδών φαίνεται ότι επίσης παίζει σημαντικό ρόλο (58, 59). Συγκεκριμένα, τα κορτικοστεροειδή προκαλούν μια στροφή της έκκρισης κυτταροκινών προς την κατεύθυνση της επικράτησης των *Th2* κυτταροκινών [ιντερλευκίνη 4 (*interleukin 4; IL-4*), ιντερλευκίνη 5 (*interleukin 5; IL-5*) και ιντελευκίνη 10 (*interleukin 10; IL-10*)] έναντι των *Th1* κυτταροκινών [ιντερλευκίνη 2 (*interleukin 2; IL-2*), ιντερλευκίνη 12 (*interleukin 12; IL-12*), ιντερφερόνη γ (*interferon gamma; IFN-γ*) και *tumor necrosis factor α* (*TNF-α*)] η οποία είναι γνωστό ότι σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση στις διηθητικές μυκητιασικές λοιμώξεις (60). Συγκεκριμένα, μια πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη έδειξε ότι η θνητότητα ασθενών με αιματολογικές νεοπλασίες και φουσαρίωση ήταν 70% σε όσους είχαν προηγουμένως λάβει κορτικοστεροειδή εν αντιθέσει με 33% σε όσους δεν είχαν λάβει (26).

α2. Ουδετεροπενία

Όταν η διηθητική λοίμωξη εγκατασταθεί, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα (*polymorphonuclear leukocytes/neutrophils*) προσελκύονται χημειοτακτικά από της υφές του υφομύκητα *Fusarium* πάνω στις οποίες απαγκιστρώνονται (55). Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα οι υφές να καταστρέφονται από τους οξειδωτικούς κυτταροτοξικούς μηχανισμούς των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων (*Εικόνα 5*) (55). Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα πιθανότατα διαδραματίζουν τον πιο καθοριστικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι του υφομύκητα *Fusarium*. Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η πρόγνωση ασθενών με διηθητική φουσαρίωση είναι άμεση συνάρτηση της έγκαιρης αποκατάστασης των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων σε φυσιολογικά επίπεδα σε ασθενείς με ουδετεροπενία (*neutropenia*) (25, 26).

Εικόνα 5. Οι δύο γραμμές άμυνας έναντι του υφομύκητα *Fusarium*: μακροφάγα κύτταρα και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα. Τα πρώτα αναχαιτίζουν τα κονίδια ενώ τα δεύτερα είναι υπεύθυνα για την αντιμετώπιση των υφών *Fusarium*.



Πράγματι, η θνητότητα ασθενών με φουσαρίωση είναι κυριολεκτικά 100% εφόσον υπάρχει παρατεταμένη και βαριά ουδετεροπενία (ακόμα και παρά τη χρησιμοποίηση επιθετικής συστηματικής αντιμυκητιασικής θεραπείας), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό έχει αναφερθεί να είναι περίπου 30% εφόσον τα ουδετερόφιλα είναι φυσιολογικά σε αριθμό ή

αν η διάρκεια της ουδετεροπενίας δεν είναι παρατεταμένη (25, 26). Επιπρόσθετα, γεγονός που καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων στον έλεγχο των λοιμώξεων από τον υφομύκητα *Fusarium* είναι ότι δεν είναι σπάνια η εμφάνιση υποτροπών (*relapses*) διηθητικής φουσαρίωσης σε περιόδους μετέπειτα ανοσοκαταστολής με παρατεταμένη ουδετεροπενία (9). Πέρα όμως από την ύπαρξη βαριάς και παρατεταμένης ουδετεροπενίας, φαίνεται ότι και άλλοι παράγοντες διαδραματίζουν ρόλο στην εμφάνιση της φουσαρίωσης σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς αφού άλλες ομάδες ασθενών με ποσοτικές ή ποιοτικές διαταραχές στη λειτουργία των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων όπως είναι ασθενείς με απλαστική αναιμία [*aplastic anemia* (61)] ή χρόνια κοκκιωματώδη νόσο [*chronic granulomatous disease* (62)]) έχουν πολύ χαμηλή επίπτωση της διηθητικής αυτής λοίμωξης.

α3. Άλλα χαρακτηριστικά ξενιστή

Σε μη ουδετεροπενικούς ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση άλλοι παράγοντες εκτός από τη χρήση κορτικοστεροειδών έχει δειχθεί ότι συσχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση και αυξημένη θνητότητα από τη λοίμωξη. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη νεφρικής ανεπάρκειας (*renal failure*), διασπαρμένης νόσου (*disseminated disease*), αιματολογικής νεοπλασίας (*hematological malignancy*) και εγκαυμάτων είχε ως αποτέλεσμα την κακή πρόγνωση της φουσαρίωσης σε μια ερευνητική μελέτη από το Ισραήλ (63).

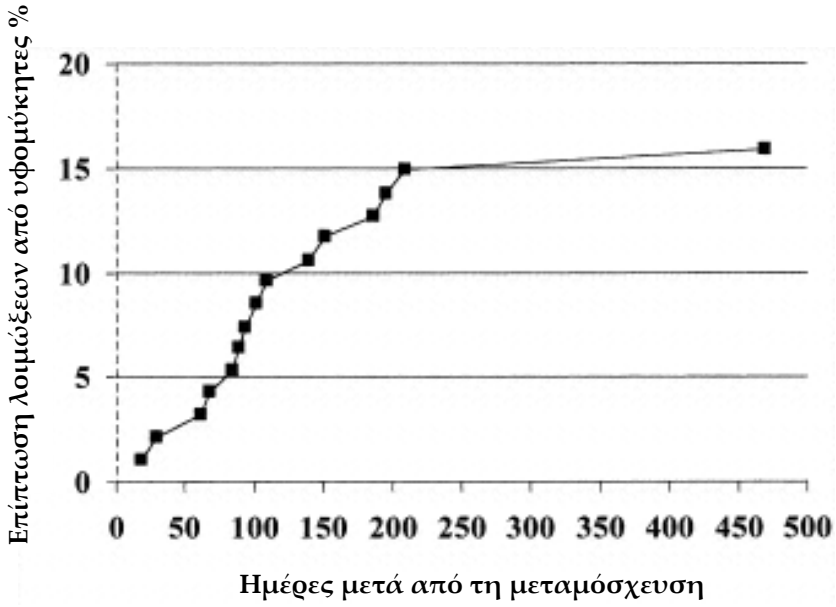
Περισσότερες από το 90% των περιπτώσεων διηθητικής φουσαρίωσης προκύπτουν σε ουδετεροπενικούς ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες, εκ των οποίων αυτοί με οξεία μυελογενή λευχαιμία (*AML*; *acute myelogenous leukemia*) και οξεία λεμφογενή λευχαιμία (*ALL*; *acute lymphocytic leukemia*) αποτελούν το 50% του πληθυσμού που αναπτύσσει αυτή τη λοίμωξη (8–10, 12, 13, 21). Σε μια μελέτη από την Ιταλία από τους *Girmenia* και συνεργάτες, η επίπτωση της διηθητικής φουσαρίωσης σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία ήταν 0.06% (12). Εκτός από ασθενείς με οξεία λευχαιμία, ασθενείς με άλλες αιματολογικές νεοπλασίες όπως λεμφώματα (*Hodgkin's* και *non-Hodgkin's lymphomas*) και χρόνιες λευχαιμίες όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (*CML*; *chronic myelogenous leukemia*) και η χρόνια λεμφογενής λευχαιμία (*CLL*; *chronic lymphocytic leukemia*) μπορούν να αναπτύξουν διηθητική φουσαρίωση.

Επίσης, οι αποδέκτες αλλογενούς μεταμόσχευσης του μυελού των οστών (*allogeneic bone marrow transplantation*) είναι σε ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν διηθητική φουσαρίωση (1, 8, 10, 13, 14, 19, 24, 64–67). Αυτό μπορεί να συμβεί είτε κατά την αρχική μετα-μεταμοσχευτική περίοδο εφόσον καθυστερήσει η αποκατάσταση του μυελού των οστών (*late engraftment*), είτε αργότερα στα πλαίσια ιατρογενούς υπερκορτιζολαιμίας (*hypercortisolism*) για τη θεραπεία οξείας ή χρόνιας αντίδρασης του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (*GvHD; graft-versus-host disease*) (64–67). Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια στροφή προς την εμφάνιση των περισσότερων διηθητικών λοιμώξεων από υφομύκητες (συμπεριλαμβανομένου και του *Fusarium*) μετά από τις πρώτες 100 μέρες από την διενέργεια της αλλογενούς μεταμόσχευσης του μυελού των οστών (*Εικόνα 6*) (64–67). Αυτό οφείλεται κυρίως στη σμίκρυνση της περιόδου αποκατάστασης του μυελού των οστών στην αρχική μετα-μεταμοσχευτική περίοδο και στη χρησιμοποίηση υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών για την πρόληψη ή θεραπεία της αντίδρασης του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (*GvHD*) (64–67). Σε μια μελέτη στο *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* σε διάστημα 10 ετών είχε υπολογιστεί ότι η επίπτωση της φουσαρίωσης σε 750 αποδέκτες αλλογενούς και 1537 αποδέκτες αυτόλογης (*autologous*) μεταμόσχευσης του μυελού των οστών ήταν 1.2% και 0.2% αντίστοιχα (10). Η επίπτωση αυτή είναι κατά πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη επίπτωση της διηθητικής ασπεργίλλωσης η οποία παρατηρείται σε περίπου 10 – 15% των αποδεκτών αλλογενούς μεταμόσχευσης του μυελού των οστών (1, 66, 67).

Η βαρύτητα της αντίδρασης του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (*GvHD*) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ευαισθησία των αποδεκτών μεταμόσχευσης του μυελού των οστών για την εμφάνιση φουσαρίωσης. Έτσι, ασθενείς με αντίδραση του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή βαθμού 3 ή 4 (*grade III-IV*) έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να αναπτύξουν διηθητική φουσαρίωση σε σχέση με ασθενείς με αντίδραση του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή βαθμού 1 ή 2 (*grade I-II*) (64–67). Αξιοσημείωτο πάντως είναι το γεγονός ότι προηγούμενη λοίμωξη από *Fusarium* δεν αποτελεί απόλυτη αντένδειξη για την μετέπειτα διενέργεια αλλογενούς μεταμόσχευσης του μυελού των οστών εφόσον υπάρχει αντικειμενική ένδειξη ότι η αρχική λοίμωξη είχε ανταποκριθεί στην έναρξη κατάλληλης αντιμυκητιασικής θεραπείας (8–10).

Η έκφραση και κλινική εκδήλωση της φουσαρίωσης ποικίλλει ανάλογα με την υποκείμενη νόσο του ασθενή. Ως εκ τούτου, η διηθητική φουσαρίωση σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων (*solid organ transplantation*) τείνει να είναι εντοπισμένη, να αναπτύσσεται αργά κατά τη μετα-μεταμοσχευτική περίοδο (> 9 μήνες μετά τη μεταμόσχευση) και έχει κατά κανόνα καλύτερη πρόγνωση από τη διηθητική φουσαρίωση που αναπτύσσεται σε αποδέκτες αλλογενούς μεταμόσχευσης του μυελού των οστών με αντίδραση του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (*GvHD*) η οποία είναι σχεδόν πάντα διασπαρμένη και θανατηφόρα (68, 69). Από την άλλη πλευρά, ασθενείς με απλαστική αναιμία (61, 70–72) και χρόνια κοκκιωματώδη νόσο (62, 73) όπως αναφέρθηκε παραπάνω όπως επίσης και ασθενείς με το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (*acquired immunodeficiency syndrome; AIDS*) (74, 75) πολύ σπάνια αναπτύσσουν διηθητική φουσαρίωση.

Εικόνα 6. Συνολική επίπτωση διηθητικών λοιμώξεων από υφομύκητες συμπεριλαμβανομένου του υφομύκητα *Fusarium* μετά από αλλογενή μεταμόσχευση του μυελού των οστών. Η εικόνα είναι τροποποιημένη από τη δημοσίευση των *Baddley* και συνεργατών [64]



2β. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΥΦΟΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM*

β1. Παραγωγή τοξινών

Εκτός από τις διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος που προδιαθέτουν τους ασθενείς σε ανάπτυξη διηθητικής φουσαρίωσης, η παθογένεση αυτής της ευκαιριακής λοίμωξης πιθανόν να σχετίζεται και με ορισμένα χαρακτηριστικά λοιμογόνου ικανότητας (*virulence*) του ίδιου του υφομύκητα *Fusarium*.

Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι ορισμένα στελέχη *Fusarium* παράγουν τοξίνες (*toxins*) οι οποίες έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσουν καταστολή του μυελού των οστών με επακόλουθη λευκοπενία και ουδετεροπενία, προκαλώντας κατά αυτό τον τρόπο ακόμα περισσότερο παρατεταμένη διάρκεια ανοσοκαταστολής από αυτή που προκαλείται από τη χορηγηθείσα χημειοθεραπεία αυτή καθεαυτή (76, 77). Ο *Πίνακας 1* καταγράφει όλες τις τοξίνες οι οποίες έχουν βρεθεί ότι παράγονται από τα διάφορα είδη *Fusarium* ενώ ο *Πίνακας 2* αναφέρει τις τοξίνες που έχει βρεθεί ότι προκαλούν κάποιας μορφής καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος.

Πίνακας 1. Σύνοψη τοξινών οι οποίες έχουν αναφερθεί ως παράγωγα διαφόρων ειδών *Fusarium*

Ακετοξυσιρπενόλη (*Acetoxyscirpenol*)	Ακετοξυσιρπεντριόλη (*Acetoxyscirpentriol*)
Ακετυλδεοξυνιβαλενόλη (*Acetyldeoxynivalenol*)	3-ακετυλ-νεοσολανιόλη (*3-Acetyl-neosolaniol*)
15-ακετυλ-νιβαλενόλη (*15-Acetyl-nivalenol*)	3-ακετυλ-HT-2 τοξίνη (*3-Acetyl-HT-2 toxin*)
Ακετυλ-T-2-τετραόλη (*Acetyl-T-2-tetraol*)	Ακουμινατοπυρόνη (*Acuminatopyrone*)
Ακετυλ-T-2 τοξίνη (*Acetyl-T-2 toxin*)	Αντιβιοτικό Υ (*Antibiotic Y*)
Αποτριχοθεκένες (*Apotrichothecenes*)	Βοβερικίνη (*Beauvericin*)
Βουτενολίδη (*Butenolide*)	Καλονεκτρίνη (*Calonectrin*)
Χλαμυδοσπορδιόλη (*Chlamydospordiol*)	Χλαμυδοσπορόλη (*Chlamydosporol*)
Κουλμορίνη (*Culmorin*)	Δεακυλκαλονεκτρίνη (*Deacylcalonectrin*)
Δεοξυφουσαπυρόνη (*Deoxyfusapyrone*)	Δεοξυνιβαλενόλη (Βομιτοξίνη) – *Deoxynivalenol (Vomitoxin)*
Διακετυλ-νιβαλενόλη (*Diacetyl-nivalenol*)	Διακετοξυσιρπενόλη (*Diacetoxyscirpenol*)
Διακετυλδεοξυνιβαλενόλη (*Diacetyldeoxynivalenol*)	Διϋδροξυκαλονεκτρίνη (*Dihydroxycalonectrin*)
Διπλοδιατοξίνη (*Diplodiatoxin*)	Εννιατίνες A & B (*Enniatins A & B*)
Επιαποτριχοθεκένες (*Epiapotrichothecenes*)	Εκιστεϊνη (*Equistein*)
Φουμονισίνη B (*Fumonisins B*)	Φουσαρικό οξύ (*Fusaric acid*)
Φουσαπρολιφερίνη (*Fusaproliferin*)	Φουσαρενόνη X (*Fusarenon X*)
Φουσαπυρόνη (*Fusapyrone*)	Φουσαρίνη (*Fusarin C*)
Φουσαροχρωμανόνη (*Fusarochromanon*)	JM47-κυκλικό τετραπεπτίδιο (*JM47-cyclic tetrapeptide*)
HT-2 τοξίνη (*HT-2 toxin*)	Υδροξυκουλμορίνες (*Hydroxy-culmorins*)
Υδροξυισοτριχοδερμίνες (*Hydroxyisotrichodermins*)	Ιπομεανίνη (*Ipomeanin*)
Ιπομεανόλη (*Ipomeanol*)	Ισοχλαμυδοσπορόλη (*Isohlamydosporol*)
Ισονεοσολανιόλη (*Iso-neosolaniol*)	Ισοτριχοδερμίνη (*Isotrichodermin*)
Ισοτριχοδερμόλη (*Isotrichodermol*)	Μονιλιφορμίνη (*Moniliformin*)
Μονοακετοξυσιρπενόλη (*Monoacetoxyscirpenol*)	Νεοσολανιόλη (*Neosolaniol*)
Νεκτριαφουρόνη (*Nectriafurone*)	Νιβαλενόλη (*Nivalenol*)
Σαμβουκινόλη (*Sambucinol*)	Σιρπεντριόλη (*Scirpentriol*)
Τριχοθεκένες A & B (*Trichothecenes A&B*)	T-2 τοξίνη (*T-2 toxin*)
T-2 τριόλη (*T-2 triol*)	T-2 τετραόλη (*T-2 tetraol*)
Ζεαραλενόνη (F-2 τοξίνη) - *Zearalenone (F-2 toxin)*	Βισολτρικίνη (*Visoltricin*)

Όμως, τα μοριακά συμβάντα που ελέγχουν και καθορίζουν την έκκριση αυτών των τοξινών δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς και περαιτέρω μελέτες χρειάζονται ώστε να διαπιστωθεί αν αυτές οι τοξίνες εκφράζονται αποκλειστικά κατά την εμφάνιση διηθητικής νόσου και όχι και σε περιπτώσεις απλού αποικισμού από τον υφομύκητα. Η παραγωγή τοξινών από υφομύκητες έχει αποτελέσει κατά το πρόσφατο παρελθόν αντικείμενο εκτεταμένης ερευνητικής μελέτης όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της παραγωγής γλιοτοξίνης (*gliotoxin*) από τον υφομύκητα *Aspergillus* (78–80).

Εκτός από τις ανωτέρω επιδράσεις των τοξινών *Fusarium* στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, μια πλειάδα νόσων και κλινικών συνδρόμων συμπεριλαμβανομένων αλλεργιών (81–84), νεοπλασιών [π.χ., καρκίνος του οισοφάγου (85–89)], γαστρεντερικών, νεφρικών [π.χ., πολυκυστική νόσος των νεφρών (90)] και ενδοκρινικών διαταραχών (91) έχουν συσχετιστεί με την παραγωγή τοξινών από τον υφομύκητα *Fusarium* οι οποίες συνοψίζονται στον *Πίνακα 3*.

Πίνακας 2. Τοξίνες παραγόμενες από τον υφομύκητα *Fusarium* και οι δράσεις τους στο ανοσοποιητικό σύστημα

Τοξίνη	Επίδραση	Βιβλιογραφική αναφορά
Τ-2 τοξίνη	↓ πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων	92
	↓ φαγοκυττάρωση από μακροφάγα	93
	↓ πρωτεϊνοσύνθεσης από μακροφάγα	93
	↑ ευαισθησία στη σαλμονέλλωση	94
	↑ ευαισθησία στην καντιντίαση	95
	↑ ευαισθησία στην κρυπτοκόκκωση	96
	↑ ευαισθησία στον απλό έρπητα	97
	↓ χημειοταξία των ουδετεροφίλων	98
Δεοξυνιβαλενόλη	Λεμφοπενία	99
	Μονοκυτταροπενία	99
	↓ ανοσοσφαιρινών A και M	99
	↓ τύπου IV υπερευαισθησία	100
	↓ παραγωγή ανοσοσφαιρινών σε λεμφοκυτταρικά αντιγόνα	100
Ζεαραλενόνη	↑ ευαισθησία στη λιστερίωση	100
Φουμονισίνη B1	↓ φαγοκυττάρωση από μακροφάγα	101

Ο Πίνακας προέρχεται από τη δημοσίευση των *Nelson* και συνεργατών [9]

Παρακάτω παρατίθενται λεπτομέρειες για τις τρεις πιο χαρακτηριστικές από αυτές τις νόσους (108–110).

1. Διατροφική τοξική αλευκία (*alimentary toxic aleukia - ATA*)

Η κατανάλωση σιτηρών μολυσμένων με *Fusarium sporotrichioides* είχε συσχετιστεί με επιδημίες αυτής της νόσου στην πρώην Σοβιετική Ένωση κατά τη διάρκεια του 2ου Παγκοσμίου Πολέμου. Η νόσος διακρίνεται σε τρία κλινικά στάδια. Εφόσον η διάγνωση γίνει νωρίς στο αρχικό πρώτο στάδιο ή κατά τη μετάβαση από το δεύτερο στο τρίτο στάδιο, η πρόγνωση της νόσου είναι συνήθως καλή. Αντίθετα, αν η διάγνωση γίνει αργότερα κατά το τρίτο στάδιο της νόσου, η κατάσταση της υγείας των προσβεβλημένων ασθενών είναι συνήθως κρίσιμη και η θνητότητα πολύ υψηλή (108).

Πίνακας 3. Ανθρώπινες νόσοι σχετιζόμενες με παραγωγή τοξινών από *Fusarium*

Νόσος	***Fusarium spp***	**Τοξίνη**	**Χώρα**	**Βιβλιογραφική αναφορά**
Διατροφική τοξική αλευκία (*ATA*)	*Fusarium sporotrichioides*	T-2	Σοβιετική Ένωση	102
Νόσος *Kashin-Beck*	*Fusarium poae*	Άγνωστη	Βόρεια Κορέα Κίνα	103
Νόσος *Akakabi-byo*	*Fusarium graminearum* *Fusarium sporotrichioides*	Νιβαλενόλη Δεόξυνιβαλενόλη	Ιαπωνία	103
Νόσος *Keshan*	*Fusarium moniliforme*	Μονιλιφορμίνη	Κίνα	104
Καρκίνος οισοφάγου ?	*Fusarium moniliforme*	Φουσονισίνη	Νότια Αφρική	105
Διαταραχή σεξουαλικής ανάπτυξης ?	*Fusarium spp*	Οιστρογονική μυκοτοξίνη	Πουέρτο Ρίκο	106
Γαστρεντερικές διαταραχές ?	*Fusarium spp*	Νιβαλενόλη, T-2 Δεόξυνιβαλενόλη	Ινδία	107

Ο Πίνακας προέρχεται από τη δημοσίευση των *Nelson* και συνεργατών [9]

Τα συμπτώματα του πρώτου σταδίου εμφανίζονται σύντομα μετά από τη βρώση μολυσμένων σιτηρών με κυρίαρχη την ύπαρξη παραισθησιών (*paresthesias*) γύρω από το στόμα, τη γλώσσα, το φάρυγγα, τις παρειές, τον οισοφάγο και το στόμαχο. Η φλεγμονή στο στόμαχο και το έντερο έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση εμέτου, κοιλιακού άλγους και διάρροιας. Άλλα συμπτώματα που μπορεί να παρουσιαστούν είναι ζάλη, πονοκέφαλος, αδυναμία, πυρετός, εφίδρωση και ταχυκαρδία. Το πρώτο αυτό στάδιο συνήθως διαρκεί 3 με 9 ημέρες (108).

Το δεύτερο στάδιο ονομάζεται λανθάνουσα περίοδος (*latent period*) επειδή ο ασθενής αισθάνεται καλά χωρίς εμφανή συμπτώματα. Οι ανωμαλίες του σταδίου αυτού έγκεινται στο αιμοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, προκαλείται προοδευτική λευκοπενία με ουδετεροπενία (και ως εκ τούτου αυξημένη ευαισθησία σε βακτηριακές λοιμώξεις) με σχετική λεμφοκυττάρωση. Παράλληλα, προκαλείται αναιμία και ελάττωση του αριθμού των αιμοπεταλίων. Η λανθάνουσα περίοδος διαρκεί συνήθως 3 με 4 βδομάδες αλλά μπορεί να διαρκέσει εώς και 8 βδομάδες (108).

Η πρώτη εκδήλωση του τρίτου σταδίου της νόσου είναι η εμφάνιση πετέχειων (*petechiae*) στον κορμό, τη μασχαλιαία και βουβωνική χώρα, το στήθος, και σε σοβαρότερες περιπτώσεις και στο πρόσωπο και το κεφάλι. Ακολουθεί νέκρωση στη φαρυγγική χώρα με αποτέλεσμα οδυνοφαγία και δυσφαγία. Η επιμόλυνση με βακτήρια είναι συνήθης σε αυτές τις νεκρωτικές περιοχές και εξαιτίας της ουδετεροπενίας μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο των ασθενών (108).

2. Νόσος *Kashin-Beck*

Η νόσος *Kashin-Beck* (ή αλλιώς "*Urov*") αποτελεί μια χρόνια μορφή δυστροφικής αρθροπάθειας που προσβάλλει τη σπονδυλική στήλη και τις περιφερικές αρθρώσεις και είναι ενδημική στην Βόρεια Κορέα, την Κίνα και τη Σιβηρία κατά μήκος του ποταμού *Urov* από όπου και προέρχεται το όνομα της (109). Η νόσος ξεκινά κατά τη διάρκεια της σχολικής ηλικίας χωρίς συμπτώματα. Στη συνέχεια, εξελίσσεται αργά και χρόνια με αρθραλγίες και φλεγμονώδεις αλλοιώσεις στις προσβαλλόμενες αρθρώσεις. Στα τελικά στάδια, αναπτύσσονται μυϊκή ατροφία και οστικές παραμορφώσεις. Εργαστηριακές μελέτες έχουν καταδείξει ότι ορισμένα στελέχη του υφομύκητα *Fusarium poae* είναι υπεύθυνα για την πρόκληση της νόσου αυτής, όμως η υποκείμενη τοξίνη δεν είναι γνωστή (109).

3. Νόσος *Akakabi-byo*

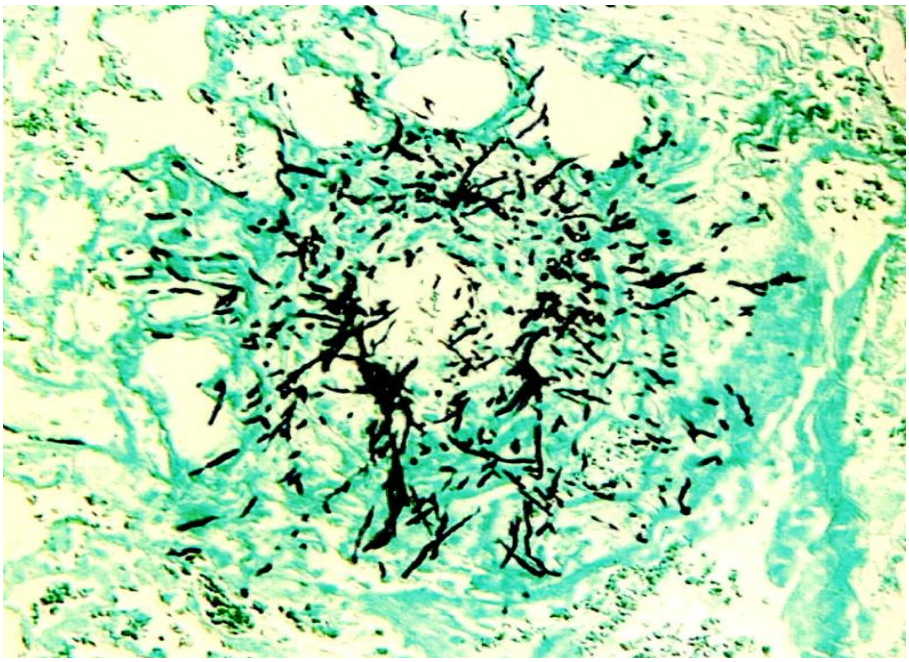
Η νόσος *Akakabi-byo* είναι ενδημική στην Ιαπωνία και προκαλείται από τοξίνες των ειδών *Fusarium sporotrichioides* και *Fusarium graminearum* (110). Χαρακτηρίζεται από ανορεξία, ναυτία, εμέτους, κοιλιακά άλγη, διάρροια, πονοκέφαλο και πυρετό (110).

β2. Παραγωγή κυκλοσπορίνης και αγγειοτρόπες ιδιότητες

Εκτός από την παραγωγή τοξινών, ορισμένα στελέχη *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum* παράγουν κυκλοσπορίνη (*cyclosporine*) η οποία είναι γνωστό ότι αναστέλλει την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων (*T-lymphocytes*) και την παραγωγή ιντερλευκίνης 2 (*interleukin-2; IL-2*), με αποτέλεσμα να αναστέλλει σημαντικές πτυχές της κυτταρικής άνοσης αντίδρασης η οποία είναι υπεύθυνη για την αναχαίτιση μυκητιασικών λοιμώξεων (111–113).

Επιπλέον, όπως και ο *Aspergillus*, έτσι και ο υφομύκητας *Fusarium* έχει την τάση να διηθεί αιμοφόρα αγγεία (*Εικόνα 7*) με αποτέλεσμα τη πρόκληση αιμορραγίας και επακόλουθης ιστικής υποάρδευσης και αιμορραγικής νέκρωσης (*Εικόνα 8*) (8, 9). Αν αυτή η ικανότητα του *Fusarium* να διηθεί αιμοφόρα αγγεία και ιστούς σχετίζεται με την παραγωγή κυκλοσπορίνης από στελέχη *Fusarium*, η οποία είναι γνωστό ότι προκαλεί τοξικές επιδράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι αντικείμενο που χρήζει περαιτέρω έρευνας (114).

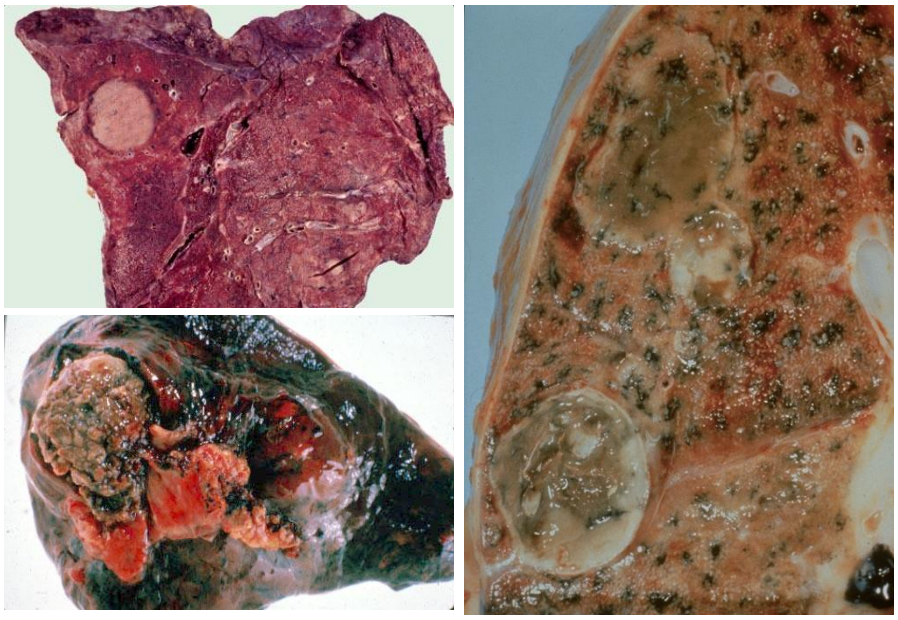
Εικόνα 7. Υφές *Fusarium* οι οποίες διηθούν ένα αιμοφόρο αγγείο στο πνευμονικό παρέγχυμα ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση [χρώση *Grocott-Gomori methenamine-silver nitrate* (*GMS*)]. Οι υφές διακρίνονται με μαύρο χρώμα καθώς εξορμούν από το αγγείο



β3. Προσκολλητικές ιδιότητες

Ένας άλλος παράγοντας που πιθανόν να συνεισφέρει στην παθογένεση της φουσαρίωσης είναι η ικανότητα του υφομύκητα *Fusarium* να προσκολλάται σε διάφορες επιφάνειες, όπως σε κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, καθετήρες συνεχούς περιτοναϊκής αιμοκάθαρσης και φακούς επαφής (*contact lens*) (8, 9). Όλα τα επιστημονικά δεδομένα αναφορικά με τις προσκολλητικές ιδιότητες (*adhesive properties*) του υφομύκητα *Fusarium* προέρχονται από μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με κερατίτιδα από *Fusarium* (115–118). Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι η ικανότητα του *Fusarium solani* να παράγει προτεάσες (*proteases*) και του *Fusarium moniliforme* να παράγει κολλαγενάσες (*collagenases*) με κερατολυτικές ιδιότητες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία ελκών στον κερατοειδή χιτώνα (115–118). Επιπλέον, η δημιουργία σχηματισμών υφών-υφών (*hyphae-to-hyphae structures*) με παχιά τοιχώματα έχει υποστηριχθεί ότι είναι πιθανόν να προστατεύει το μύκητα από την επίθεση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (115–118).

Εικόνα 8. Νεκρωτική αιμορραγική πνευμονία από *Fusarium* σε ασθενή με οξεία λευχαιμία. Απεικονίζονται οι περιοχές ιστικής νέκρωσης με την περιφερική αιμορραγική άλω

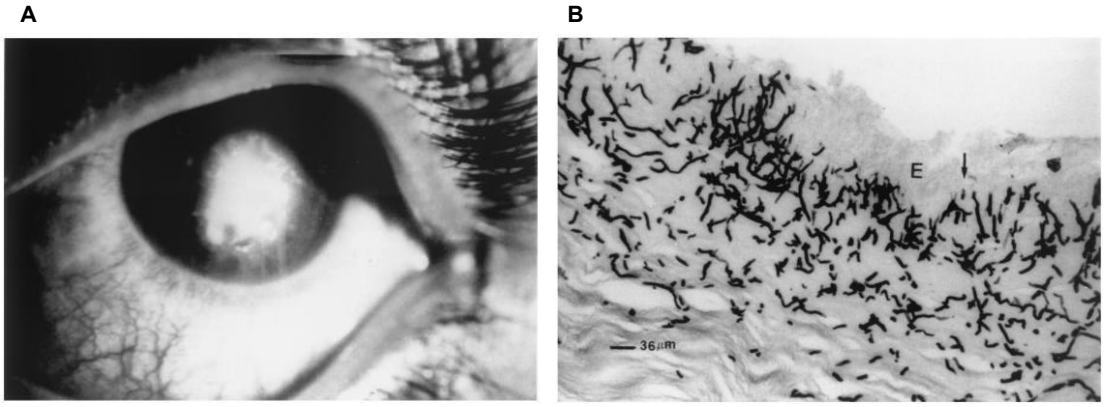


Παρακάτω παρατίθενται εν συντομία οι λοιμώξεις από τον υφομύκητα *Fusarium* που σχετίζονται με την ύπαρξη ξένων σωμάτων:

1. Κερατίτιδα σε χρήστες φακών επαφής

Ο υφομύκητας *Fusarium* είναι δυνατόν να αποτελεί φυσιολογικό αποικιστή του ανθρώπινου επιπεφυκότα (*conjuctiva*) (119) και συχνά μπορεί να μολύνει το υγρό των φακών επαφής και εν συνεχεία το φακό του οφθαλμού (120–123). Επίσης, μέσω παραγωγής υδρολυτικών ενζύμων (*hydrolases*), ο υφομύκητας μπορεί να διασπάσει τα υδροφιλικά πολυμερή του φακού και να διηθήσει εντός του φακού (*Εικόνα 9*) (124). Μυκητιασική κερατίτιδα (*keratitis*) μπορεί να παρουσιαστεί σε 4 με 27% των χρηστών φακών επαφής και ο υφομύκητας *Fusarium* είναι υπεύθυνος για πολλές από αυτές τις περιπτώσεις (120–124). Ο πιο συχνός προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη κερατίτιδας από *Fusarium* είναι η μη σωστή συντήρηση των φακών επαφής με αποτέλεσμα τη μόλυνση του υγρού των φακών (124). Η παρουσία πρότερης πάθησης του κερατοειδή χιτώνα όπως είναι ο έρπητας (*herpes*) και η χρήση τοπικών κολλύριων με κορτικοστεροειδή και αντιβιοτικά φάρμακα επίσης προδιαθέτει σε ανάπτυξη κερατίτιδας από *Fusarium* (125). Αντικατάσταση του φακού επαφής με κερατοπλαστική (*keratoplasty*) και τοπική αγωγή με ναταμυκίνη (*natamycin*) συνήθως αρκεί για την επιτυχή αντιμετώπιση της λοίμωξης (126).

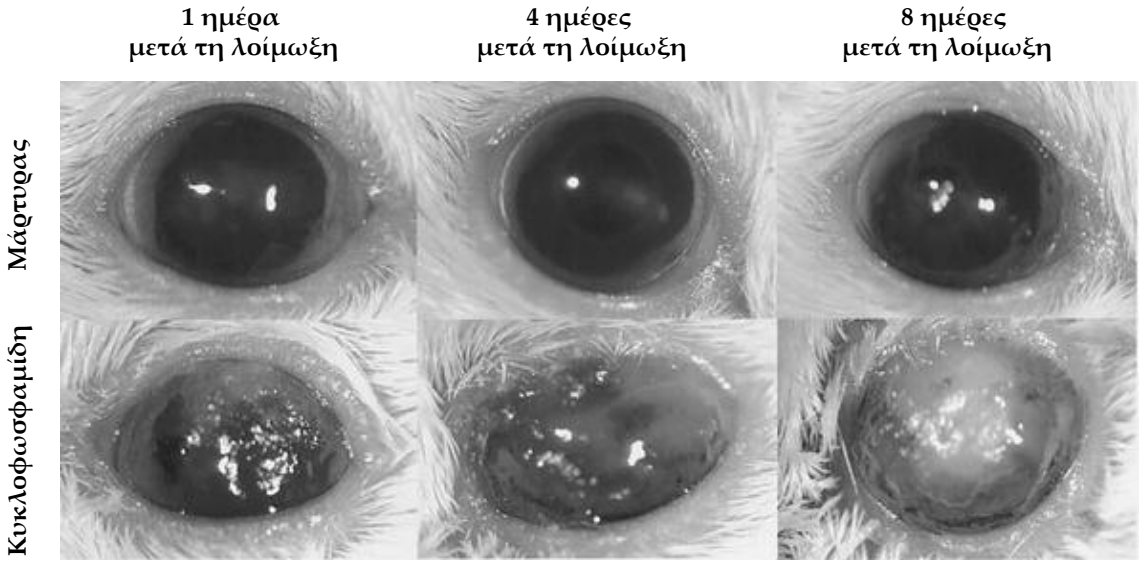
Εικόνα 9. Κερατίτιδα από *Fusarium solani* σε ασθενή με χρήση φακών επαφής. Απεικονίζονται οι υφές οι οποίες επεκτείνονται στον κερατοειδή (Α). Μετά από κερατοπλαστική φαίνονται μικροσκοπικά οι υφές κάτω από το επιθήλιο του κερατοειδούς στα επιφανειακά και μέσα επίπεδα του κερατοειδούς στρώματος (Β). Οι εικόνες προέρχονται από τη δημοσίευση του *Thomas* [124]



Ανεξάρτητα από τη χρήση φακών επαφής, ο υφομύκητας *Fusarium* είναι ο πιο συχνός αιτιολογικός παράγοντας μυκητιασικής κερατίτιδας στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (124). Επέκταση της λοίμωξης στον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενδοφθαλμίτιδας (*endopthalmitis*) μπορεί να παρατηρηθεί σε σοβαρές περιπτώσεις κερατίτιδας από τον υφομύκητα *Fusarium* και έχει κακή πρόγνωση

για την αποκατάσταση της όρασης του ασθενούς (124). Ο βαθμός ανοσοκαταστολής διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση κερατίτιδας από *Fusarium* (*Εικόνα 10*) (127).

Εικόνα 10. Κερατίτιδα από *Fusarium* σε *Balb-c* ποντίκια.
Απεικόνιζεται ο κερατοειδής χιτώνας ποντικών μετά από ή χωρίς ανοσοκαταστολή με κυκλοφωσφαμίδη 1, 4 και 8 μέρες μετά από λοίμωξη με τον υφομύκητα. Ποντίκια τα οποία δεν έλαβαν κυκλοφωσφαμίδη (άνω εικόνες) παρουσιάζουν ήπια φλεγμονή του κερατοειδή την πρώτη ημέρα μετά τη λοίμωξη η οποία καταπολεμάται από το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίς περαιτέρω επιπλοκές. Αντίθετα, ποντίκια που έλαβαν κυκλοφωσφαμίδη (κάτω εικόνες) παρουσιάζουν σοβαρής μορφής κερατίτιδα η οποία εξελίσσεται με την πάροδο των ημερών. Η εικόνα προέρχεται από τη δημοσίευση των Wu και συνεργατών [127]



2. Περιτονίτιδα σε χρήστες συνεχούς περιτοναϊκής αιμοκάθαρσης

Περιτονίτιδα (*peritonitis*) από *Fusarium* έχει αναφερθεί σε χρόνιους νεφροπαθείς που χρησιμοποιούν συνεχή περιτοναϊκή αιμοκάθαρση (33, 34, 128–131). Τα πιο συχνά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι πυρετός, κοιλιακό άλγος και ελάττωση της ροής μέσω του περιτοναϊκού καθετήρα. Το περιτοναϊκό υγρό είναι συνήθως θολό και η πρόοδος της νόσου αργή και χρόνια. Η πρόγνωση είναι πολύ καλή με αφαίρεση του καθετήρα με ή χωρίς αντιμυκητιασική θεραπεία (33, 34, 128–131).

3. Μυκηταιμία σε ασθενείς με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες

Ασθενείς με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες μπορούν να αναπτύξουν μυκηταιμία (*fungemia*) με διάφορα είδη *Fusarium*. Κλινικές περιπτώσεις με *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium chlamydosporum* και άλλα είδη του υφομύκητα έχουν αναφερθεί (31, 32, 132–134). Ακόμα και σε ασθενείς με παρατεταμένη ουδετεροπενία,

έγκαιρη έναρξη επιθετικής αντιμυκητιασικής θεραπείας (συνήθως με αμφοτερικίνη Β) και απομάκρυνση του καθετήρα έχουν ως αποτέλεσμα τη συνήθως πολύ καλή πρόγνωση των λοιμώξεων αυτών. Σε μια ευρωπαϊκή μελέτη με 140 επεισόδια μυκηταιμίας (συμπεριλαμβανομένων και 4 προκαλούμενων από *Fusarium*) ο μόνος παράγοντας που σχετιζόταν με κακή πρόγνωση των λοιμώξεων αυτών σε πολυπαραγοντική ανάλυση (*multivariate analysis*) ήταν η μικρή (< 10 ημέρες) διάρκεια της θεραπείας (134). Αντίθετα, η παρουσία βλεννογονίτιδας (*mucositis*) και ουδετεροπενίας δεν ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες κακής πρόγνωσης από την παρουσία μυκηταιμίας από *Fusarium* (134).

Δεδομένης της έλλειψης αναφοράς λοιμώξεων από τον υφομύκητα *Fusarium* σε ασθενείς με προσθετικά υλικά που περιέχουν βαριά μέταλλα όπως το τιτάνιο (*titanium*) και η πλατίνα (*platinum*) και δεδομένου του πολύ μεγάλου αριθμού ασθενών οι οποίοι έχουν δεχθεί τα ανωτέρω προσθετικά υλικά, είναι πιθανό ότι το μέγεθος και οι προσκολλητικές ιδιότητες του υφομύκητα *Fusarium* να μην επιτρέπει την προσκόλληση του στα βαριά αυτά μέταλλα (135, 136).

3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΗΣ ΦΟΥΣΑΡΙΩΣΗΣ

3α. Εισαγωγή

Οι κλινικές εκδηλώσεις της διηθητικής φουσαρίωσης είναι μη ειδικές και η ανοσολογική κατάσταση του ασθενή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για τον καθορισμό της σοβαρότητας, του είδους, της διάρκειας και της πρόγνωσης της συγκεκριμένης λοίμωξης (*Πίνακας 4*) (8–10, 12). Ως εκ τούτου, σε αντίθεση με την εκδήλωση της φουσαρίωσης σε ασθενείς με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα η οποία έγκειται τις περισσότερες φορές σε εντοπισμένες λοιμώξεις μετά από τραύμα ή διαταραχή της συνέχειας του δέρματος (π.χ., λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, οφθαλμικές λοιμώξεις ή οστεομυελίτιδα) που μπορεί να μην απαιτήσει συστηματική αντιμυκητιασική θεραπεία, η διηθητική φουσαρίωση σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς εκδηλώνεται με έναν από τους ακόλουθους τρόπους (8–24):

- υποτροπιάζων πυρετός αγνώστου αιτιολογίας (*fever of unknown origin; FUO*)
- πνευμονία (*pneumonia*) με ή χωρίς συμμετοχή των παραρρίνιων κόλπων
- διασπαρμένη νόσος (*disseminated fusariosis*)
- μια ποικιλία εκδηλώσεων με συμμετοχή μεμονωμένων οργάνων.

3β. Πυρετός αγνώστου αιτιολογίας

Η πιο συνηθισμένη αρχική εκδήλωση της διηθητικής φουσαρίωσης είναι πυρετός ο οποίος επιμένει παρά τη χρησιμοποίηση ευρέως-φάσματος αντιμικροβιακής θεραπείας σε ένα βαρέως ουδετεροπενικό ασθενή (8–24). Επειδή ο υφομύκητας *Fusarium* είναι ανθεκτικός στα περισσότερα χρησιμοποιούμενα αντιμυκητιασικά φάρμακα, δεν είναι ασύνηθες να εκδηλώνεται διηθητική φουσαρίωση σε κάποιο ασθενή ο οποίος ήδη λαμβάνει προφυλακτική (*prophylactic*) ή εμπειρική (*empiric*) θεραπεία με αμφοτερικίνη Β ή κάποια τριαζόλη (π.χ., φλουκοναζόλη, ιτρακοναζόλη ή βορικοναζόλη) (8–24, 137).

3γ. Πνευμονία με ή χωρίς συμμετοχή των παραρρίνιων κόλπων

Η πνευμονία αποτελεί πολύ συχνή κλινική εκδήλωση της διηθητικής φουσαρίωσης. Μια αναδρομική μελέτη με 43 ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση από το *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* έδειξε ότι πάνω από 80% των ασθενών αυτών είχαν

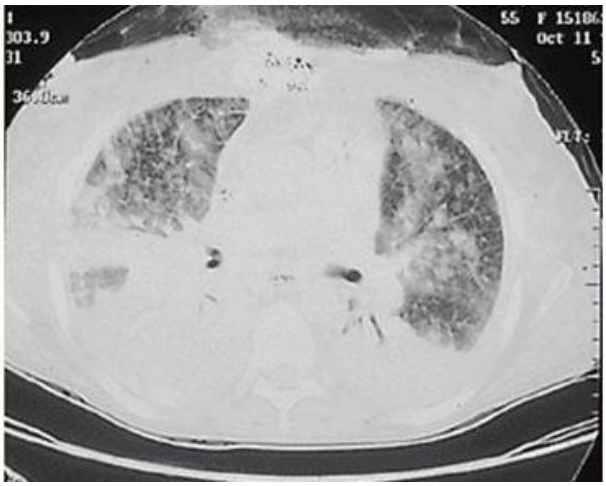
αναπτύξει πνευμονία (10). Στη συντριπτική πλειοψηφία αυτών των ασθενών (80%) υπήρχαν μη ειδικά (*non-specific*) ακτινολογικά ευρήματα (10). Οι περισσότερες πνευμονίες ήταν αμφοτερόπλευρες (*bilateral*) και πολυλοβώδεις (*multilobar*) (*Εικόνα 11*) (10). Λιγότερο συχνά, οζώδεις πυκνώσεις (*nodules*), πνευμονικές κοιλότητες (*cavities*) ή περιφερικά έμφρακτα (*wedge-shaped infarcts*) μπορούν να παρατηρηθούν (*Εικόνες 12 και 13*) (10).

Πίνακας 4. Κλινικές εκδηλώσεις της διηθητικής φουσαρίωσης ανάλογα με την υποκείμενη νόσο του ασθενούς

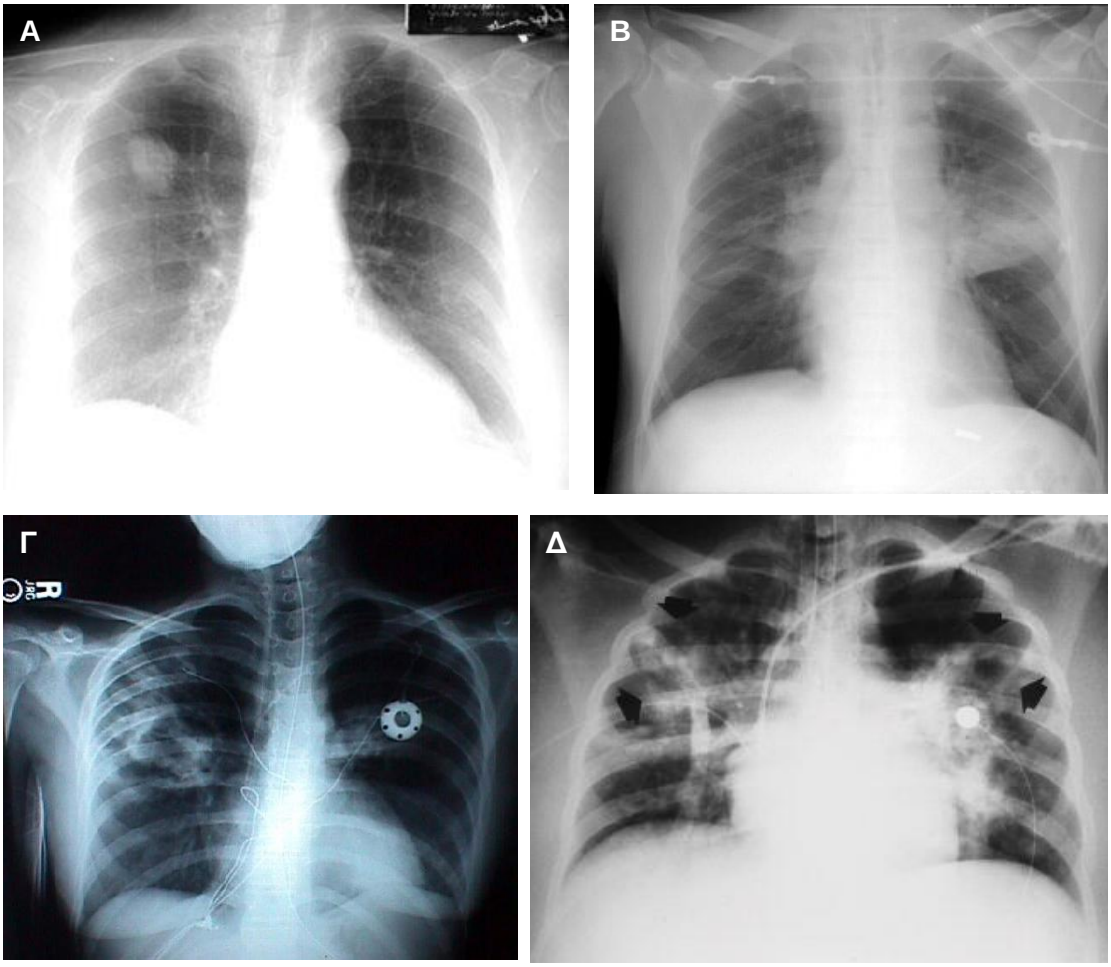
Υποκείμενη νόσος	**Κλινική εκδήλωση φουσαρίωσης**
Οξεία λευχαιμία ή άλλη αιματολογική νόσος	Πυρετός αγνώστου αιτιολογίας Πνευμονία Ιγμορίτιδα Μυκηταιμία Διασπαρμένη φουσαρίωση
Μεταμόσχευση μυελού των οστών	Διασπαρμένη φουσαρίωση Πνευμονία Ιγμορίτιδα Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα
Μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων	Δερματική λοίμωξη Πνευμονικό απόστημα Διασπαρμένη φουσαρίωση
Καρκίνος συμπαγών οργάνων	Ονυχομύκωση Εντοπισμένες λοιμώξεις μαλακών μορίων Διαρπασμένη φουσαρίωση (σπάνια)
Σοβαρά εγκαύματα	Αποικισμός ή λοίμωξη του τραύματος Νεκρωτική δερματική εντοπισμένη λοίμωξη Διασπαρμένη φουσαρίωση
Άλλες νόσοι (π.χ., διαβήτης)	Ονυχομύκωση Διηθητική ενδορινική λοίμωξη Ενδοφθαλμίτιδα Διασπαρμένη φουσαρίωση
Ανοσοεπαρκή άτομα (μετά από τραύμα ή χειρουργική επέμβαση)	Οστεομυελίτιδα Κερατίτιδα Ενδοφθαλμίτιδα

Η ακτινογραφία θώρακος (*CXR; chest X-ray*) συνήθως έχει μικρή ευαισθησία (*sensitivity*) και ειδικότητα (*specificity*) για τη διάγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης (8–10). Ως εκ τούτου, η χρήση αξονικής τομογραφίας του θώρακος (*CT; chest computed tomography*) είναι απαραίτητη για την έγκαιρη διάγνωση καθώς παρέχει περισσότερες πληροφορίες ακόμα και στα αρχικά στάδια της λοίμωξης όταν η ακτινογραφία θώρακος παρουσιάζει μη ειδικά ευρήματα (*Εικόνα 14*).

Εικόνα 11. Αξονική τομογραφία θώρακος ασθενούς με μεταμόσχευση μυελού των οστών και αμφοτερόπλευρες πολυλοβώδεις μη-ειδικές πυκνώσεις από λοίμωξη με *Fusarium*



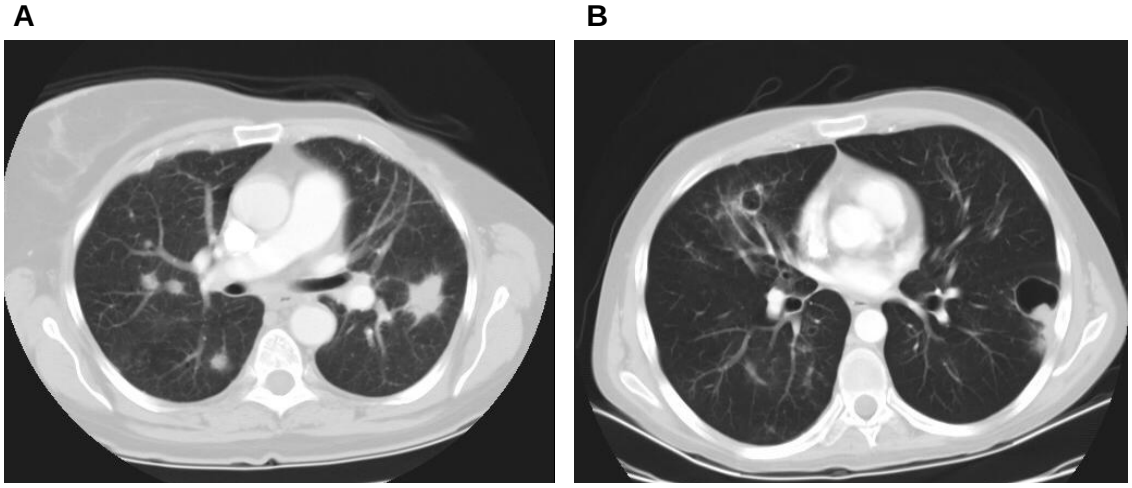
Εικόνα 12. Ακτινογραφίες θώρακος ασθενών με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση που παρουσιάζουν οζώδεις πυκνώσεις (Α, Β) και πνευμονικές κοιλότητες (Γ, Δ)



Οι χαρακτηριστικές βλάβες *"halo sign"* και *"air-crescent sign"* μπορούν επίσης να παρατηρηθούν στην αξονική τομογραφία θώρακα σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση,

οι μεν πρώτες κατά τη αρχική φάση της ουδετεροπενίας και οι δεύτερες μετά την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων σε φυσιολογικά επίπεδα (*Εικόνα 15*) (8–10). Παρόμοιες ακτινολογικές εικόνες μπορούν να παρουσιαστούν και σε άλλες λοιμώξεις από υφομύκητες όπως είναι η διηθητική ασπεργίλλωση (*invasive aspergillosis*), η μουκορμύκωση (*mucormycosis*) και η σκεδοσπορίωση (*scedosporiosis*) (138). Συμπτώματα εκ του αναπνευστικού όπως βήχας (συνήθως μη παραγωγικός) (*non-productive cough*) και δύσπνοια (*dyspnea*) είναι συχνά, ενώ αιμόπτυση (*hemoptysis*) και πλευριτικού τύπου θωρακικός πόνος (*pleuritic chest pain*) μπορούν επίσης να παρατηρηθούν, αλλά πιο σπάνια (10). Τέλος, η παρουσία πλευριτικού φυσήματος (*pleural rub*) κατά τη φυσική εξέταση αποτελεί ένδειξη πλευριτικής συμμετοχής της πνευμονίας (8–10).

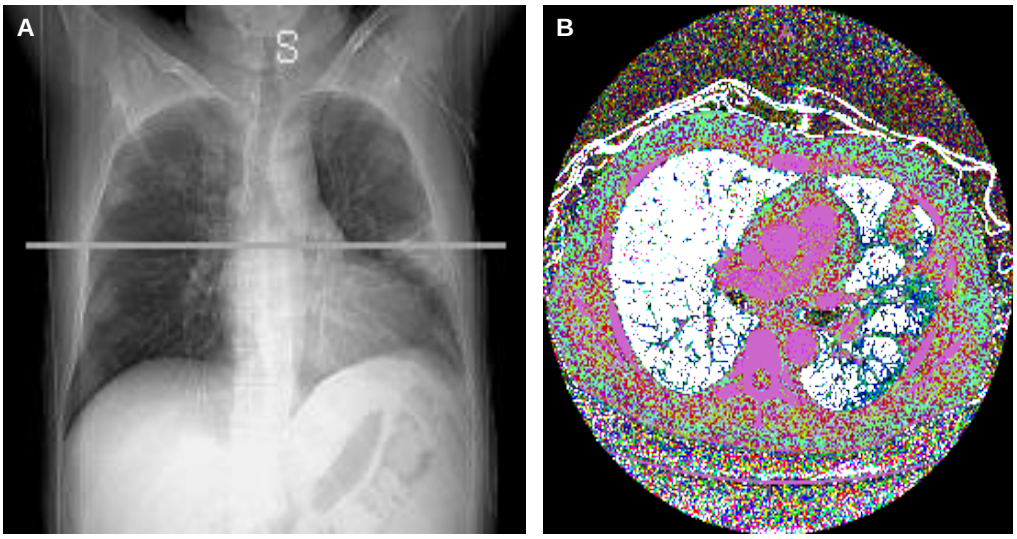
Εικόνα 13. Αξονική τομογραφία θώρακος με βλάβες φουσαρίωσης σε ασθενή με οξεία μυελογενή λευχαιμία μετά από χορήγηση κυτταραβίνης και ινταρουμπικίνης, αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών και αντίδραση του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή.
Α. Πνευμονικές βλάβες κατά τη διάρκεια της ουδετεροπενίας (όζοι).
Β. Πνευμονικές βλάβες μετά την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων (κοιλότητες).
Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και η διηθητική πνευμονική ασπεργίλλωση όπως και άλλες διηθητικές πνευμονικές λοιμώξεις από υφομύκητες



Λοίμωξη των παραρρίνιων κόλπων επίσης συναντάται συχνά στη διηθητική φουσαρίωση (10, 139–142). Τα ιγμόρεια άντρα (*maxillary sinuses*) είναι οι πιο συχνές παραρρίνιες κοιλότητες που προσβάλλονται από τον υφομύκητα *Fusarium* και ακολουθούν οι ηθμοειδείς κοιλότητες (*ethmoid sinuses*) (10). Η ιγμορίτιδα από *Fusarium* είναι παρόμοια με αυτή που προκαλείται από *Zygomycetes, Aspergillus* ή άλλους υφομύκητες (π.χ., *Alternaria, Curvularia, Scedosporium*) και συνήθως χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μαύρων

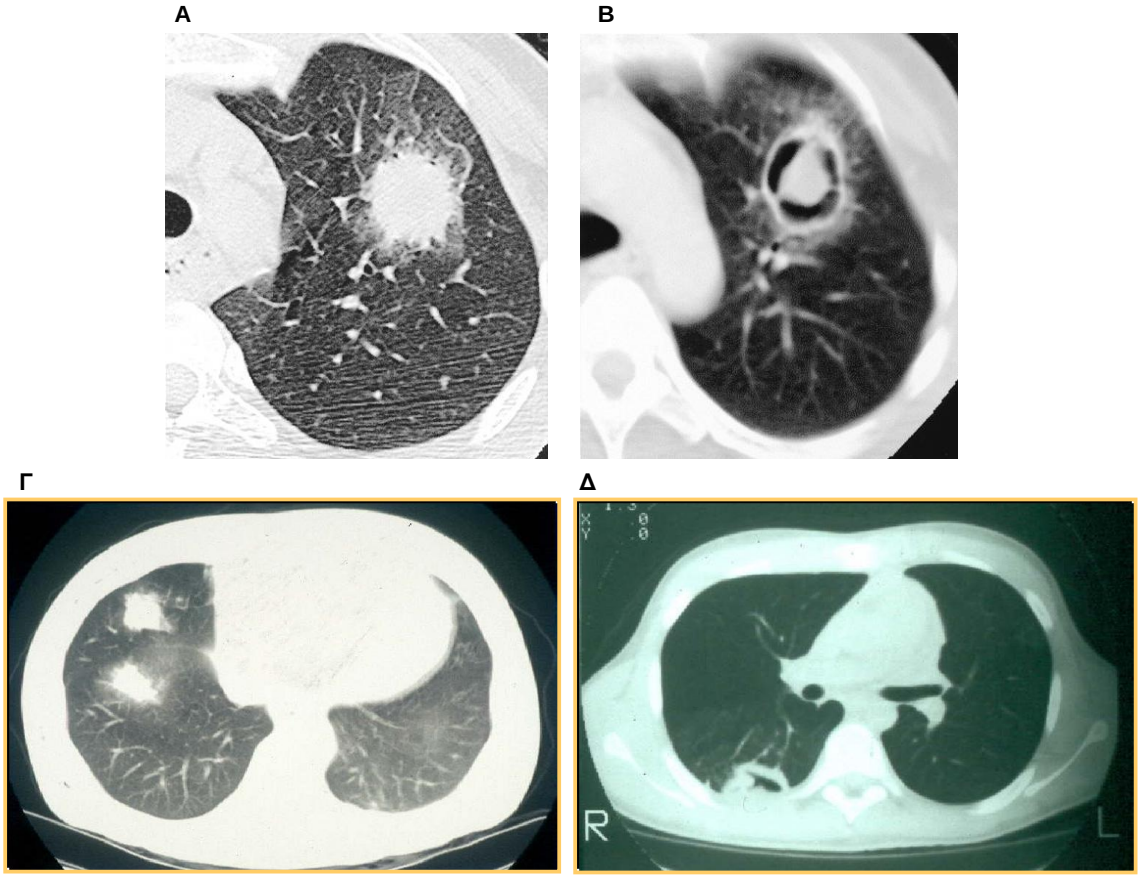
νεκρωτικών εσχάρων (*eschars*) στο βλενογόννο των παραρρίνιων κόλπων και της ρινικής κοιλότητας οι οποίες είναι εμφανείς κατά τη διενέργεια ενδοσκόπησης (*Εικόνα 16*) (139–142).

Εικόνα 14. Ακτινογραφία και αξονική τομογραφία θώρακος ασθενούς με μεταμόσχευση μυελού των οστών και πνευμονία από *Fusarium*. Απεικονίζεται μια μη ειδική περιφερική πύκνωση στην απλή ακτινογραφία θώρακος (Α) η οποία στην αντίστοιχη αξονική τομογραφία εμφανίζεται με τη μορφή οζώδων πυκνώσεων οι οποίες είναι περισσότερο χαρακτηριστικές για την εμφάνιση μυκητιασικής πνευμονία σε αυτή την ομάδα των ασθενών

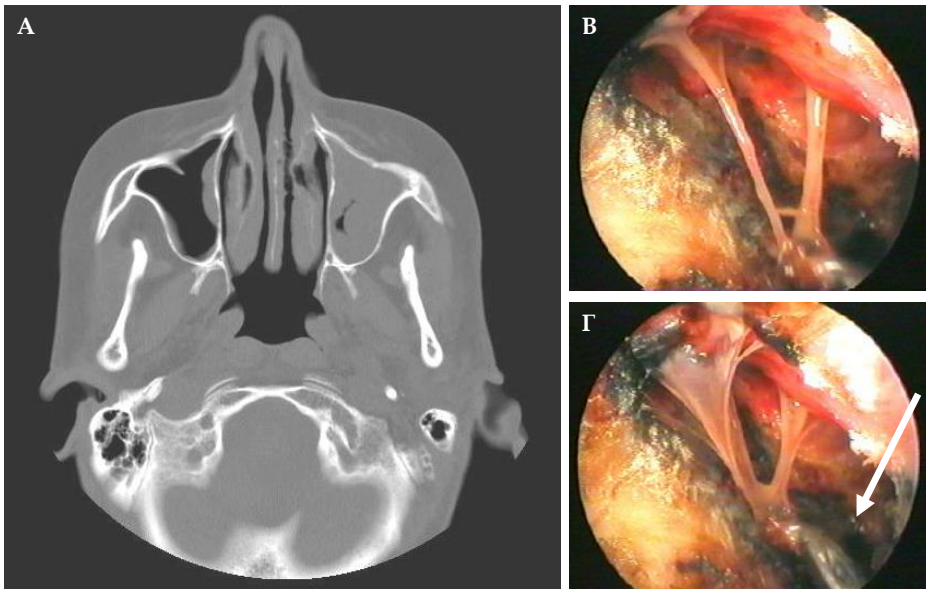


Σε γενικές γραμμές, η διηθητική πνευμονική φουσαρίωση (με ή χωρίς συμμετοχή των παραρρίνιων κόλπων) παρουσιάζει κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι πολύ δύσκολο να διαχωριστούν από αυτά που προκαλεί η διηθητική ασπεργίλλωση (5) και οι άλλες διηθητικές λοιμώξεις από υφομύκητες όπως η μουκορμύκωση από *Zygomycetes* (143, 144). Όμως, μια πρόσφατη μελέτη από το *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* εξέτασε κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να βοηθήσουν στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ της διηθητικής ασπεργίλλωσης και μουκορμύκωσης (145). Συγκεκριμένα, η ύπαρξη κλινικής συμμετοχής των παραρρίνιων κόλπων και η πρότερη προφύλαξη με βορικοναζόλη (κλινικά χαρακτηριστικά) όπως επίσης και η ύπαρξη πλευριτικής συλλογής και πολλαπλών (> 10) πνευμονικών όζων (ακτινολογικά χαρακτηριστικά) ήταν πολύ πιο συχνά στην μουκορμύκωση από ότι στην διηθητική ασπεργίλλωση (145). Ανάλογες μελέτες οι οποίες θα εξετάζουν ανάλογα κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά που θα βοηθούσαν στη διαφοροδιάγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης από τις άλλες διηθητικές λοιμώξεις από υφομύκητες θα ήταν χρήσιμες.

Εικόνα 15. Οι πνευμονικές βλάβες *"halo sign"* (Α, Γ) και *"air-crescent sign"* (Β, Δ) που μπορεί να παρατηρηθούν σε αξονική τομογραφία θώρακος σε ασθενείς με πνευμονική φουσαρίωση όπως και σε ασθενείς με διηθητική ασπεργίλλωση.
Οι εικόνες Α και Β προέρχονται από τη δημοσίευση των *Caillot* και συνεργατών [138]

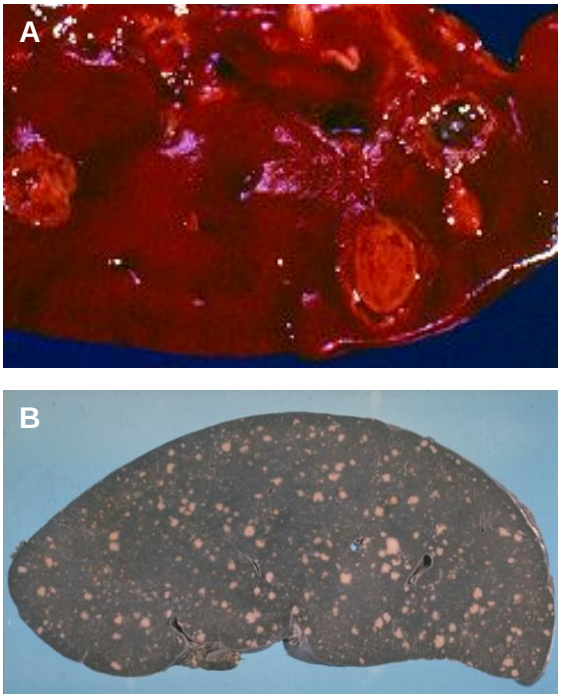


Εικόνα 16. Ακτινολογική (Α) και ενδοσκοπική (Β, Γ) εικόνα ιγμορίτιδας από *Fusarium*.
Στην εικόνα Γ με βέλος απεικονίζεται ο νεκρωτικός ιστός στο ρινικό βλενογόννο εξαιτίας της διήθησης από τον υφομύκητα



Επίσης, η πνευμονική και παραρρινική φουσαρίωση μπορούν να διασπαρούν σε περίπτωση που ένας ασθενής παραμείνει βαριά και παρατεταμένα ανοσοκατασταλμένος (8–10, 12). Σχεδόν όλα τα όργανα μπορούν να προσβληθούν κατά την αιματογενή (*hematogenous*) διασπορά του υφομύκητα *Fusarium* συμπεριλαμβανομένου του δέρματος, των νεφρών (*Εικόνα 17Α*), του ήπατος, του σπλήνα (*Εικόνα 17Β)*, του εγκεφάλου, του μυελού των οστών, της καρδιάς, του παγκρέατος και του γαστρεντερικού σωλήνα (8–24).

Εικόνα 17. Διασπαρμένη διηθητική φουσαρίωση με συμμετοχή των νεφρών και του σπλήνα. Η εικόνα (από νεκροψία) απεικονίζει το νεφρικό (Α) και σπληνικό (Β) παρέγχυμα ασθενούς με διηθητική φουσαρίωση. Απεικονίζονται τα αποστήματα που έχουν προκληθεί από τη διήθηση του υφομύκητα

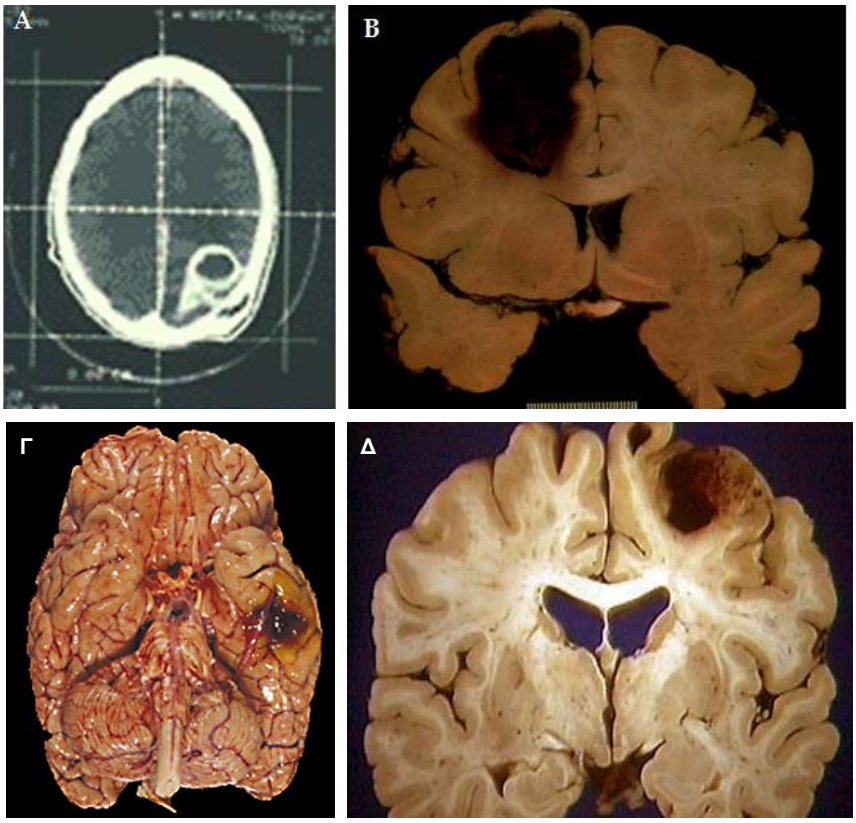


3δ. Άλλες κλινικές εκδηλώσεις της διηθητικής φουσαρίωσης

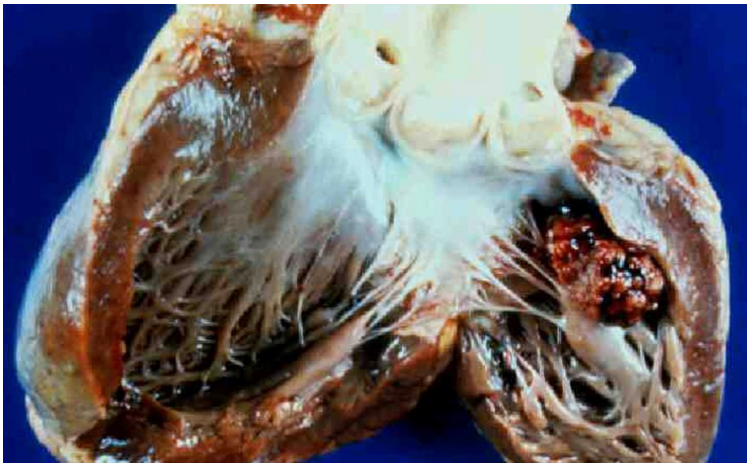
Άλλες εκδηλώσεις της διηθητικής φουσαρίωσης που έχουν περιγραφεί με μικρότερη συχνότητα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς είναι κερατίτιδα (*keratitis*) (45, 120, 124), ενδοφθαλμίτιδα (*endopthalmitis*) (46, 47, 124), σκληρίτιδα (*scleritis*) (146), οστεομυελίτιδα (*osteomyelitis*) (48, 49, 147, 148), σηπτική αρθρίτιδα (*septic arthritis*) (149, 150), μυοσίτιδα (*myositis*) (8, 9), νεφρίτιδα (*nephritis*) (151), αιμορραγική κυστίτιδα (*hemorrhagic cystitis*) (8, 9), περιτονίτιδα (33, 34, 128–131, 152), κακοήθης εξωτερική ωτίτιδα [*malignant otitis externa;* ο υφομύκητας *Fusarium* ήταν ο αιτιολογικός παράγοντας του 1% των περιπτώσεων μυκητιασικής κακοήθους εξωτερικής ωτίτιδας σε μια μελέτη από τη Γκαμπόν της

Κεντρικής Αφρικής (153)], μαστικό απόστημα (*breast abscess*) (154), εγκεφαλικό απόστημα (*cerebral abscess*; *Εικόνα 18Α*) (155), εγκεφαλικό έμφρακτο ή αιμορραγία (*cerebral infarct/hemorrhage*; *Εικόνα 18Β–Δ*) (8, 9), μηνιγγίτιδα (*meningitis*) (156), μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (*meningoencephalitis*) (157), ενδοκαρδίτιδα (*endocarditis; Εικόνα 19*) (158, 159), μυοκαρδίτιδα (*myocarditis*) (160), λαρυγγίτιδα (*laryngitis*) (161), τραχειοβρογχίτιδα (*tracheobronchitis*) (162), φαρυγγοοισοφαγίτιδα (*pharyngoesophagitis*) (162), επιγλωτίτιδα (*epiglotitis*) (162), λοίμωξη της στοματικής κοιλότητας (*oral infection*) (163), σιαλογονίτιδα (*sialedinitis*) (164), τραχηλίτιδα (*cervicitis*) (165) και χρόνια ηπατίτιδα (*chronic hepatitis*) (166). Τέλος, μυκέτωμα (*mycetoma*) από τον υφομύκητα *Fusarium* μπορεί να παρατηρηθεί σε ασθενείς με ή χωρίς ανοσοκαταστολή (*Εικόνα 20*) (167).

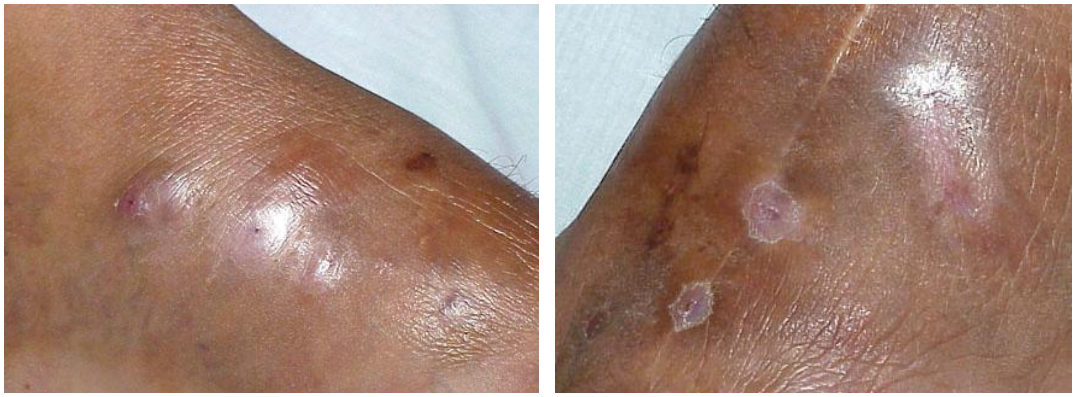
Εικόνα 18. Εγκεφαλικό απόστημα (Α) και εγκεφαλική αιμορραγία (Β–Δ) σε ασθενείς με διασπαρμένη διηθητική φουσαρίωση



Εικόνα 19. Ενδοκαρδίτιδα από *Fusarium solani*.
Απεικονίζεται η εκβλάστηση στη μιτροειδή βαλβίδα. Εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους των εκβλαστήσεων και της υψηλής θνητότητας που συνεπάγεται η χρήση μόνο συντηρητικής αντιμυκητιασικής αγωγής, χειρουργική επέμβαση με αντικατάσταση της βαλβίδας χρησιμοποιείται συχνά σε περιπτώσεις μυκητιασικής ενδοκαρδίτιδας συμπεριλαμβανομένου αυτών προκαλούμενων από τον υφομύκητα *Fusarium*



Εικόνα 20. Μυκέτωμα από *Fusarium*



4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΗΣ ΦΟΥΣΑΡΙΩΣΗΣ: ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟ ΑΛΛΕΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΕΣ ΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

4α. Εισαγωγή

Μια από τις σημαντικότερες διαγνωστικές προκλήσεις σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με μυκητιασική πνευμονία είναι η διαφορική διάγνωση μεταξύ διηθητικής ασπεργίλλωσης, διηθητικής φουσαρίωσης και μουκορμύκωσης (8). Η τελευταία είναι μια ακόμα ευκαιριακή διηθητική μυκητιασική λοίμωξη, η οποία σε ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες και μεταμόσχευση του μυελού των οστών συνήθως εκδηλώνεται ως πνευμονία (με ή χωρίς παραρρινική συμμετοχή) σε αντίθεση με τη ρινοεγκεφαλική (*rhinocerebral*) μορφή της μουκορμύκωσης που συναντάται συνήθως σε ασθενείς με μη ελεγχόμενο διαβήτη και διαβητική κετοξέωση (*ketoacidosis*) (143, 144). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι κλινικές και ακτινολογικές εκδηλώσεις των ευκαιριακών διηθητικών λοιμώξεων από υφομύκητες είναι παρόμοιες και μη ειδικές (*Πίνακας 5*) (8–10). Ως εκ τούτου, είναι αδύνατο να γίνει διαφοροδιάγνωση μεταξύ των ανωτέρω λοιμώξεων με βάση μόνο τα κλινικά και ακτινολογικά τους χαρακτηριστικά, και έτσι η απομόνωση του υφομύκητα *Fusarium* από καλλιέργειες κλινικών δειγμάτων ή βιοψιών (*biopsies*) είναι απαραίτητη για τη βέβαιη διάγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης.

4β. Ιστοπαθολογία

Ανάλυση βιοψιών από ιστούς που έχουν προσβληθεί από τον υφομύκητα *Fusarium* συνήθως αναδεικνύει εκτεταμένη ιστική νέκρωση η οποία περιβάλλει τις υφές του μύκητα οι οποίες έχουν το χαρακτηριστικό ότι διακλαδίζονται σε οξεία γωνία και εμφανίζουν διαφράγματα (*Εικόνα 21*) (9, 168). Η ιστοπαθολογική αυτή εικόνα είναι πανομοιότυπη με αυτή που συναντάται με τους υφομύκητες του γένους *Aspergillus* και *Pseudallescheria* με αποτέλεσμα να είναι συχνή η σύγχυση στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ των ανωτέρω υφομυκήτων (9). Παρά την ομοιότητα αυτή πάντως, οι *Liu* και συνερευνητές (169) παρατήρησαν ότι υπαρχουν συγκεκριμένες μικρές διαφορές στην ιστοπαθολογική εικόνα των υφομυκήτων *Aspergillus* και *Fusarium* ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός μεταξύ τους με βάση αποκλειστικά την ιστοπαθολογική ανάλυση (*histopathology*).

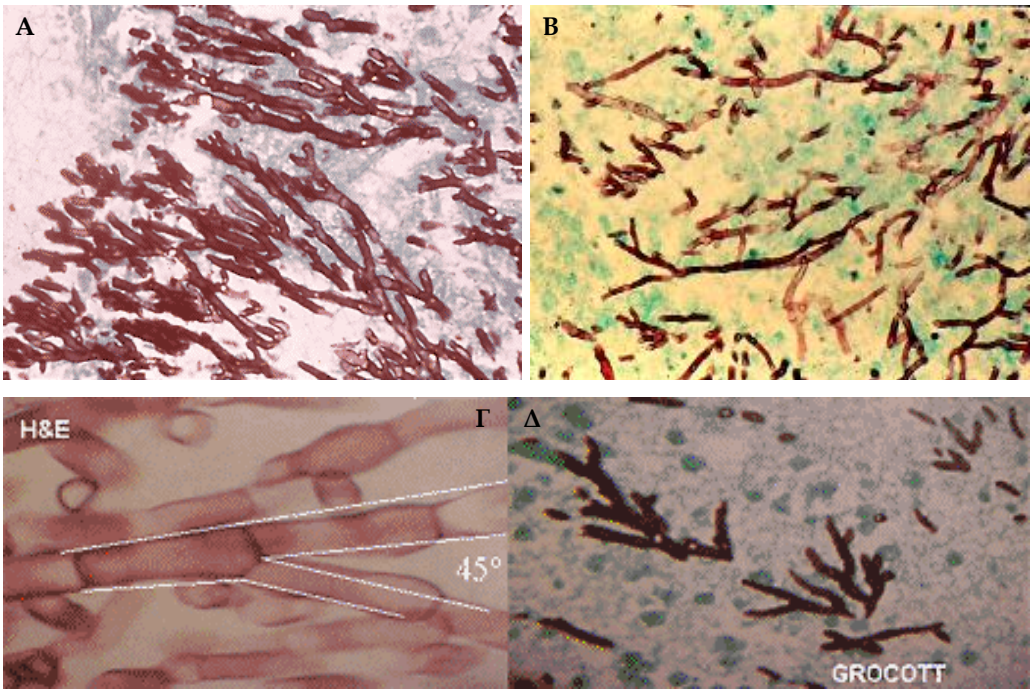
Πίνακας 5. Βασικότερες ομοιότητες και διαφορές μεταξύ της διηθητικής φουσαρίωσης και διηθητικής ασπεργίλλωσης	
Κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ φουσαρίωσης και ασπεργίλλωσης	**Κυριότερες διαφορές μεταξύ φουσαρίωσης και ασπεργίλλωσης**
Παρόμοιες κλινικές εκδηλώσεις (πυρετός παρά τη χρήση ευρέως-φάσματος αντιμικροβιακής θεραπείας, πνευμονία, παραρρινική λοίμωξη)	Οι δερματικές εκδηλώσεις είναι πιο συχνές στη διασπαρμένη διηθητική φουσαρίωση (50 –70%) σε σχέση με την διασπαρμένη διηθητική ασπεργίλλωση (< 10%)
Όμοια ιστοπαθολογική εικόνα (διήθηση αιμοφόρων αγγείων, υφές με διαφράγματα και οξεία γωνία διακλάδωσης)	Οι δερματικές βλάβες είναι διαφορετικές (οι βλάβες από *Aspergillus* είναι λιγότερες σε αριθμό, λιγότερο διασπαρμένες στο σώμα, έχουν μεγαλύτερη διάμετρο, και έχουν μια μαύρη κεντρική εσχάρα με περιφερική ερυθηματώδη άλω)
Όμοια ακτινολογικά ευρήματα (όζοι, κοιλότητες, *halo sign*, *air-crescent sign*)	Η παρουσία *Fusarium* στο αίμα είναι πιο συχνή στη φουσαρίωση (60 –70%) σε σχέση με την ασπεργίλλωση (< 5%). Η μυκηταιμία επίσης συμβαίνει νωρίτερα στη φουσαρίωση σε σχέση με την ασπεργίλλωση στην οποία συνήθως εμφανίζεται λίγο πριν το θάνατο του ασθενούς
Και οι δύο υφομύκητες (*Aspergillus* και *Fusarium*) είναι διάσπαρτοι στο περιβάλλον	Ο υφομύκητας *Fusarium* είναι ανθεκτικός στα περισσότερα αντιμυκητιασικά φάρμακα
Υψηλή θνητότητα (>70%)	Μυαλγίες είναι συχνές στη φουσαρίωση
Συνήθως η λοίμωξη ξεκινά από την κοινότητα (*community–acquired*) παρά το ότι νοσοκομιακές λοιμώξεις μπορεί επίσης να παρατηρηθούν	Η ασπεργίλλωση είναι πολύ πιο συχνή από τη φουσαρίωση
Τοπικές και διασπαρμένες λοιμώξεις μπορεί να παρατηρηθούν	Η φουσαρίωση έχει χειρότερη πρόγνωση από την ασπεργίλλωση
Παραγωγή τοξινών	
Άγνωστη περίοδος επώασης	

Συγκεκριμένα, οι υφές του μύκητα *Fusarium* συχνά παρουσιάζουν ποικιλία στη διάμετρο τους και τυπικά διακλαδίζονται τόσο σε γωνίες 45° (*Εικόνα 21Γ*) όσο και σε γωνίες 90° (9, 168, 169). Αντιθέτως, οι υφές του μύκητα *Aspergillus* τείνουν να είναι σταθερής διαμέτρου και διακλαδίζονται σε γωνίες 90° πολύ σπάνια (169). Αντίθετα, οι υφές του γένους *Zygomycetes* διακλαδίζονται σε γωνίες > 90°, δεν έχουν διαφράγματα, και συνήθως έχουν μεγαλύτερη διάμετρο (169). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους από τις υφές των μυκήτων *Aspergillus* και *Fusarium*. Είναι μάλιστα

αξιοσημείωτο ότι η ευρεία αυτή γωνία και η έλλειψη διαφραγμάτων των υφών του γένους *Zygomycetes* έχει ως αποτέλεσμα τη συχνή αναδίπλωση και κατάρρευση τους (168, 169).

Μια υποσχόμενη τεχνική για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ των υφομυκήτων *Aspergillus* και *Fusarium* σε υλικά βιοψιών είναι η διενέργεια ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης (*immunohistochemistry*) με χρήση φθορίζοντων πολυκλωνικών αντισωμάτων (*fluorescent polyclonal antibodies)* που είναι σε θέση να διαχωρίζουν τους δύο αυτούς υφομύκητες (170, 171).

Εικόνα 21. Ιστοπαθολογική εικόνα υφών *Fusarium*.
Στην εικόνα Γ απεικονίζεται η γωνία που συνήθως διακλαδίζονται οι υφές *Fusarium*



4γ. *In situ* υβριδισμός

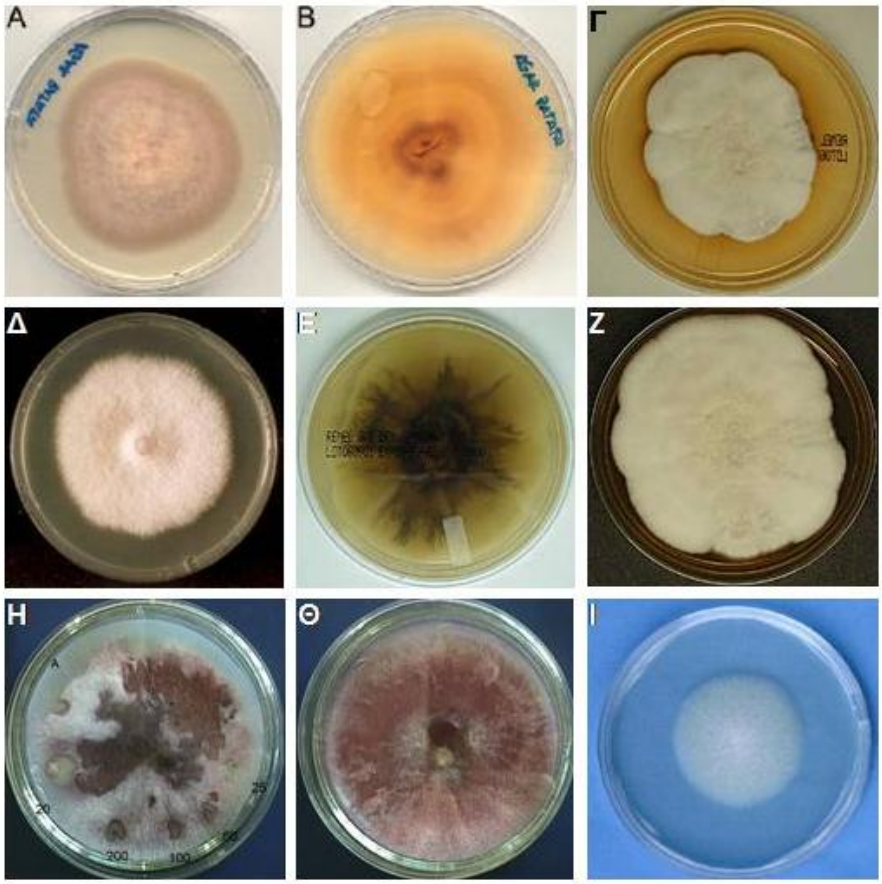
Διάφορες μοριακές μέθοδοι έχουν εισαχθεί ως πολλά υποσχόμενες για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ των λοιμώξεων από *Aspergillus* και *Fusarium* σε ιστοπαθολογικές τομές. Συγκεκριμένα, σε μια πρόσφατη μελέτη οι *Hayden* και συνερευνητές (172) έδειξαν ότι ο *in situ* υβριδισμός (*in situ hybridization*) έναντι ριβοσωμικών ριβονουκλεϊκών οξέων μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη γρήγορη και έγκυρη διαφορική διάγνωση μεταξύ των μυκήτων *Aspergillus*, *Pseudallescheria boydii* και *Fusarium* σε βιοψίες ιστών. Επειδή οι τρεις αυτοί μύκητες έχουν διαφορετική ευαισθησία στα χρησιμοποιούμενα αντιμυκητιασικά φάρμακα, η δυνατότητα έγκαιρης και έγκυρης διαφορικής διάγνωσης μεταξύ τους με τη

χρήση *in situ* υβριδισμού πολύ πριν τα αποτελέσματα της μυκητιασικής καλλιέργειας είναι διαθέσιμα, είναι πολύ πιθανό να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην σωστή επιλογή αντιμυκητιασικής αγωγής στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με κλινική υποψία μυκητιασικής λοίμωξης.

4δ. Καλλιέργεια

Σε κάθε περίπτωση όμως, η απομόνωση του *Fusarium* με καλλιέργεια (*culture*) από προσβαλλόμενους ιστούς παραμένει η μέθοδος εκλογής (*gold standard*) για τη διαφορική διάγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης από την διηθητική ασπεργίλλωση (9). Μικροσκοπικά, οι αποικίες του υφομύκητα *Fusarium* ξεκινούν σαν άσπρο αποτύπωμα το οποίο γρήγορα εξελίσσεται σε ένα κίτρινο, ροζ ή μπορντό κέντρο με περιφέρεια ελαφρότερης απόχρωσης (*Εικόνα 22*) (9).

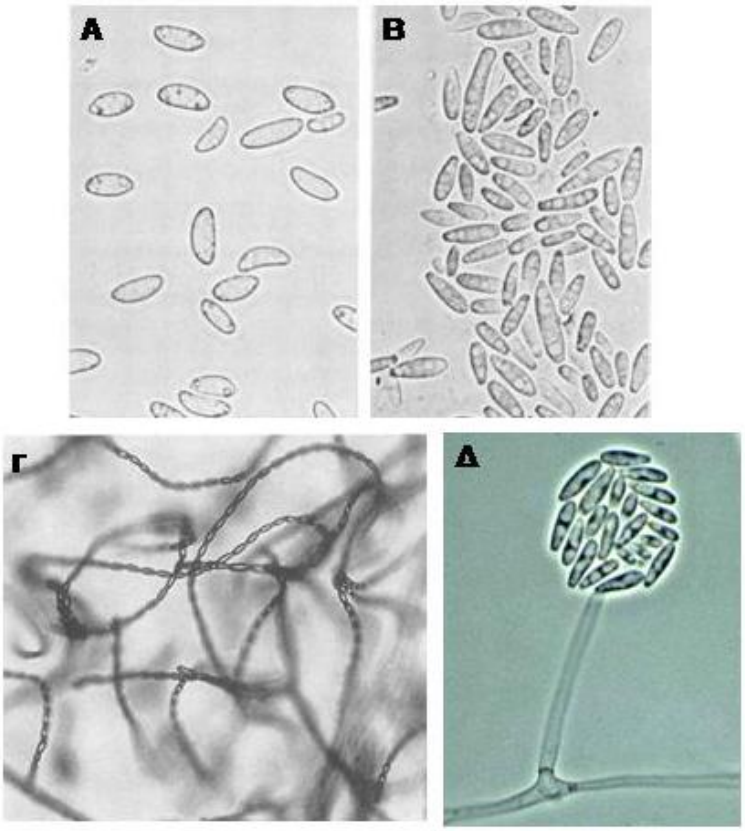
Εικόνα 22. Αποικίες διαφόρων ειδών *Fusarium* σε δισκία *petri*



Υπάρχουν τρία είδη κονιδίων *Fusarium* τα οποία συναντώνται στις καλλιέργειες: τα μικροκονίδια (*microconidia, Εικόνα 23* και *27Α*), τα μακροκονίδια (*macroconidia, Εικόνα 24* και

26Β), και τα χλαμυδοσπόρια (*chlamydospores, Εικόνα 25* και *26Γ*) (9, 168). Μερικά είδη *Fusarium* παράγουν και τα τρία αυτά είδη κονιδίων, ενώ άλλα είδη δεν έχουν αυτή τη δυνατότητα (9, 168). Τα μακροκονίδια μερικές φορές μπορούν να παραχθούν στην επιφάνεια των μονοφιαλίδων (*monophialides*) ή πολυφιαλίδων (*polyphialides*) του μυκηλίου (*Εικόνα 25* και *26Α*) (9, 168).

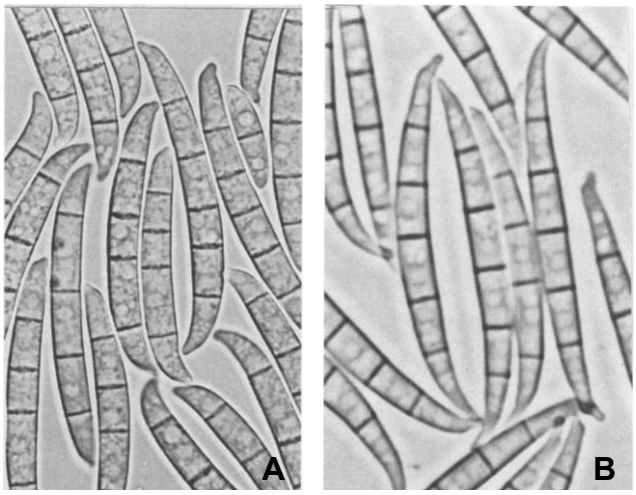
Εικόνα 23. Μικροκονίδια *Fusarium solani* (Α) και *Fusarium moniliforme* (Β). Διάταξη μικροκονιδίων *Fusarium moniliforme* σε μορφή αλυσίδας (Γ). *Fruiting body Fusarium* με μικροκονίδια (Δ). Οι εικόνες προέρχονται από τη δημοσίευση των *Nelson* και συνεργατών [9]



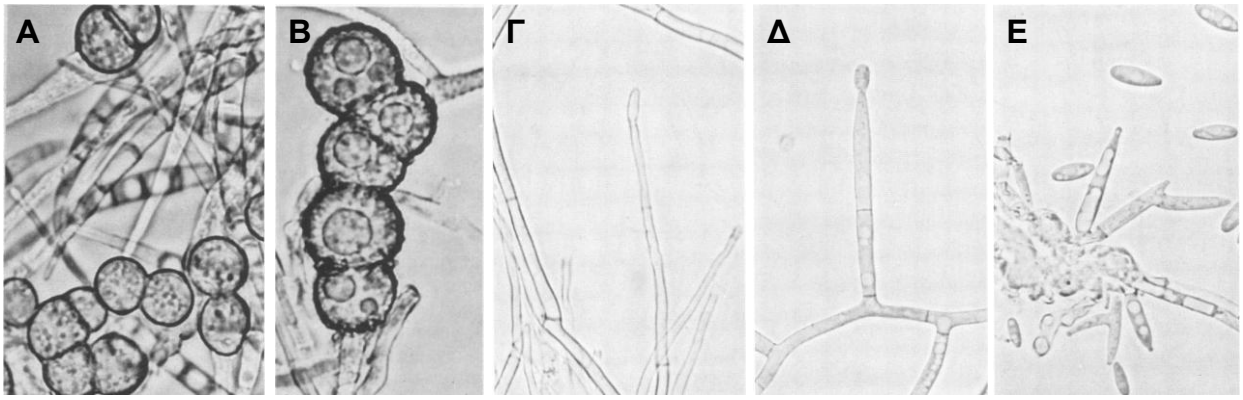
Η παρουσία των μακροκονιδίων, τα οποία έχουν ένα χαρακτηριστικό σχήμα κανό (*canoe-shaped*), είναι σημαντική για την ταυτοποίηση του γένους *Fusarium* (*Εικόνα 24*) (9, 168). Ως εκ τούτου, όταν τα μακροκονίδια λείπουν, η ταυτοποίηση του *Fusarium* καθίσταται δυσχερής, καθώς είναι πιο εύκολη η σύγχυση με άλλους σπάνιους σαπροφυτικούς υφομύκητες όπως είναι οι *Acremonium, Cylindrocarpon* και *Verticillium* (9). Άλλα σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του υφομύκητα *Fusarium* είναι η παρουσία των μικροκονιδίων και χλαμυδοσπορίων και η μορφολογία των κονιδιοφόρων (*conidiophores*; *Εικόνα 27Β*) εκ των οποίων εκφύονται τα μικροκονίδια (9, 168). Επιπρόσθετα, το μήκος και

το χρώμα των αποικιών, το σχήμα των μακροκονιδίων, και ο αριθμός, το σχήμα και η διαμόρφωση των μικροκονιδίων (*Εικόνα 23*) είναι πολύ χρήσιμα στο διαχωρισμό μεταξύ των διαφόρων ειδών *Fusarium* (9). Παρόλα αυτά, η διαφοροποίηση αυτή δεν είναι πάντα δυνατή μόνο με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας, καθώς ο υφομύκητας *Fusarium* εμφανίζει τάση να αλλάζει μορφολογία γρήγορα και συχνά (*Εικόνα 22*). Ως εκ τούτου, η παραπομπή της καλλιέργειας σε ένα εργαστήριο αναφοράς (*reference laboratory*) είναι πολλές φορές απαραίτητη για την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών *Fusarium* (9).

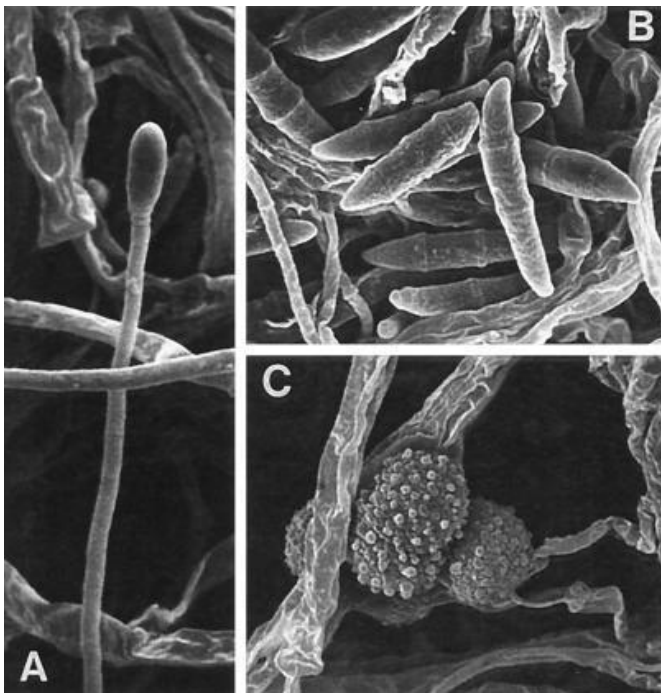
Εικόνα 24. Μακροκονίδια *Fusarium solani* (Α) και *Fusarium oxysporum* (Β)
Οι εικόνες προέρχονται από τη δημοσίευση των *Nelson* και συνεργατών [9]



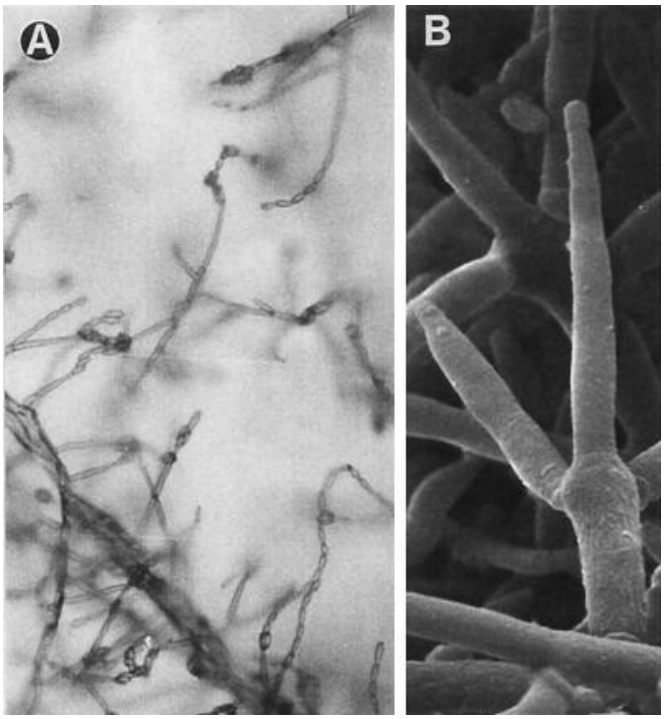
Εικόνα 25. Χλαμυδοσπόρια *Fusarium solani* (Α) και *Fusarium equiseti* (Β). Μονοφιαλίδες *Fusarium solani* (Γ) και *Fusarium moniliforme* (Δ). Πολυφιαλίδες *Fusarium proliferatum* (Ε).
Οι εικόνες προέρχονται από τη δημοσίευση των *Nelson* και συνεργατών [9]



Εικόνα 26. Φιαλίδες (Α), μακροκονίδια (Β) και χλαμυδοσπόρια (Γ) *Fusarium solani*. Οι εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας προέρχονται από τη δημοσίευση των *Guarro* και συνεργατών [74]



Εικόνα 27. Αλυσίδες μικροκονιδίων (Α) και κονιδιοφόρα (Β) *Fusarium verticilloides*. Οι εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας προέρχονται από τη δημοσίευση των *Guarro* και συνεργατών [74]



4ε. Μέτρηση επιπέδων β-γλυκάνης

Εχει δειχθεί ότι η β-γλυκάνη [*(1-->3) beta-D-glucan*], ως παράγωγο του κυτταρικού τοιχώματος του υφομύκητα *Fusarium*, μπορεί να ανιχνευθεί σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση ίσως πιο γρήγορα από ότι η θετικοποίηση των αιμοκαλλιεργειών ή την εμφάνιση πυρετού και ότι τα επίπεδα της πιθανότατα να ελαττώνονται με την έναρξη θεραπείας και την καταπολέμηση της λοίμωξης (173, 174). Μάλιστα, μια πρόσφατη μελέτη από τους *Ostrosky-Zeichner* και συνεργάτες έδειξε ότι τρεις ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση είχαν επίπεδα β-γλυκάνης μεγαλύτερα από 60 pg/mL ανιχνευμένα σε κλινικά δείγματα (175). Περισσότερες μελέτες χρειάζονται όμως για τη σαφή οριοθέτηση της ευαισθησίας, ειδικότητας και προγνωστικής αξίας της συγκεκριμένης τεχνικής στη διάγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης.

4ζ. Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης

Εκτός από τις συνήθεις μεθόδους καλλιέργειας, μοριακές μέθοδοι όπως η αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (*polymerase chain reaction; PCR*) έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό να βελτιώσουν την διαγνωστική δυνατότητα από κλινικά δείγματα ασθενών με διηθητική φουσαρίωση όπως το αίμα ή οι βρογχοκυψελιδικές εκπλύσεις (*bronchoalveolar lavage; BAL*) (173, 176–181). Όμως, παρά το ότι η χρήση της *PCR* έχει προταθεί ότι βοηθάει στην πιο γρήγορη απομόνωση και διάγνωση του υφομύκητα *Fusarium*, περισσότερες μελέτες χρειάζονται ώστε να καθοριστεί με ακρίβεια η ευαισθησία και η ειδικότητα αυτών των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης. Επίσης, είναι απαραίτητο να καθορισθούν και να τυποποιηθούν οι παράμετροι της *PCR* έτσι ώστε όλα τα εργαστήρια να χρησιμοποιούν την ίδια τεχνική *PCR*, κάτι το οποίο θα έχει ως αποτέλεσμα τη μικρότερη δυνατή σύγχυση και μεταβλητότητα στα αποτελέσματα τους.

4η. Επαναλαμβανόμενη (*repetitive*) αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (*rep-PCR*) με βάση την τεχνική *Diversi Lab*

Εξαιτίας της δυσκολίας έγκαιρης ταυτοποίησης του είδους *Fusarium* με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε περίπου 35 – 50% των περιπτώσεων δεν είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός του είδους του υφομύκητα. Πέρα από τις δυσκολίες στην ταυτοποίηση των ειδών *Fusarium* με μορφολογικά χαρακτηριστικά, οι παραδοσιακές μοριακές μέθοδοι (πχ., *sequencing* και *random amplified polymorphic DNA analysis*)

είναι χρονοβόρες ή είναι επιρρεπείς σε λανθασμένα αποτελέσματα (*artifacts*) αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, νέες τεχνικές *PCR* έχουν περιγραφεί πρόσφατα με επιτυχή αποτελέσματα όπως η χρήση του συστήματος *Diversi Lab* το οποίο χρησιμοποιεί επαναλαμβανόμενη (*repetitive*) *PCR* (*rep-PCR*) με σκοπό τη διάκριση μεταξύ των διαφόρων ειδών *Fusarium* (182). Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για το χαρακτηρισμό της γονοτυπικής σχέσης (*genotypic relatedness*) στελεχών *Candida, Aspergillus, Dermatophytes, Zygomycetes* και *Mycobacterium* (182). Σε μια πρόσφατη μελέτη από τους *Healy* και συνεργάτες (182) η χρήση της τεχνικής *Diversi Lab* σε 26 στελέχη *Fusarium* (21 προερχόμενα από ασθενείς από το *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* και 5 στελέχη μάρτυρες από τη συλλογή είχε ως αποτέλεσμα τη γρήγορη και έγκυρη ταυτοποίηση τους όπως απεικονίζεται στο δενδρόγραμμα της *Εικόνας 28*.

4θ. Άλλες τεχνικές

Πρόσφατες μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει το παράγωγο του υφομύκητα *Fusarium* γκιββερελλίνη (*giberellin*) (183) ή αντισώματα φθορίζοντα με λεκτίνη (*lectin*) (184) για τη διάγνωση λοιμώξεων από *Fusarium* εμφανίζουν ενδιαφέρον αλλά απαιτείται επιβεβαίωση τους από περισσότερες μελέτες.

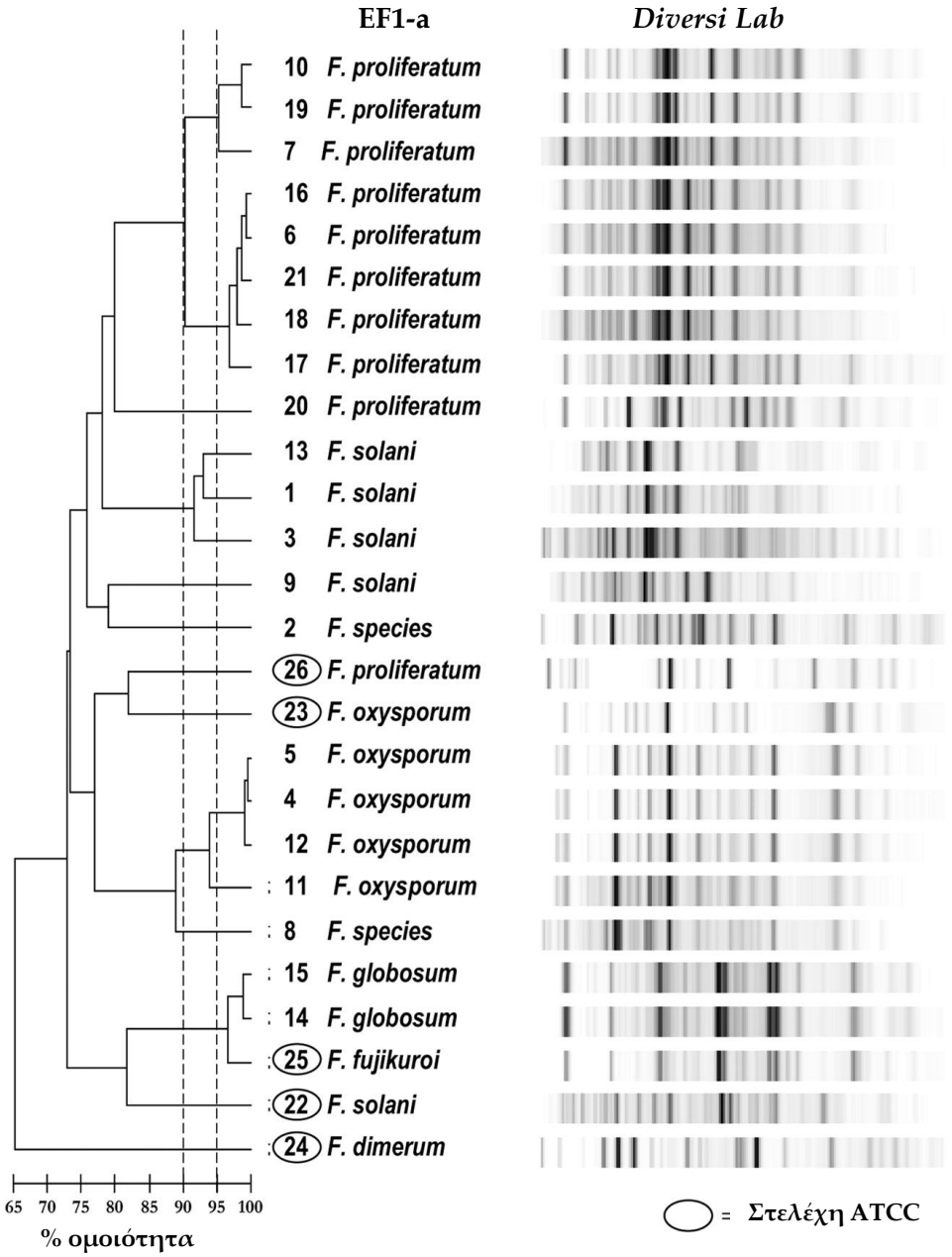
4ι. Διαφορές μεταξύ διηθητικής φουσαρίωσης και ασπεργίλλωσης

1. Θετικές αιμοκαλλιέργειες

Παρά τις κλινικές ομοιότητες της διηθητικής φουσαρίωσης και ασπεργίλλωσης που καθιστούν δύσκολο το διαχωρισμό τους, υπάρχουν και ορισμένα χαρακτηριστικά που όταν συναντώνται γέρνουν την πλάστιγγα της κλινικής υποψίας προς την πλευρά της διάγνωσης της διηθητικής φουσαρίωσης (*Πίνακας 5*). Πρώτα απ' όλα, ο υφομύκητας *Fusarium* συχνά απομονώνεται από το αίμα ασθενών σε περιπτώσεις διασπαρμένης νόσου, συνήθως κατά τις πρώτες ημέρες μετά την εμφάνιση πυρετού (185–187). Συγκεκριμένα, η αναφερόμενη συχνότητα θετικών αιμοκαλλιεργειών (*positive blood cultures*) σε περιπτώσεις διασπαρμένης φουσαρίωσης είναι περίπου 50 – 70% και η μυκηταιμία μπορεί να αποτελεί τη μοναδική εκδήλωση της λοίμωξης (185–187). Πράγματι, ο υφομύκητας *Fusarium* έχει αναγνωριστεί ως ο πιο συχνός υφομύκητας συνδυαζόμενος με πραγματική μυκηταιμία

(*true fungemia*) σε αποδέκτες μεταμόσχευσης του μυελού των οστών σε μια μελέτη από τη Βραζιλία (188).

Εικόνα 28. Το δενδρόγραμμα που απεικονίζει την ταυτοποίηση των 26 στελεχών *Fusarium* με βάση την τεχνική επαναλαμβανόμενης *PCR Diversi Lab*. Ο διαχωρισμός των ειδών έγινε με βάση την ταυτοποίηση του παράγοντα επιμύκηνσης άλφα 1 (EF1-a). Ομοιότητα 90% χρησιμόποιήθηκε ως διαχωριστική γραμμή για τα διάφορα είδη *Fusarium* ενώ διαφορά μεταξύ δύο στελεχών μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και μεταξύ στελεχών με 95% ομοιότητα.



Ενδιαφέρον επίσης έχει η μελέτη των *Hennequin* και συνερευνητών οι οποίοι έδειξαν ότι οι αιμοκαλλιέργειες *Fusarium* γίνονται θετικές πολύ γρηγορότερα αν το μέσο καλλιέργειας

που χρησιμοποιείται είναι ειδικό για μυκητιασικούς μικροοργανισμούς (π.χ., *Sabouraud*) σε αντίθεση με τη χρήση τυποποιημένων αερόβιων μέσων καλλιέργειας για βακτήρια (189). Το χαρακτηριστικό αυτό ήταν περισσότερο έκδηλο για τα στελέχη του είδους *Fusarium verticilloides* (189). Η ταχύτερη θετικοποίηση των αιμοκαλλιεργειών του υφομύκητα *Fusarium* χρησιμοποιώντας τα ειδικά αυτά μέσα καλλιέργειας μυκήτων έχει κλινική σημασία καθώς ο μύκητας είναι ανθεκτικός στα περισσότερα αντιμυκητιασικά φάρμακα και η έγκαιρη έναρξη κατάλληλης θεραπείας έχει αντίκτυπο στην καλύτερη πρόγνωση της λοίμωξης.

Το χαρακτηριστικό του υφομύκητα *Fusarium* να απομονώνεται συχνά σε αιμοκαλλιέργειες σε περιπτώσεις διασπαρμένης νόσου έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι στις περιπτώσεις διασπαρμένης ασπεργίλλωσης ή μουκορμύκωσης, η απομόνωση του υφομύκητα *Aspergillus* ή *Zygomycetes* αντίστοιχα από αιμοκαλλιέργειες είναι πάρα πολύ πιο σπάνια (190). Συγκεκριμένα, λιγότερες από 5% των περιπτώσεων διασπαρμένης ασπεργίλλωσης έχουν θετικές αιμοκαλλιέργειες και η ασπεργιλλαιμία (*aspergillemia*) τυπικά αποτελεί ένδειξη επιμόλυνσης του καλλιεργητικού υλικού (*contamination*) και όχι πραγματική λοίμωξη (190). Εξαίρεση στον κανόνα αυτό αποτελεί η απομόνωση του είδους *Aspergillus terreus* στο αίμα, καθώς αυτό το γεγονός συνήθως υποδεικνύει πραγματική λοίμωξη (190). Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι η μυκηταιμία από *Fusarium* εκδηλώνεται συνήθως νωρίς κατά την πορεία της διασπαρμένης νόσου, εν αντιθέσει με τη μυκηταιμία από *Aspergillus* η οποία εκδηλώνεται αρκετά αργά στην πορεία της λοίμωξης, είτε λίγες μέρες πριν το θάνατο του ασθενούς, είτε μεταθανάτια κατά τη διενέργεια νεκροψίας (185–188, 190).

Αυτή η υψηλή συχνότητα θετικών αιμοκαλλιεργειών του *Fusarium* θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα της παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων κονιδίων από τον υφομύκητα στους ιστούς, ένα χαρακτηριστικό το οποίο συναντάται πολύ συχνά σε λοιμώξεις από ζυμομύκητες (*yeasts*), αλλά όχι σε πολλούς παθογόνους υφομύκητες (8, 9). Εξαίρεση αυτού του κανόνα αποτελούν οι υφομύκητες *Acremonium*, *Paecilomyces* και *Scedosporium*, των οποίων οι διασπαρμένες λοιμώξεις επίσης συνδυάζονται με υψηλά ποσοστά απομόνωσης του εκάστοτε υφομύκητα από το αίμα, όπως συμβαίνει και με τον υφομύκητα *Fusarium* (8). Άλλοι ερευνητές έχουν προτείνει ότι η παραγωγή τοξινών ή κυκλοσπορίνης από τον υφομύκητα *Fusarium* έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή του ενδοθηλίου των αγγείων και την ευκολότερη πρόσβαση των κονιδίων του *Fusarium* στην αιματική κυκλοφορία (111–113).

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι εκτός από την απομόνωση του από το αίμα, ο υφομύκητας *Fusarium* μπορεί επίσης να απομονωθεί και στα ούρα ασθενών με διασπαρμένη φουσαρίωση (191).

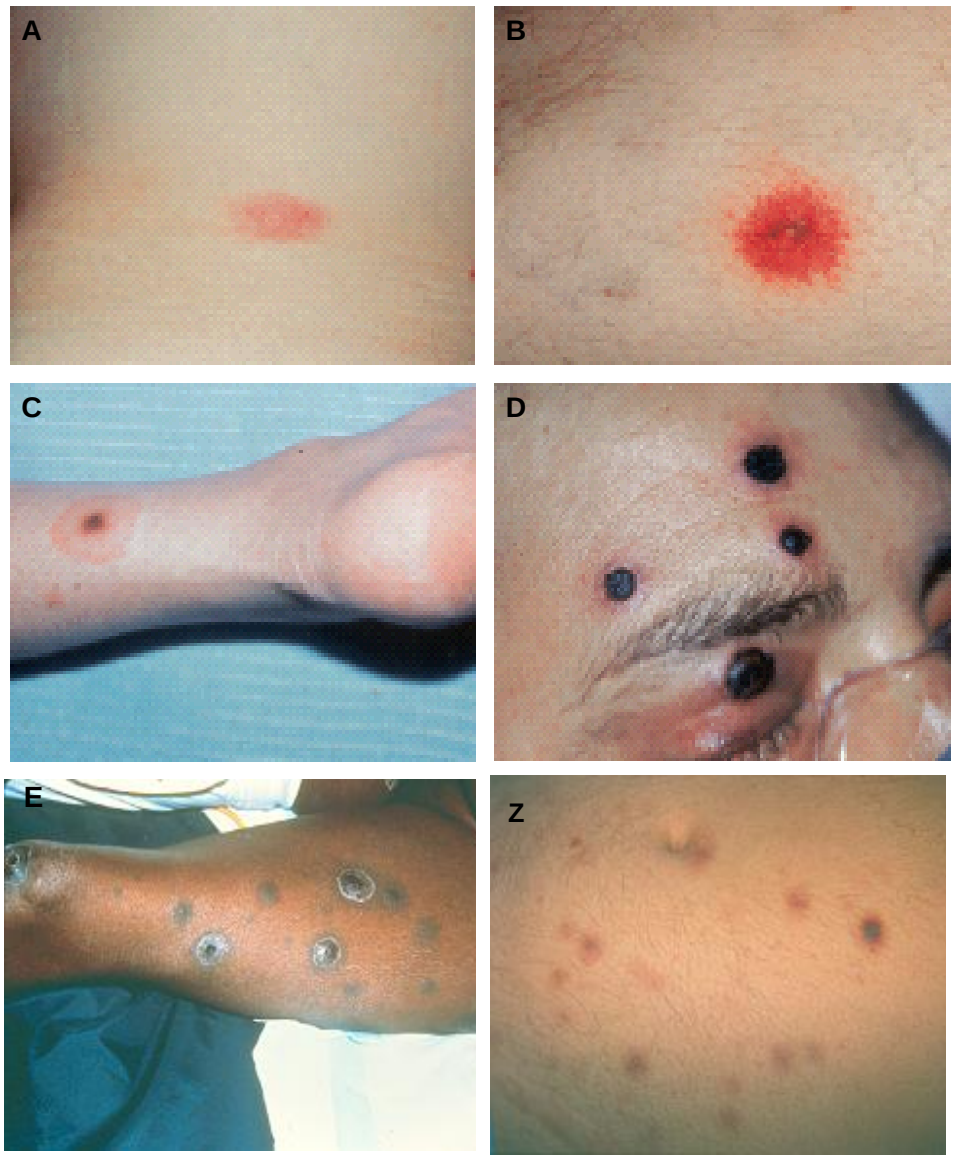
2. Δερματική συμμετοχή

Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που συναντάται στη διηθητική φουσαρίωση είναι το υψηλό ποσοστό (50 – 70%) εμφάνισης δερματικών βλαβών σε περιπτώσεις διασπαρμένης λοίμωξης (9, 10, 192–197). Αυτό το χαρακτηριστικό έρχεται επίσης σε αντίθεση με το χαμηλό ποσοστό δερματικών βλαβών που παρατηρείται σε περιπτώσεις διασπαρμένης ασπεργίλλωσης (< 10%) (5). Μάλιστα, δεν είναι σπάνιο το γεγονός οι δερματικές αυτές αλλοιώσεις να είναι και η μοναδική εκδήλωση της διηθητικής φουσαρίωσης βάσει της οποίας μπορεί να επιτευχθεί η διάγνωση της λοίμωξης (192–197). Σε μια μελέτη από τους *Nucci* και συνερευνητές (198) μάλιστα, το ποσοστό των ασθενών με διηθητική φουσαρίωση που είχαν δερματικές βλάβες ως το μοναδικό υλικό για την εγκατάσταση της διάγνωσης ήταν 55%. Σε εκείνη τη μελέτη, οι δερματικές βλάβες εμφανίστηκαν τις περισσότερες φορές πριν από την εκδήλωση μυκηταιμίας από τον υφομύκητα *Fusarium* με μέσο όρο 5 ημέρες πριν τη μυκηταιμία (εύρος 1 – 10 ημέρες), αν και υπήρχαν περιπτώσεις κατά τις οποίες οι δερματικές αλλοιώσεις εμφανίστηκαν ακόμα και 13 ημέρες μετά τη θετικοποίηση των αιμοκαλλιεργειών (198). Επιπρόσθετα, η ύπαρξη διασπαρμένων δερματικών βλαβών ήταν συσχετισμένη με υψηλό ποσοστό θετικών αιμοκαλλιεργειών (~ 60%) σε αντίθεση με τις περιπτώσεις με εντοπισμένες μόνο δερματικές βλάβες στις οποίες η συχνότητα μυκητιαμίας ήταν πάρα πολύ μικρή (198). Η ύπαρξη ουδετεροπενίας επίσης αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης δερματικών βλαβών σε σχέση με μη ουδετεροπενικούς ασθενείς (198). Η παθογένεση της προδιάθεσης για δερματική διήθηση από τον υφομύκητα *Fusarium* ίσως να σχετίζεται με την παραγωγή τοξινών. Συγκεκριμένα, η επαφή τοξίνης T-2, φουσαρενόνης, βουτενολίδης ή διακετόξυσιρπενόλης με το δέρμα πειραματόζωων είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ερυθήματος και πάχυνσης του δέρματος (199).

Διάφορες δερματικές εκδηλώσεις είναι δυνατόν να παρατηρηθούν σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση: υποδερματικοί όζοι (*subcutaneous nodules*), ψηλαφητή ή μη ψηλαφητή πορφύρα (*purpura*), ερυθρές ή γκριζόχρωμες κηλίδες (*macules*), ερυθρές ή

γκριζόχρωμες βλατίδες (*papules*), κηλίδες ή βλατίδες με προοδευτική ανάπτυξη κεντρικής νέκρωσης (*central necrosis*), φυσαλίδες (*blisters*), φλύκταινες (*pustules*) ή αιμορραγικές φυσαλιδώδεις βλάβες (10, 194–198). Οι πιο χαρακτηριστικές δερματικές βλάβες της διασπαρμένης φουσαρίωσης είναι οι βλάβες "γαγγραινώδους εκθύματος" (*ecthyma gangrenosum*), οι οποίες είναι ερυθρές ή γκριζόχρωμες κηλίδες με κεντρική εξέλκωση (*ulceration*) ή μαύρη εσχάρα (*eschar*) (*Εικόνα 29*) (200).

Εικόνα 29. Δερματικές βλάβες *Fusarium* σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με λευχαιμία



Οι δερματικές βλάβες από *Fusarium* είναι συνήθως επώδυνες, ιδιαίτερα οι υποδερματικοί όζοι, και παρότι μπορούν να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος, εμφανίζουν μια τάση να εκδηλώνονται συνήθως στα άκρα (194–198). Οι

περισσότεροι ασθενείς έχουν βλάβες σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης, ενώ ο αριθμός των δερματικών βλαβών ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό (194–198). Παράλληλη μυϊκή διήθηση είναι επίσης πολύ συχνή και εκδηλώνεται κλινικά με την εμφάνιση μυαλγιών (*myalgias*) (8–10, 194–198).

Εκτός από τη μεγαλύτερη συχνότητα δερματικών βλαβών σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση, οι δερματικές βλάβες που συναντώνται στη διηθητική φουσαρίωση είναι παράλληλα και διαφορετικές από αυτές που παρατηρούνται σε ασθενείς με διηθητική ασπεργίλλωση (*Εικόνα 30*). Συγκεκριμένα, οι ασπεργιλλικές δερματικές βλάβες τείνουν να είναι λιγότερες σε αριθμό, μεγαλύτερες σε μέγεθος (2 – 3 εκατοστά εν αντιθέσει με το 1 εκατοστό των βλαβών από *Fusarium*) και είναι λιγότερο διασπαρμένες στο σώμα. Συνήθως αποτελούν μια κεντρική μαύρη εσχάρα με μια λεπτή περιφερική ερυθηματώδη άλω (*erythematous halo*) (*Εικόνα 30*) (192, 193).

Επιπρόσθετα, οι δερματικές βλάβες σε ασθενείς με ακέραιο ανοσοποιητικό σύστημα και δερματική φουσαρίωση είναι διαφορετικές από αυτές που παρατηρούνται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με τη λοίμωξη (198). Συγκεκριμένα, οι βλάβες σε ασθενείς με ακέραιο ανοσοποιητικό σύστημα είναι λιγότερες σε αριθμό και εντοπισμένες, ανταποκρίνονται πιο εύκολα σε αντιμυκητιασική αγωγή, ενώ τυπικά εκδηλώνονται μετά από διαταραχή της συνέχειας της επιδερμίδας όπως για παράδειγμα μετά από τραύμα, μυκητίαση των νυχιών ή δήγμα εντόμων (198, 201). Τέλος, παρουσιάζουν διαφορετική ιστοπαθολογική εικόνα σε σχέση με τις δερματικές βλάβες ανοσοκατασταλμένων ασθενών με διηθητική φουσαρίωση. Συγκεκριμένα, ασθενείς με ακεραίο ανοσοποιητικό σύστημα εμφανίζουν βλάβες με σημαντική παρουσία φλεγμονής, εκτεταμένη διήθηση από ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα και ελάχιστη παρουσία υφών *Fusarium*, εν αντιθέσει με τη σημαντική παρουσία νέκρωσης και διήθησης αγγείων, εκτεταμένης παρουσίας υφών *Fusarium* και απουσίας φλεγμονής και διήθησης από ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με δερματική φουσαρίωση (9, 198).

Πάντως, εξαιρέσεις στον παραπάνω κανόνα υπάρχουν όπως έχει αναφερθεί από τους *Assaf* και συνερευνητές (202) οι οποίοι περιέγραψαν πρόσφατα έναν ασθενή με ακέραιο ανοσοποιητικό σύστημα ο οποίος ανέπτυξε δερματική φουσαρίωση με ερυθηματώδεις πλάκες (*plaques*) στο πρόσωπο με βαθιά διήθηση στις δερματικές υποστοιβάδες οι οποίες δεν ανταποκρίθηκαν εγκαίρως σε κατάλληλη αντιμυκητιασική αγωγή.

Εικόνα 30. Δερματική βλάβη από *Aspergillus* σε ασθενή με μεταμόσχευση μυελού των οστών

5. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΥΦΟΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM* ΣΕ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ – ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΗΣ ΦΟΥΣΑΡΙΩΣΗΣ

5α. Εισαγωγή

Ο υφομύκητας *Fusarium* είναι από τους πιο ανθεκτικούς μύκητες στο οπλοστάσιο των σύγχρονων αντιμυκητιασικών φαρμάκων (*Πίνακας 6*) (8–10). Το είδος *Fusarium solani* συγκεκριμένα αποτελεί το πιο ανθεκτικό είδος του γένους *Fusarium* (9). Οι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για αυτή την ανθεκτικότητα δεν έχουν όμως πλήρως εξακριβωθεί ακόμα (203). Εξαιτίας της έμφυτης ανθεκτικότητας του υφομύκητα στα σύγχρονα αντιμυκητιασικά φάρμακα και την εξαιρετικά σοβαρή έκπτωση των ανοσοποιητικών μηχανισμών των ασθενών που συνήθως αναπτύσσουν διηθητική φουσαρίωση, οι θεραπευτικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση της διηθητικής φουσαρίωσης σε βαρέως ανοσοκατασταλμένους ασθενείς είναι προβληματικές (8–10).

Επιπλέον, οι μικροβιολογικές μέθοδοι για την αξιολόγηση της *in vitro* ευαισθησίας των υφομυκήτων (συμπεριλαμβανομένου του *Fusarium*) στα αντιμυκητιασικά φάρμακα δεν είναι απόλυτα τυποποιημένες και δεν είναι ξεκάθαρο αν τα αποτελέσματα τους σχετίζονται με την κλινική έκβαση και πρόγνωση της λοίμωξης (204). Το ίδιο πρόβλημα υφίσταται και στη διηθητική ασπεργίλλωση όπου το ερώτημα της συσχέτισης μεταξύ της *in vitro* ευαισθησίας του υφομύκητα *Aspergillus* στα διάφορα αντιμυκητιασικά φάρμακα με την πρόγνωση της λοίμωξης έχει εξεταστεί σε αρκετές μελέτες οι οποίες είχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα (205–209).

Παράλληλα, επειδή η διηθητική φουσαρίωση είναι σχετικά σπάνια, η μεγαλύτερη εμπειρία όσον αφορά τη θεραπεία της λοίμωξης αυτής προέρχεται από δημοσιεύσεις μικρών σειρών (*case series*) με κλινικές περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης, οι περισσότερες από τις οποίες δεν έχουν λάβει υπόψη σοβαρές παραμέτρους για την έκβαση της λοίμωξης όπως είναι η αποκατάσταση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η θεραπεία της φουσαρίωσης να μην είναι απολύτως επιστημονικά εμπεριστατωμένη και να εξατομικεύεται ανάλογα με την κατάσταση και την κλινική εικόνα του κάθε ασθενή (8, 9). Ο *Πίνακας 7* παρουσιάζει συνοπτικά τις διαφωνίες στην επιστημονική κοινότητα όσον αφορά την ορθή θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης ενώ

στον *Πίνακα 8* συνοψίζονται οι βασικές αρχές της αντιμετώπισης της ευκαιριακής αυτής μυκητιασικής λοίμωξης.

Πίνακας 6. Σύνοψη αντιμυκητιασικών φαρμάκων ή πειραματικών ουσιών (ή συνδυασμού τους) ανάλογα με τη δραστικότητα τους έναντι του υφομύκητα *Fusarium* με βάση *in vitro* και *in vivo* μικροβιολογικές μεθόδους ή σε ασθενείς με φουσαρίωση

Δραστικά	**Μη δραστικά**	**Πιθανή δραστικότητα**
Αμφοτερικίνη Β	5-φλουκυτοσίνη	Αζασορδαρίνες
Βορικοναζόλη	Κετοκοναζόλη Κλοτριμαζόλη	Αναστολείς ξυλανάσης και ασπαρτικής πρωτεάσης
Ραβουκοναζόλη	Μικοναζόλη	Κεκροπίνη Α
Ποσακοναζόλη	Τεβουκοναζόλη	Ν-ακετυλκυστεϊνη
CS-758 (πειραματική τριαζόλη)	Εκοναζόλη	Συριγκομυκίνη Ε
UR-9825 (πειραματική τριαζόλη)	Μπιφοναζόλη	Κοξιδίνη
Ναταμυκίνη	Φλουκοναζόλη	Αναστολείς θρυψίνης
Νυστατίνη	Ιτρακοναζόλη	Φυτικά έλαια από *Eucalyptus*
Τερβιναφίνη	ER 30346 (πειραματική τριαζόλη)	Αμιδικές ουσίες
Αμφοτερικίνη Β + αζιθρομυκίνη	Νικκομυκίνη Ζ	Γκριφολίνη
Αμφοτερικίνη Β + ριφαμπικίνη	Κασποφουγκίνη	
Αμφοτερικίνη Β + κασποφουγκίνη	Μικαφουγκίνη	
Αμφοτερικίνη Β + τερβιναφίνη	Ανιδουλαφουγκίνη	
Αμφοτερικίνη Β + βορικοναζόλη	BMS 181184 (πραδιμικίνη)	

5β. Αμφοτερικίνη Β

Ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας της διηθητικής φουσαρίωσης τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες έχει υπάρξει παραδοσιακά η χρησιμοποίηση της δεοξυχολικής αμφοτερικίνης Β (*amphotericin B deoxycholate*) (8–24). Όμως, η ευαισθησία του υφομύκητα *Fusarium in vitro* έναντι της αμφοτερικίνης Β απέχει πολύ από το να χαρακτηριστεί ικανοποιητική. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες ερευνητικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (*minimal inhibitory concentration; MIC*) της

αμφοτερικίνης Β έναντι στελεχών *Fusarium* είναι μεγαλύτερη από 1 μg/ml (210–213). Έτσι, αυτές οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης είναι μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις αμφοτερικίνης Β που μπορούν να επιτευχθούν στους πνεύμονες ασθενών (0.5 μg/ml) μετά από τη χορήγηση συνηθισμένων ενδοφλέβιων δόσεων αμφοτερικίνης Β (0.5 – 1 mg/kg ημερησίως) (214). Είναι πάντως αβέβαιο όπως αναφέρθηκε παραπάνω αν η *in vitro* ευαισθησία του *Fusarium* μπορεί από μόνη να προδιαγράψει την πρόγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης, καθώς άλλοι παράγοντες όπως η έγκαιρη αποκατάσταση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων αποτελούν πολύ καθοριστικούς προγνωστικούς παράγοντες της λοίμωξης αυτής (8, 25, 26).

Πίνακας 7. Αναπάντητα ερωτήματα στη θεραπεία της φουσαρίωσης
Ποιος είναι ο ρόλος της βορικοναζόλης ως αρχικής θεραπείας στη διηθητική φουσαρίωση;
Ποιος είναι ο ρόλος και ποια η καλύτερη δόση των λιποσωμικών μορφών της αμφοτερικίνης Β ως αρχικής θεραπείας στη διηθητική φουσαρίωση;
Ποια είναι η πιο οικονομικά συμφέρουσα λιποσωμική μορφή της αμφοτερικίνης Β για τη θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης;
Είναι η χρήση υψηλών δόσεων αμφοτερικίνης Β πιο σημαντική από τη συνολική αθροιζόμενη δόση της αμφοτερικίνης Β;
Ποιος θα είναι ο μελλοντικός ρόλος των νέων πειραματικών τριαζολών (π.χ., ποσακοναζόλη) στη θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης;
Ποιος θα είναι ο μελλοντικός ρόλος της χρήσης συνδυασμού αντιμυκητιασικής θεραπείας στη διηθητική φουσαρίωση (π.χ., αμφοτερικίνη Β με βορικοναζόλη ή κασποφουγκίνη);
Έχει η ταυτοποίηση του είδους *Fusarium* (π.χ., *Fusarium solani*) ρόλο στην πρόγνωση της λοίμωξης;
Ποιος είναι ο ρόλος του προσδιορισμού της *in vitro* ευαισθησίας του υφομύκητα *Fusarium* στα διάφορα αντιμυκητιασικά φάρμακα;
Ποιος θα είναι ο ρόλος των ανοσοδιαμορφωτικών θεραπειών στην αντιμετώπιση της διηθητικής φουραρίωσης;
Υπάρχει αποτελεσματική προφύλαξη έναντι της εκδήλωσης της διηθητικής φουσαρίωσης;
Ποιος είναι ο ρόλος της διενέργειας συμπληρωματικής εγχείρησης στη θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης;

Πίνακας 8. Σύνοψη των βασικών αρχών αντιμετώπισης της διηθητικής φουσαρίωσης
Έγκαιρη έναρξη επιθετικής αντιμυκητιασικής θεραπείας με υψηλές δόσεις αμφοτερικίνης Β
Σε περίπτωση μη ανταπόκρισης ή αποτυχίας του παραπάνω θεραπευτικού σχήματος γρήγορη εναλλαγή σε ή προσθήκη τριαζόλης ευρέως-φάσματος (π.χ., βορικοναζόλη) με επιβεβαιωμένη προκλινική και κλινική δραστικότητα έναντι του υφομύκητα *Fusarium*
Έγκαιρη ελάττωση της δόσης των χορηγούμενων κορτικοστεροειδών, εφόσον είναι δυνατόν
Πιθανή χορήγηση μεταγγίσεων με ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα
Μακρά διάρκεια αντιμυκητιασικής θεραπείας η οποία πρέπει να εξατομικεύεται
Απομάκρυνση του κεντρικού φλεβικού καθετήρα σε περιπτώσεις μυκηταιμίας προερχόμενης από τον καθετήρα
Χειρουργική αφαίρεση νεκρωτικών ιστών σε περιπτώσεις εντοπισμένων λοιμώξεων (π.χ., ονυχομύκωση, ιγμορίτιδα, απόστημα)

Η δραστικότητα της αμφοτερικίνης Β σε πειραματικά μοντέλα ζώων με διηθητική φουσαρίωση είναι επίσης περιορισμένη. Μάλιστα, μόνο πολύ υψηλές δόσεις λιποσωμικής αμφοτερικίνης Β (*liposomal amphotericin B*) έχει δειχθεί να έχουν δραστικότητα σε ποντίκια με ακέραιο ανοσοποιητικό σύστημα που είχαν μολυνθεί ενδοφλέβια από τον υφομύκητα *Fusarium* (215). Συγκεκριμένα, η χορήγηση 10 – 20 mg/kg λιποσωμικής αμφοτερικίνης Β ημερησίως είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική ελάττωση του εύρους διήθησης από τον μύκητα στο ήπαρ και το σπλήνα ποντικών που είχαν μολυνθεί με ένα στέλεχος *Fusarium verticilloides* (215). Αντίθετα, η δεοξυχολική αμφοτερικίνη Β δεν είχε καμιά δραστικότητα σε άλλα πειραματικά μοντέλα διηθητικής φουσαρίωσης με έκπτωση του ανοσοποιητικού συστήματος (216). Προς το παρόν πάντως, εξαιτίας της έλλειψης άλλων αξιόπιστων θεραπευτικών επιλογών, υψηλές δόσεις αμφοτερικίνης Β αποτελούν τη θεραπεία εκλογής για τη διηθητική φουσαρίωση στην κλινική πράξη (8–10).

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι με την εισαγωγή στην κλινική πράξη των λιποσωμικών μορφών της αμφοτερικίνης Β, η χρησιμοποίηση υψηλών δόσεων του φαρμάκου είναι τώρα εφικτή με περιορισμό της νεφροτοξικότητας σε σχέση με τη χρήση της δεοξυχολικής αμφοτερικίνης Β παλιότερα (217). Η *in vitro* ευαισθησία του υφομύκητα *Fusarium* στη λιποσωμική αμφοτερικίνη Β και στη δεοξυχολική μορφή της είναι παρόμοιες (218). Όμως, υπάρχουν αναφορές για καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα έναντι της διηθητικής φουσαρίωσης με τη χρήση τέτοιων υψηλών δόσεων λιποσωμικών μορφών της

αμφοτερικίνης Β (219–221). Συγκεκριμένα, οι *Walsh* και συνερευνητές (222) έδειξαν ότι η θνητότητα ασθενών με διηθητική φουσαρίωση οι οποίοι έλαβαν υψηλές δόσεις αμφοτερικίνης Β (> 5 mg/kg *amphotericin B lipid complex* ημερησίως) ήταν σημαντικά χαμηλότερη (30%) σε σχέση με τη θνητότητα ασθενών οι οποίοι έλαβαν συνήθεις χαμηλότερες δόσεις αμφοτερικίνης Β (> 75%). Όμως, η μη καταγραφή και αξιολόγηση άλλων παραγόντων οι οποίοι είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την πρόγνωση της διηθητικής φουσαρίωσης όπως είναι η αποκατάσταση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, δεν επιτρέπει την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων για τη δραστικότητα του συγκεκριμένου θεραπευτικού σχήματος (222). Επίσης, ο *Perfect* (223) επεξεργάστηκε τα στοιχεία της βάσης δεδομένων *CLEAR* (*Collaborative Exchange of Antifungal Research*) και ανέφερε ότι η ανταπόκριση 26 ασθενών με διηθητική φουσαρίωση στην αμφοτερικίνη Β *lipid complex* ήταν 46% (223).

Πάντως, ανησυχητικό γεγονός αποτελεί ότι πρόσφατες φαρμακοδυναμικές (*pharmacodynamic*) μελέτες έχουν δείξει ότι εξαιτίας του ότι η αμφοτερικίνη Β είναι εξαιρετικά λιπόφιλη (*lipophilic*) ουσία και συνδέεται εκτεταμένα με πρωτεΐνες στο πλάσμα και τους ιστούς, η μεγαλύτερη δυνατή εφικτή συγκέντρωση ελεύθερης αμφοτερικίνης Β στους ιστούς δε μπορεί να ξεπεράσει τα 0.7 μg/ml, ακόμα και με τις μεγαλύτερες χρησιμοποιούμενες δόσεις αμφοτερικίνης Β (224, 225). Ως εκ τούτου, είναι αβέβαιο κατά πόσο αυξάνοντας τη δόση της χορηγούμενης αμφοτερικίνης Β μεταφράζεται σε ανάλογη αύξηση της ελεύθερης δραστικής συγκέντρωσης του φαρμάκου που μπορεί να επιτευχθεί στους ιστούς (225).

5γ. Ναταμυκίνη και θεραπεία κερατίτιδας από τον υφομύκητα *Fusarium*

Η ναταμυκίνη είναι επίσης δραστική έναντι του υφομύκητα *Fusarium* τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (*Πίνακας 6*) (213, 226). Μάλιστα, η ναταμυκίνη χρησιμοποιούμενη τοπικά σε συγκέντρωση 5% (227, 228) σε συνδυασμό με την χορήγηση τοπικής (διάλυμα 0.15 – 0.3% ή αλοιφή 0.2 – 0.5%) (229) ή συστηματικής (0.1 mg/ml σε διάλυμα 5% δεξτρόζης) (230) αμφοτερικίνης Β αποτελεί τη θεραπεία εκλογής για την αντιμετώπιση της κερατίτιδας και ενδοφθαλμίτιδας από τον υφομύκητα *Fusarium*. Όμως, η σημαντική τοξικότητα της ναταμυκίνης αποκλείει την ευρεία χρησιμοποίηση της δια της συστηματικής οδού (231).

Η κερατίτιδα από *Fusarium* αποτελεί τη πιο συχνή αιτία μυκητιασικής κερατίτιδας παγκοσμίως (232–234). Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη 391 περιπτώσεων λοιμώδους κερατίτιδας από την Ταϋλάνδη, οι 34 περιπτώσεις (12%) ήταν μυκητιασικές σε αιτιολογία και ο υφομύκητας *Fusarium* ήταν ο πιο συχνός μύκητας (234). Η προσθήκη ιμιδαζολών (*imidazoles*) όπως η μικοναζόλη (*miconazole*) (235), η κλοτριμαζόλη (*clotrimazole*) (236) και η κετοκοναζόλη (*ketoconazole*) (237) ή ιτρακοναζόλη (*itraconazole*) (238) στην παραπάνω τοπική θεραπεία έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη σε περιπτώσεις μη ικανοποιητικής ανταπόκρισης στην αρχική θεραπεία. Επίσης, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει συνεργικά (*synergistic*) αποτελέσματα από τη χρήση ναταμυκίνης με ριφαμπικίνη (*rifampin*) ή γενταμυκίνη (*gentamycin*) (239). Επίσης, για την θεραπεία της κερατίτιδας από *Fusarium* η τοπική χρήση γλυκονικής χλωρεξιδίνης (*chlorhexidine gluconate*) (240), πολυεξαμεθυλενικής διγουανίδης (*polyhexamethylene biguanide*) (241) ή σουλφαδιαζίνης (*silver sulfadiazine*) (242) έχουν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για την καλύτερη αξιολόγηση της δραστικότητας τους έναντι της τοπικής αυτής λοίμωξης.

Σε επιλεγμένους ασθενείς στους οποίους έχουν αποτύχει τα παραπάνω θεραπευτικά σχήματα, άλλες εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές έχουν προταθεί. Για παράδειγμα, ένας ασθενής με κερατίτιδα από *Fusarium solani* ο οποίος δεν είχε ανταποκριθεί σε συνδυασμό συστηματικής (αμφοτερικίνη Β και κετοκοναζόλη) και τοπικής (αμφοτερικίνη Β και ναταμυκίνη) αντιμυκητιασικής θεραπείας και είχε αναπτύξει ενδοφθαλμίτιδα, ανταποκρίθηκε σε υψηλές δόσεις συστηματικής αμφοτερικίνης Β *lipid complex* (συνολική δόση: 8.79 γραμμάρια) (243). Επίσης, αυξανόμενες περιπτώσεις κερατίτιδας και ενδοφθαλμίτιδας από *Fusarium* που απέτυχαν να ανταποκριθούν σε αρχική θεραπεία με αμφοτερικίνη Β (με ή χωρίς ιτρακοναζόλη) και έχουν ανταποκριθεί σε τοπική και/ή συστηματική αγωγή με βορικοναζόλη (*voriconazole*) έχουν πρόσφατα αναφερθεί (244–247), επιβεβαιώνοντας τις αρχικές φαρμακοκινητικές (*pharmacokinetic*) μελέτες οι οποίες έχουν δείξει την επίτευξη θεραπευτικών επιπέδων βορικοναζόλης στον οφθαλμό ασθενών μετά από τη χορήγηση φαρμακολογικών δόσεων του φαρμάκου (248). Επιπλέον, ένας άλλος ασθενής στον οποίο απέτυχε η θεραπεία με αμφοτερικίνη Β και ναταμυκίνη ανταποκρίθηκε σε συνδυασμό συστηματικής και τοπικής ποσακοναζόλης (*posaconazole*) (249).

Αφαίρεση του υαλοειδούς σώματος (*vitrectomy*) με τοπική ενδοϋαλοειδική (*intravitreous*) έγχυση και συστηματική χορήγηση αμφοτερικίνης Β και 5-φλουοροκυτοσίνης έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ενδοφθαλμίτιδας από *Fusarium* με ποικίλα αποτελέσματα (250). Επίσης, επέμβαση με κερατεκτομή (*keratectomy*) (251) ή κερατοπλαστική (*keratoplasty*) (126) χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που δεν έχουν ανταποκριθεί σε συντηρητική αντιμυκητιασική αγωγή. Τέλος, άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι σε ασθενείς με κερατίτιδα από *Fusarium* στους οποίους πριν την εγκατάσταση της διάγνωσης είχε δοθεί εμπειρική θεραπεία με αντιβακτηριακά αντιβιοτικά και τοπικά κορτικοστεροειδή, δε θα πρέπει να διακόπτεται η χορήγηση των τοπικών κορτικοστεροειδών απότομα διότι υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης σημαντικής οξείας φλεγμονής στον κερατοειδή χιτώνα με αποτέλεσμα τη νέκρωση του (252).

5δ. Νυστατίνη

Η νυστατίνη (*nystatin*), ένα άλλο πολυενικό αντιβιοτικό (*polyene*), έχει δειχθεί να είναι αποτελεσματική στην αναχαίτιση της επέκτασης της διηθητικής φουσαρίωσης σε παιδιατρικούς ασθενείς με σοβαρά εγκαύματα όταν χρησιμοποιείται τοπικά με τη μορφή σκόνης (*powder*) σε πολύ υψηλή συγκέντρωση (6 x 10^6 μονάδες ανά γραμμάριο) (253). Όμως, όπως συμβαίνει και με τη ναταμυκίνη, και αυτό το πολυενικό αντιβιοτικό έχει σημαντική τοξικότητα η οποία αποτρέπει την ευρεία χρήση του δια της συστηματικής οδού (254). Με την εισαγωγή της λιποσωμικής νυστατίνης (*liposomal nystatin*) στην κλινική πράξη, η οποία ελαχιστοποιεί αυτό το πρόβλημα της τοξικότητας (254), προοπτικές μελέτες που θα αξιολογούσαν τη δραστικότητα της πολυενικής αυτής ουσίας, είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλα αντιμυκητιασικά φάρμακα έναντι της διηθητικής φουσαρίωσης θα είχαν ενδιαφέρον. Πάντως, μια πρόσφατη μελέτη της χρήσης λιποσωμικής νυστατίνης σε ασθενείς με διηθητική ασπεργίλλωση οι οποίοι απέτυχαν να ανταποκριθούν σε προηγούμενη θεραπεία με αμφοτερικίνη Β έδειξε ανταπόκριση στη θεραπεία σε 7 από τους 25 (28%) ασθενείς που συμμετείχαν στη συγκεκριμένη μελέτη (255). Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη από την Ελλάδα εξέτασε τη δραστικότητα διαφόρων πολυμερών νυστατίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium oxysporum* και βρήκε διαφορές στη δραστικότητα των πολυμερών νυστατίνης ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (256).

5ε. Αζόλες

Οι αζόλες κετοκοναζόλη, κλοτριμαζόλη, μπιφοναζόλη (*bifonazole*), τεβουκοναζόλη (*tebuconazole*), εκοναζόλη (*econazole*), μικοναζόλη, φλουκοναζόλη (*fluconazole*) και ιτρακοναζόλη δεν έχουν σημαντική *in vitro* δραστικότητα έναντι του υφομύκητα *Fusarium* (*Πίνακας 6*) (210–213, 257–259). Η μοναδική περίπτωση στην οποία η φλουκοναζόλη έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη θεραπεία κάποιας λοίμωξης από τον υφομύκητα *Fusarium* στην κλινική πράξη είναι σε μια περίπτωση ονυχομύκωσης (260). Αντίστοιχα, οι μοναδικές περιπτώσεις στις οποίες η ιτρακοναζόλη έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη θεραπεία κάποιας λοίμωξης από τον υφομύκητα *Fusarium* στην κλινική πράξη είναι σε ορισμένες περιπτώσεις μυκετώματος (261, 262) όπως επίσης και σε περιπτώσεις κερατίτιδας από *Fusarium* τοπικά σε συνδυασμό με ναταμυκίνη ή αμφοτερικίνη Β όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (238).

Όμως, οι νεότερες ευρέως-φάσματος τριαζόλες βορικοναζόλη, ποσακοναζόλη και ραβουκοναζόλη (*ravuconazole*) έχουν κάποια δραστικότητα έναντι του υφομύκητα *Fusarium in vitro* και έχουν δημιουργήσει αρκετές ελπίδες για την καλύτερη αντιμετώπιση της θανατηφόρου αυτής ευκαιριακής λοίμωξης (263–271). Μεταξύ των νέων αυτών τριαζολών, η βορικοναζόλη εγκρίθηκε πρόσφατα από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων [(*United States Food and Drug Administration (FDA*)] για τη θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης η οποία δεν έχει ανταποκριθεί στην πρώτη γραμμή αντιμυκητιασικής θεραπείας με αμφοτερικίνη Β. Η βορικοναζόλη έχει τη μεγαλύτερη δραστικότητα *in vitro* έναντι του *Fusarium* σε σχέση με τις υπόλοιπες τριαζόλες. Όμως, η δραστικότητα αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του στελέχους του υφομύκητα *Fusarium*. Έτσι, η βορικοναζόλη έχει μεγαλύτερη μυκητοκτόνο (*fungicidal*) δράση έναντι στελεχών τα οποία δεν είναι *Fusarium solani*, ενώ έχει μικρότερη μυκητοστατική (*fungistatic*) δράση έναντι των στελεχών *Fusarium solani* (263, 264, 271). Ως αποτέλεσμα, συνολικά, η βορικοναζόλη δεν έχει ανώτερη *in vitro* δραστικότητα από ότι η αμφοτερικίνη Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium*, ειδικά έναντι στελεχών του είδους *Fusarium solani*.

Εκτός από τη δραστικότητα της *in vitro* έναντι του υφομύκητα, η βορικοναζόλη έχει δειχθεί να έχει δραστικότητα και *in vivo* σε πειραματικά μοντέλα ζώων με διηθητική φουσαρίωση (272). Επιπρόσθετα, ο *Perfect* και συνερευνητές (273) εδειξαν ότι η χρήση βορικοναζόλης είχε ως αποτέλεσμα την ανταπόκριση στη θεραπεία σε 5 από τους 11 (45%)

ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση οι οποίοι δεν είχαν ανταποκριθεί ή δε μπόρεσαν να ανεχθούν (λόγω παρενεργειών) την πρότερη αντιμυκητιασική θεραπεία εκλογής με αμφοτερικίνη Β. Μάλιστα, το 71% ποσοστό επιβίωσης στις 90 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας στους ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση οι οποίοι έλαβαν βορικοναζόλη σε εκείνη τη μελέτη (273) είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό αν λάβει κανείς υπόψη το αντίστοιχο ποσοστό επιβίωσης στις 90 ημέρες μετά την έναρξη θεραπείας που ήταν 29% σε ασθενείς με φουσαρίωση που έλαβαν θεραπευτικά σχήματα βασιζόμενα στην αμφοτερικίνη Β στο *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* (10, 25). Ένα άλλο πλεονέκτημα της χρήσης της βορικοναζόλης σε εκείνη τη μελέτη ήταν η μικρή συχνότητα σημαντικών παρενεργειών από τη αντιμυκητιασική θεραπεία. Επιπρόσθετα, η βορικοναζόλη είχε πρόσφατα αναφερθεί ότι ήταν δραστική και σε έναν παρατεταμένα ουδετεροπενικό ασθενή με λευχαιμία ο οποίος δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία με αμφοτερικίνη Β (274). Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας με βορικοναζόλη μάλιστα, δεν παρατηρήθηκαν υποτροπές της λοίμωξης κατά τους επόμενους κύκλους χημειοθεραπείας και ουδετεροπενίας του συγκεκριμένου ασθενή (274). Από την άλλη πλευρά όμως, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης σε ασθενείς οι οποίοι ήδη λάμβαναν προφύλαξη με βορικοναζόλη (137).

Η ποσακοναζόλη, μια πειραματική ευρέως-φάσματος τριαζόλη, είναι επίσης δραστική τόσο *in vitro* έναντι του υφομύκητα *Fusarium* όσο και *in vivo* σε πειραματικά μοντέλα ζώων και ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση (265, 266, 269–271, 275). Τα πρώτα αποτελέσματα από τη χρήση της ποσακοναζόλης σε ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες ή ασθενείς που έχουν υποβλήθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση του μυελού των οστών και φουσαρίωση στο *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* είναι επίσης ενθαρρυντικά, καθώς έδειξαν ότι περίπου 50% των ασθενών με αυτή τη λοίμωξη οι οποίοι έλαβαν ποσακοναζόλη επειδή απέτυχαν να ανταποκριθούν ή να ανεχθούν λόγω παρενεργειών την πρώτη αντιμυκητιασική θεραπεία εκλογής, ανταποκρίθηκαν σε αυτή την τριαζόλη (276). Άλλες πειραματικές τριαζόλες όπως οι *CS-758* και *UR-9825* έχουν επίσης κάποια *in vitro* δραστικότητα έναντι του *Fusarium* ενώ η πειραματική τριαζόλη *ER-30346* απέτυχε να δείξει κάποια αντιμυκητιασική δραστικότητα (277–279).

5ζ. Εχινοκανδίνες και νικκομυκίνη Z

Ο υφομύκητας *Fusarium* είναι έμφυτα ανθεκτικός στις εχινοκανδίνες (*echinocandins*) κασποφουγκίνη (*caspofungin*), μικαφουγκίνη (*micafungin*) και ανιδουλαφουγκίνη (*anidulafungin*) (265, 280–283), μια νέα τάξη αντιμυκητιασικών φαρμάκων η οποία αναστέλλει τη σύνθεση του μυκητιασικού κυτταρικού τοιχώματος μέσω της αναστολής της β-1-3-γλύκάνης (*β-1-3-glucan*) (284). Παρόλα αυτά, η χρήση κασποφουγκίνης είχε πρόσφατα αναφερθεί ότι οδήγησε στην ανταπόκριση ενός ασθενή με λευχαιμία και μυκηταιμία από *Fusarium* ο οποίος προηγουμένως δεν είχε ανταποκριθεί σε θεραπεία με αμφοτερικίνη Β (285). Εκτός από τις εχινοκανδίνες, ο υφομύκητας *Fusarium* είναι επίσης ανθεκτικός στη νικκομυκίνη Z (*nikkomycin Z*) (286), ένα νέο πειραματικό αντιμυκητιασικό φάρμακο το οποίο δρα μέσω της αναστολής της σύνθεσης της χιτίνης (*chitin*) στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων (284).

5η. Άλλα φάρμακα και πειραματικές ουσίες με αντιμυκητιασική δράση έναντι του υφομύκητα *Fusarium*

Αντίθετα, άλλες αντιμικροβιακές ουσίες έχουν δραστικότητα έναντι του υφομύκητα *Fusarium*. Για παράδειγμα, η τερβιναφίνη (*terbinafine*) έχει *in vitro* δραστικότητα έναντι κάποιων στελεχών που δεν ανήκουν στο είδος *Fusarium solani* (287, 288). Επιπλέον, οι αζασορδαρίνες (*azasordarines*), μια νέα τάξη αντιμυκητιασικών φαρμάκων η οποία αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση (*proteinosynthesis*) στους μυκητιασικούς οργανισμούς, έχουν δείξει *in vitro* δραστικότητα έναντι του υφομύκητα *Fusarium* (289). Άλλες πειραματικές ουσίες που έχουν δείξει κάποιου βαθμού *in vitro* δραστικότητα έναντι του *Fusarium* είναι οι αναστολείς της ξυλανάσης και ασπαρτικής πρωτεάσης (*inhibitors of xylanase and aspartic protease*) (290), οι αναστολείς θρυψίνης (*trypsin inhibitors*) (291), η N-ακετυλοκυστεϊνη (*N-acetylcysteine*) (292), η κεκροπίνη Α (*cecropin A*) (293), η συριγκομυκίνη Ε (*syringomycin E*) (294), η κοξιδίνη (*coccidin*) (295), ορισμένες δικατιονικές αρωματικές καρβαζόλες, φουράνες και βενζιμιδαζόλες (*dication-substituted carbazoles, furans, and benzimidazoles*) (296, 297), ορισμένα φυτικά έλαια προερχόμενα από τον ευκάλυπτο (*essential oils extracted from Eucalyptus species*) (298), ορισμένες αμιδικές ουσίες (*6-fluoro-4-piperidinyl-1,2-benzisoxazole amides* και *6-fluoro-chroman-2-carboxamides*) (299) και η γκριφολίνη (*grifolin*) (300). Αντίθετα, το παράγωγο πραδιμικίνης (*pradimicin*) *BMS-181184* δεν είχε *in vitro*

δραστικότητα έναντι στελεχών *Fusarium* (301). Επομένως, περαιτέρω μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ζώων με διηθητική φουσαρίωση καθώς και κλινικές μελέτες χρειάζονται για να διαπιστωθεί αν κάποια από τις ανωτέρω πειραματικές ουσίες έχει μέλλον στην θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης.

5θ. Συνδυαστική αντιμυκητιασική θεραπεία

Με δεδομένη την έμφυτη ανθεκτικότητα του υφομύκητα *Fusarium* στα περισσότερα από τα χρησιμοποιούμενα αντιμυκητιασικά φάρμακα, η χρησιμοποίηση συνδυαστικής αντιμυκητιασικής θεραπείας (*combination antifungal treatment*) με βάση την αμφοτερικίνη Β και άλλα φάρμακα έχει προταθεί ως εναλλακτική θεραπεία εκλογής για τη διηθητική φουσαρίωση. Για παράδειγμα, η 5-φλουκυτοσίνη (*5-flucytosine*) έχει προταθεί ότι δρα συνεργικά με την αμφοτερικίνη Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium* (302). Ως εκ τούτου, ο συνδυασμός αμφοτερικίνης Β σε δόση 1.5 mg/kg ημερησίως και 5-φλουκυτοσίνης σε δόση 25 mg/kg κάθε 6 ώρες (με τροποποίηση της δόσης αυτής ώστε η μέγιστη επιτευχθείσα συγκέντρωση του φαρμάκου στον ορό να μην ξεπερνά τα 60 μg/ml) έχει περιστασιακά χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση (302). Όμως, δεν έχουν υπάρξει προοπτικές μελέτες οι οποίες να έχουν δείξει καθαρό όφελος του παραπάνω συνδυασμού σε σχέση με τη χρήση αμφοτερικίνης Β ως μονοθεραπεία. Μάλιστα, ο συνδυασμός αυτός δεν είχε δραστικότητα *in vivo* σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με γενικευμένη φουσαρίωση (212). Επιπρόσθετα, η καταστολή του μυελού των οστών που μπορεί να προκληθεί ως παρενέργεια από τη χρήση 5-φλουκυτοσίνης αυτής καθεαυτής είναι κάτι που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, ιδιαίτερα σε ασθενείς οι οποίοι ήδη έχουν σημαντικού βαθμού ανοσοκαταστολή (302).

Επιπλέον, ο *Arikan* και συνεργάτες έδειξαν ότι ο συνδυασμός αμφοτερικίνης Β και κασποφουγκίνης είχε συνεργική ή αθροιστική δράση *in vitro* με βάση τη μέθοδο *checkerboard* έναντι τεσσάρων από τα 6 στελέχη *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum* που ελέγχθηκαν σε εκείνη τη μελέτη (303). Όμως, δεν υπάρχουν *in vivo* δεδομένα που να υποστηρίζουν τα αρχικά αυτά πειραματικά δεδομένα. Επίσης, μια άλλη πρόσφατη μελέτη από τον *Phillip* και συνεργάτες η οποία εξέτασε την *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ της αμφοτερικίνης Β και της ανιδουλαφουγκίνης έναντι στελεχών *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum* με την ίδια μέθοδο *checkerboard* δεν έδειξε συνεργική ή αθροιστική αλληλεπίδραση μεταξύ τους (304). Ο

συνδυασμός λιποσωμικής αμφοτερικίνης Β και τερβιναφίνης επίσης αναφέρθηκε πρόσφατα ότι οδήγησε στην θεραπεία ενός ασθενούς με λευχαμία και λοίμωξη από *Fusarium oxysporum*, όμως περισσότερες μελέτες απαιτούνται στο μέλλον για την εδραίωση του συγκεκριμένου θεραπευτικού σχήματος για την αντιμετώπιση της διηθητικής φουσαρίωσης, ιδιαίτερα λαμβάνοντας υπόψη την ηπατοτοξικότητα της συστηματικής χορήγησης τερβιναφίνης (305). Συνδυασμοί της αμφοτερικίνης Β με τη ριφαμπικίνη (*rifampin*), ριφαμπουτίνη (*rifabutin*) και την αζιθρομυκίμη (*azithromycin*) έχουν επίσης δειχθεί να είναι συνεργικοί *ιn vitro* έναντι στελεχών *Fusarium* (306–308). Όμως, ο πρώτος συνδυασμός δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός στη θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης στην κλινική πράξη, ενώ περισσότερα *in vivo* δεδομένα χρειάζονται για να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα για τη χρησιμότητα του δεύτερου και τρίτου συνδυασμού. Επιπλέον, μια πρόσφατη *in vitro* μελέτη από την Ισπανία κατέδειξε τη συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ της αμφοτερικίνης Β με τη ραβουκοναζόλη, της τερβιναφίνης με τη βορικοναζόλη, και της τερβιναφίνης με τη ραβουκοναζόλη έναντι 11 στελεχών *Fusarium* (309) οπότε περαιτέρω *in vivo* μελέτες χρειάζονται για την επιβεβαίωση της αρχικής αυτής ενδιαφέρουσας παρατήρησης.

Δεδομένου ότι η αμφοτερικίνη Β και η βορικοναζόλη είναι τα δυο πιο δραστικά αντιμυκητιασικά φάρμακα έναντι του υφομύκητα *Fusarium in vitro* και *in vivo*, μια θεραπευτική στρατηγική που θα συνδυάζει τη βορικοναζόλη με μια λιποσωμική μορφή της αμφοτερικίνης Β θα πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω στην κλινική πράξη. Μάλιστα, δύο πρόσφατες δημοσιεύσεις κατέδειξαν την επιτυχή θεραπεία ενός παιδιού με οξεία μυελογενή λευχαιμία και ενδοκαρδίτιδα από *Fusarium solani* (158) και μιας γυναίκας με οξεία λεμφογενή λευχαιμία και γενικευμένη φουσαρίωση από *Fusarium oxysporum* με τη χρήση συνδυασμού αμφοτερικίνης Β με βορικοναζόλη (310). Με βάση την ίδια λογική της χρήσης της αμφοτερικίνης Β με τριαζόλες ως συνδυασμού έναντι της διηθητικής φουσαρίωσης, η χρήση του πολυενικού αυτού αντιβιοτικού μαζί με την πειραματική τριαζόλη ποσακοναζόλη αξίζει επίσης να διερευνηθεί στο μέλλον.

5ι. Μέτρα για την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος

Επειδή ο αριθμός των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων φαίνεται ότι αποτελεί τον πλέον καθοριστικό προγνωστικό παράγοντα στις κλινικές περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης (25, 26), μια συμπληρωματική θεραπευτική προσέγγιση με πιθανά θετικά αποτελέσματα είναι η χρησιμοποίηση των ανασυνδυασμένων αυξητικών παραγόντων διέγερσης του μυελού των οστών όπως είναι ο *G-CSF* (*granulocyte-colony stimulating factor*) και ο *GM-CSF* (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) με σκοπό την γρηγορότερη αποκατάσταση του μυελού των οστών σε ανοσοκατασταλμένους ουδετεροπενικούς ασθενείς (311–315). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση μετάγγισης ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων (*granulocyte transfusions*) οδηγεί σε καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα (επιβίωση της τάξης του 33 – 50%) επειδή ελαττώνει τη διάρκεια της ουδετεροπενίας των ασθενών (10, 316, 317). Παρόλα αυτά όμως, η παρουσία άλλων παραγόντων οι οποίοι μπορεί από μόνοι τους να επηρεάσουν σημαντικά την πρόγνωση της λοίμωξης όπως η επίτευξη ύφεσης της υποκείμενης αιματολογικής νεοπλαστικής νόσου, η ταχύτητα ανάρρωσης του μυελού των οστών και η έκταση και βαρύτητα της λοίμωξης (π.χ., εντοπισμένη εν αντιθέσει με γενικευμένη νόσο) ίσως να έχει οδηγήσει στην υπερεκτίμηση της πραγματικής αποτελεσματικότητας των μεθόδων αυτών.

Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ιντερφερόνη-γ (*interferon-gamma*; *IFN-γ*) και η ιντερλευκίνη 15 (*interleukin-15*; *IL-15*) αυξάνουν την ικανότητα των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων να προκαλούν βλάβη στις υφές των *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum*, προτείνοντας ένα συμπληρωματικό ρόλο αυτών των κυτοκινών (*cytokines*) στην θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης στους ανθρώπους (314, 318). Περισσότερες μελέτες πάντως είναι απαραίτητες πριν βγουν πιο στέρεα συμπεράσματα. Τέλος, η έρευνα που διεξάγεται για την παραγωγή εμβολίων (*vaccines*) με βάση τη διέγερση των δενδριτικών κυττάρων (*dendritic cells*) ή των Τ-λεμφοκυττάρων για την πρόληψη έναντι της ανάπτυξης διηθητικής ασπεργίλλωσης σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς ίσως αποτελέσει παράδειγμα προς μίμηση και για την παραγωγή εμβολίων για τη διηθητική φουσαρίωση στο μέλλον (319–321).

5κ. Χειρουργική θεραπεία

Επιπρόσθετα, σε ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες, η ύπαρξη φουσαρίωσης των νυχιών πρέπει να αντιμετωπίζεται και να θεραπεύεται έγκαιρα και επιθετικά, συμπεριλαμβανομένης της αφαίρεσης του νυχιού (*nail avulsion*) και της χορήγησης συστηματικής αντιμυκητιασικής θεραπείας. Παράλληλα, μετά την αφαίρεση των νυχιών πρέπει να χορηγείται τοπική αλοιφή κυκλοπιρόξης (*ciclopirox*) ή μπιφοναζόλης (38, 43). Επίσης, η χειρουργική αφαίρεση μολυσμένων νεκρωτικών ιστών όπως είναι αποστήματα (*abscesses*), λοιμώξεις των μαλακών μορίων (*soft-tissue infections*) και των νυχιών και λοιμώξεις των παραρρίνιων κόλπων είναι σημαντική για την θετική έκβαση της λοίμωξης αυτής (38, 43, 322, 323).

Τέλος, περισσότερες μελέτες χρειάζονται για τη διερεύνηση της χρησιμότητας χειρουργικής επέμβασης σε περιπτώσεις πνευμονικής φουσαρίωσης με εντοπισμένες πνευμονικές βλάβες. Κατά αντιστοιχία με ότι έχει περιγραφεί για το όφελος της λοβεκτομής (*lobectomy*) σε συγκεκριμένες κατηγορίες ασθενών με πνευμονική ασπεργίλλωση (π.χ., εντοπισμένες πνευμονικές κοιλότητες, σημαντική αιμόπτυση) (324, 325) υπάρχουν αναφορές και για ασθενείς με πνευμονική φουσαρίωση οι οποίοι ανταποκρίθηκαν σε θεραπεία που περιλάμβανε εκτός από επιθετική συστηματική αντιμυκητιασική θεραπεία και χειρουργική αφαίρεση τμήματος των προσβληθέντων πνευμόνων (326).

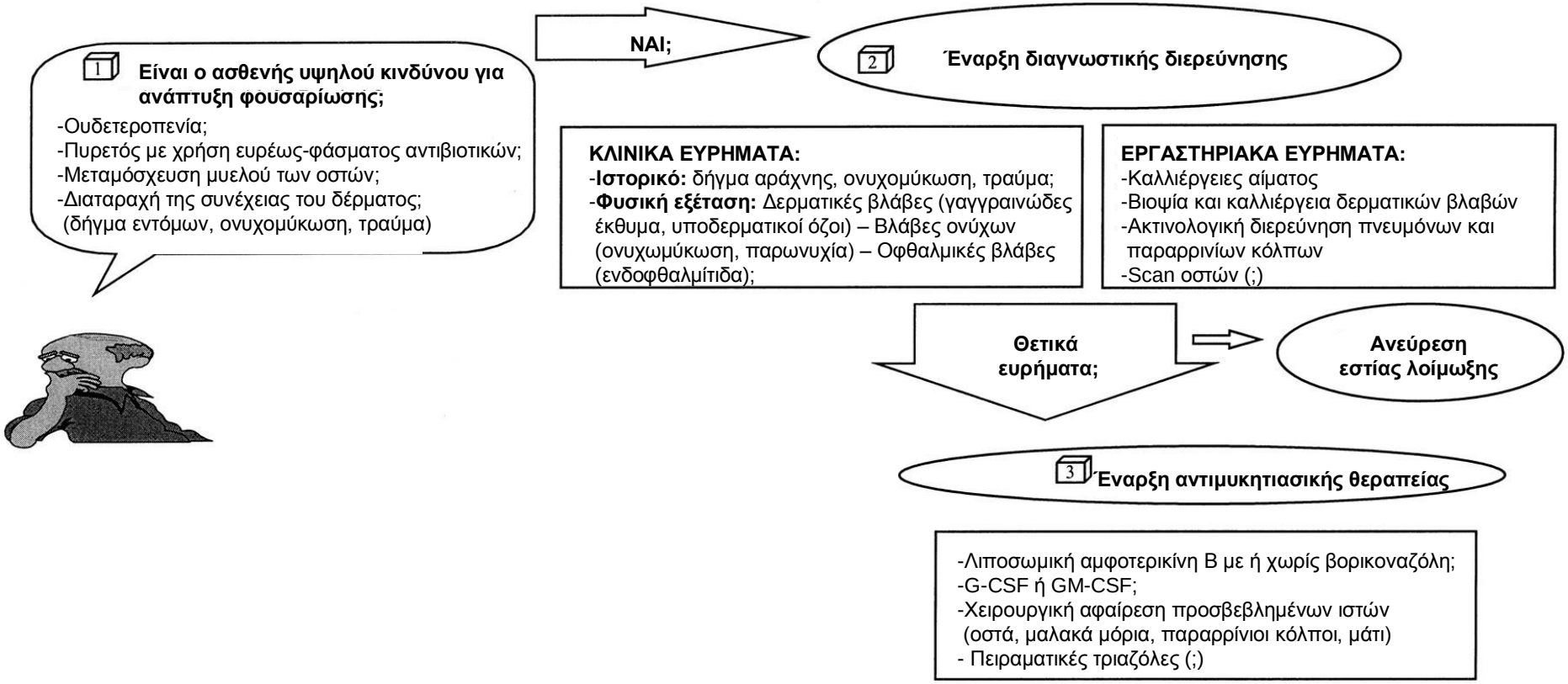
5λ. Σύνοψη

Εν κατακλείδι, λαμβάνοντας υπόψη την περιορισμένη δραστικότητα των μοντέρνων αντιμυκητιασικών φαρμάκων έναντι της διηθητικής φουσαρίωσης στην κλινική πράξη, σημαντικό ρόλο για την έγκαιρη διάγνωση της λοίμωξης, η οποία οδηγεί και σε καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα, διαδραματίζει η ύπαρξη κλινικής υποψίας για τη λοίμωξη αυτή. Ως εκ τούτου, κάθε κλινικός γιατρός πρέπει να υποπτεύεται την ύπαρξη της συγκεκριμένης ευκαιριακής λοίμωξης σε εμπύρετους ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες ή αποδέκτες μεταμόσχευσης του μυελού των οστών ή συμπαγών οργάνων και ουδετεροπενία ή σημαντική ανοσοκαταστολή με κορτικοστεροειδή με κάποιο ή κάποια από τα ακόλουθα κλινικά χαρακτηριστικά: (*α*) παρουσία παρωνυχίας με ή χωρίς ονυχομύκωση, (*β*) παρουσία δερματικού έλκους ή νεκρωτικής εσχάρας, ιδιαίτερα στα δάκτυλα, (*γ*)

παρουσία διασπαρμένων δερματικών επώδυνων ερυθηματωδών βλαβών με συνοδό ύπαρξη μυαλγιών.

Σε τέτοιες περιπτώσεις, μια εκτεταμένη διαγνωστική προσέγγιση είναι αναγκαία συμπεριλαμβανομένης της διενέργειας καλλιεργειών αίματος, αξονικής τομογραφίας των παραρρίνιων κόλπων και των πνευμόνων, και βιοψίας δερματικών βλαβών για την διεξαγωγή καλλιέργειας, ιστοπαθολογικής ανάλυσης και κατάλληλων χρώσεων. Κατόπιν της διάγνωσης της λοίμωξης, η έναρξη συστηματικής αντιμυκητιασικής θεραπείας με υψηλές δόσεις αμφοτερικίνης Β (με ή χωρίς την προσθήκη βορικοναζόλης) μαζί με την επιστράτευση κάθε δυνατού μέσου για την ελάττωση της διάρκειας της υποκείμενης ουδετεροπενίας και τη γρήγορη μείωση της χορήγησης ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων πρέπει να πραγματοποιείται χωρίς καμιά καθυστέρηση (*Εικόνα 31*).

Εικονα 31. Προτεινόμενος αλγόριθμος για τη διαγνωστική προσέγγιση και θεραπεία της διηθητικής φουσαρίωσης. Το διάγραμμα είναι τροποποιημένο από την δημοσίευση των *Boutati* & *Anaissie* [10]



6. ΠΡΟΛΗΨΗ ΦΟΥΣΑΡΙΩΣΗΣ

Εξαιτίας της υψηλής θνητότητας της διηθητικής φουσαρίωσης μέτρα πρόληψης έναντι της λοίμωξης αυτής είναι εξαιρετικής σημασίας. Ως εκ τούτου, η περαιτέρω μελέτη για την ανεύρεση αποτελεσματικών σχημάτων αντιμυκητιασικών φαρμάκων για προφύλαξη έναντι του υφομύκητα *Fusarium*, η άμεση τροποποίηση παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο για τη λοίμωξη (π.χ., διάρκεια ουδετεροπενίας, ανοσοκαταστολή με κορτικοστεροειδή) και η έγκαιρη διάγνωση της λοίμωξης αποτελούν παρεμβάσεις που θα μπορούσαν να ελαττώσουν τη θνητότητα από τη διηθητική αυτή λοίμωξη.

Επίσης, ασθενείς οι οποίοι πρόκειται να λάβουν σημαντικού βαθμού ανοσοκατασταλτική αγωγή πρέπει να εξετάζονται ενδελεχώς για την ανεύρεση περιοχών με διαταραχή της επιδερμίδας οι οποίες πρέπει να καλλιεργούνται και αν υπάρχει αποικισμός με τον υφομύκητα *Fusarium* να χορηγείται κατάλληλη αντιμυκητιασική αγωγή πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας. Παράλληλα, ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς με διαταραχή της συνέχειας της επιδερμίδας τους θα πρέπει να αποφεύγουν την επαφή με κάθε εστία πιθανής μετάδοσης του υφομύκητα όπως είναι το πόσιμο νερό της βρύσης. Πράγματι, έχει δειχθεί σε ορισμένες μελέτες ότι κονίδια υφομυκήτων συμπεριλαμβανομένου και του *Fusarium* μπορεί να επιμολύνουν το νερό στα νοσοκομεία με αποτέλεσμα να προκαλέσουν διασπορά στην ατμόσφαιρα (ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια ντουζ του ασθενούς) και εγκατάσταση διηθητικής λοίμωξης με πύλη εισόδου το αναπνευστικό σύστημα (50–53). Επομένως, για την αποφυγή τέτοιας νοσοκομειακής λοίμωξης, αντί για ντουζ μπορεί να επιχειρείται καθαρισμός των ασθενών με σφουγγάρια που έχουν αποστειρωμένο νερό και κατανάλωση αποστειρωμένου νερού (αντί πόσιμου από τη βρύση) κατά τη διάρκεια της μέγιστης ανοσοκαταστολής. Ο καθαρισμός των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με το νερό της βρύσης όπως είναι οι επιφάνειες στις τουαλέτες των νοσοκομείων έχει επίσης δειχθεί να ελαττώνει σημαντικά τον αριθμό των κονιδίων στην ατμόσφαιρα σε μονάδες μεταμόσχευσης του μυελού των οστών (327). Περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες απαιτούνται για την εξακρίβωση των παραγόντων που θα μπορούσαν να αυξήσουν τον κίνδυνο για την εμφάνιση της λοίμωξης αυτής με σκοπό την περαιτέρω πρόληψη της.

Τέλος, επειδή υπάρχει πιθανότητα υποτροπής της διηθητικής φουσαρίωσης σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με προηγούμενη λοίμωξη από τον υφομύκητα, η

χρησιμοποίηση δευτερογενούς προφύλαξης (*secondary prophylaxis*) πρέπει να εξετάζεται σε τέτοιους ασθενείς. Το αντιμυκητιασικό φάρμακο που θα πρέπει να χρησιμοποιείται είναι εκείνο που οδήγησε σε θετικό θεραπευτικό αποτέλεσμα κατά την πρώτη λοίμωξη από τον υφομύκητα *Fusarium*. Η χρησιμοποίηση μεταγγίσεων με ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα ή ανασυνδυασμένων αυξητικών παραγόντων πρέπει επίσης να εξετάζεται σε τέτοιους ασθενείς.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΝΤΑΜΙΔΙΝΗ

α. Εισαγωγή

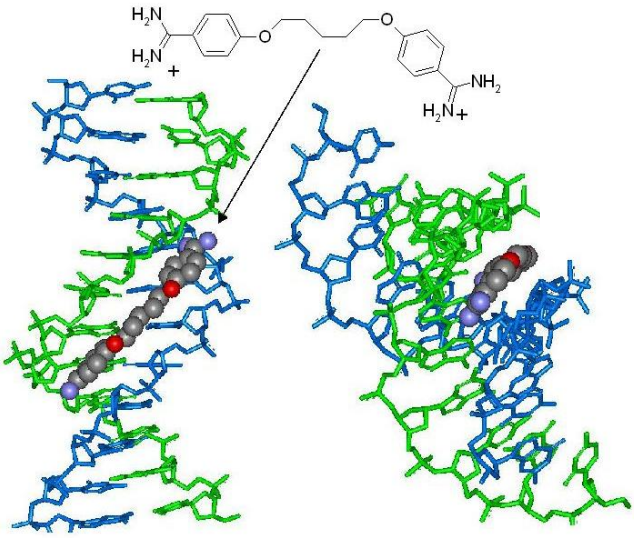
Η πενταμιδίνη (*pentamidine*) ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1930 ως ένα αντι-πρωτοζωϊκό φάρμακο με δράση έναντι των τρυπανοσωμάτων (*trypanosomes*) (27). Η δραστικότητα της στη θεραπεία της πνευμονίας από *Pneumocystis jiroveci* (πρώην *Pneumocystis carinii*) (328) ήταν γνωστή από το 1958, όμως η χρήση της πενταμιδίνης στην κλινική πράξη δεν απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρά μόνο μετά την επιδημία του σύνδρομου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (*AIDS; acquired immunodeficiency syndrome*) και την εμφάνιση της πνευμονίας από *Pneumocystis jiroveci* ως της πιο συχνής ευκαιριακής λοίμωξης σε αυτούς τους ασθενείς (329).

Η πενταμιδίνη είναι μια συνθετική αρωματική διαμιδίνη η οποία αποτελείται από μια κεντρική πενταμελή καρβονική αλυσίδα που συνδέεται με αιθερικούς δεσμούς με δύο βασικές πολικές ομάδες (*Εικόνα 32*) (27). Η πενταμιδίνη είναι διαθέσιμη στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής με τη μορφή ισεθιονικού άλατος (*isethionate salt*) ενώ στην Ευρώπη υπάρχει επίσης και με τη μορφή μεσυλικού άλατος (*mesylate salt*). Οι μορφές αυτές έχουν διαφορές στις χρησιμοποιούμενες δόσεις και στις παρατηρούμενες παρενέργειες (330).

β. Φαρμακολογία

Η πενταμιδίνη δεν απορροφάται επαρκώς από το γαστρεντερικό σωλήνα οπότε πρέπει να χορηγείται παρεντερικά ή μέσω εισπνοής (331). Η ενδοφλέβια χορήγηση πενταμιδίνης προκαλεί υψηλότερη μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα αλλά μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής ($T_{1/2}$) από ότι η αντίστοιχη ενδομυϊκή χορήγηση (332). Αυτό είναι αποτέλεσμα της περισσότερο καθυστερημένης απορρόφησης του φαρμάκου μετά από ενδομυϊκή ένεση. Για παράδειγμα, μετά από χορήγηση μίας δόσης 4 mg/kg, η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα είναι 0.2 μg/ml μετά ενδομυϊκή και 0.6 μg/ml μετά από ενδοφλέβια χορήγηση. Οι τιμές χρόνου ημίσειας ζωής μετά από μία ενδομυϊκή και ενδοφλέβια χορήγηση της ανωτέρω δόσης είναι 9.4 και 6.4 ώρες αντίστοιχα (332).

Εικόνα 32. Κρυσταλλική δομή της πενταμιδίνης



Επιπλέον, η πενταμιδίνη συνδέται εκτεταμένα με πρωτεΐνες (331). Συγκεκριμένα, το 69% του φαρμάκου βρίσκεται συνδεδεμένο με πρωτεΐνες του πλάσματος. Μετά από επανειλλημένες δόσεις, η πενταμιδίνη συσσωρεύεται σε διάφορα όργανα, κυρίως το ήπαρ, το σπλήνα, τα νεφρά, τα επινεφρίδια, τους πνεύμονες και το πάγκρεας. Η αποβολή της πενταμιδίνης είναι αργή και το φάρμακο μπορεί να ανιχνευθεί στα όργανα αυτά και στα ούρα ασθενών ακόμα και εβδομάδες μετά την τελευταία χορηγηθείσα δόση (331). Οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της πενταμιδίνης είναι παρόμοιες με αυτές της αμφοτερικίνης Β αφού και τα δύο φάρμακα συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με πρωτεΐνες αμέσως μετά τη χορήγηση τους και η αποβολή τους είναι παρατεταμένη.

Η πενταμιδίνη δεν διαπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (*blood-brain barrier*). Επίσης, μόνο το 2–4% του φαρμάκου αποβάλλεται από τα ούρα τις πρώτες 24 ώρες μετά τη χορήγηση της δόσης (331). Ασθενείς με ήπια ή μέσης βαρύτητας νεφρική ανεπάρκεια έχουν τον ίδιο χρόνο ημίσειας ζωής του φαρμάκου με αυτούς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Η πενταμιδίνη δεν αποβάλλεται κατά τη διάρκεια αιμοκάθαρσης (331).

Τέλος, η χορήγηση πενταμιδίνης με εισπνοή σχετίζεται με αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στους πνεύμονες (333). Όμως, η συστηματική απορρόφηση του φαρμάκου είναι ελάχιστη μετά από εισπνοή και το φάρμακο συνήθως δεν είναι δυνατόν να μετρηθεί στο πλάσμα ασθενών στους οποίους έχει χορηγηθεί εισπνεόμενη πενταμιδίνη (333).

γ. Παρενέργειες

Η χρήση παρεντερικής πενταμιδίνης σχετίζεται με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης παρενεργειών. Συγκεκριμένα, περίπου 50% των ασθενών που λαμβάνουν πενταμιδίνη για πνευμονία από *Pneumocystis jiroveci* παρουσιάζουν κάποιου είδους παρενέργεια (27). Το ποσοστό αυτό είναι ακόμα μεγαλύτερο σε ασθενείς με *AIDS*. Ο *Πίνακας 9* συνοψίζει τις παρενέργειες της πενταμιδίνης.

Νεφρική ανεπάρκεια (*renal failure*) παρατηρείται σε περίπου 25% των ασθενών που λαμβάνουν πενταμιδίνη (334). Συνήθως είναι ήπια και αναστρέψιμη μετά το πέρας της θεραπείας. Ο μηχανισμός είναι άγνωστος αλλά η εμφάνιση νεφροτοξικότητας μετά από χορήγηση πενταμιδίνης παρατηρείται συχνότερα σε ασθενείς που παράλληλα λαμβάνουν και άλλα νεφροτοξικά φάρμακα καθώς επίσης και σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν επαρκή ενυδάτωση κατά τη χορήγηση της πενταμιδίνης (334). Σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται προσοχή για την αποφυγή υπερκαλιαιμίας (*hyperkalemia*).

Η θεραπεία με πενταμιδίνη μπορεί επίσης να προκαλέσει διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων με αποτέλεσμα την πρόκληση υπογλυκαιμίας (*hypoglycemia*) ή υπεργλυκαιμίας (*hyperglycemia*) (335, 336). Περίπου 14–21% των ασθενών που λαμβάνουν πενταμιδίνη εμφανίζουν υπογλυκαιμία η οποία μπορεί να είναι τόσο σοβαρή ώστε να προκαλέσει ακόμα και μόνιμες νευρολογικές βλάβες (335). Αιτία της εμφάνισης υπογλυκαιμίας είναι η προοδευτική πρόκληση βλάβης στα κύτταρα του παγκρέατος με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ινσουλίνης (*insulin*). Η υπογλυκαιμία συνήθως παρατηρείται τη δεύτερη ή τρίτη βδομάδα μετά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου αλλά μπορεί να εμφανιστεί ακόμα και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας (335). Από την άλλη πλευρά. συνεχιζόμενη βλάβη και καταστροφή του παγκρεατικού παρεγχύματος μπορεί να προκαλέσει υπεργλυκαιμία και ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη (*diabetes mellitus*) (336). Τέλος, αρκετές περιπτώσεις παγκρεατίτιδας, συμπεριλαμβανομένης νεκρωτικής παγκρεατίτιδας (*necrotizing pancreatitis*), έχουν αναφερθεί σε ασθενείς μετά από χορήγηση πενταμιδίνης (337).

Αιματολογικές παρενέργειες μπορούν επίσης να παρατηρηθούν. Περίπου 15% των ασθενών εμφανίζουν ουδετεροπενία η οποία είναι αναστρέψιμη μετά το πέρας της θεραπείας (338). Μικρότερο ποσοστό ασθενών εμφανίζουν ελάττωση του αριθμού των αιμοπεταλίων (*thrombocytopenia*) (339). Άμεσες παρενέργειες που μπορούν να

παρατηρηθούν κατά τη χορήγηση ενδοφλέβιας πενταμιδίνης είναι υπόταση η οποία μπορεί να αποφευχθεί με την αργή ενδοφλέβια χορήγηση του φαρμάκου (340), ταχυκαρδία, ναυτία, έμετος και μεταλλική γεύση στο στόμα (*metallic taste*) (341). Ηλεκτρολυτικές διαταραχές όπως υποασβεστιαιμία (*hypocalcemia*) και υπομαγνησιαιμία (*hypomagnesemia*) (342) επίσης μπορουν να παρατηρηθούν, οι οποίες μπορούν σε μικρό ποσοστό ασθενών να προκαλέσουν επιμύκηνση του διαστήματος QT (*QT prolongation*) με αποτέλεσμα την πρόκληση θανατηφόρας κοιλιακής ταχυαρρυθμίας *torsades de pointes* (343).

Πίνακας 9. Παρενέργειες που μπορούν να παρατηρηθούν μετά από χορήγηση πενταμιδίνης

Συχνότητα	Χορήγηση με εισπνοή	Συστηματική χορήγηση
> 10%	Πόνος στο στήθος Εξάνθημα Δύσπνοια Βρογχόσπασμος Φαρυγγίτιδα Βήχας	Υπόταση Εξάνθημα Υπό/υπέργλυκαιμία Ανορεξία Ναυτία Έμετος Διάρροια Λευκοπενία Ουδετεροπενία Θρομβοπενία Νεφροτοξικότητα με υπερκαλιαιμία Ηπατοτοξικότητα
1 – 10%	Μεταλλική γεύση	Καρδιακές αρρυθμίες Παγκρεατίτιδα Μεταλλική γεύση Αναιμία Τοπικός ερεθισμός με ενδομυϊκή χορήγηση
< 1%	Υπογλυκαιμία Νεφρική ανεπάρκεια	*Torsades de pointes*

Η ενδομυϊκή χορήγηση πενταμιδίνης σχετίζεται με τοπικές αντιδράσεις όπως πόνος (σε περίπου 17% των ασθενών) και εμφάνιση άσηπτων αποστημάτων ή δερματικής νέκρωσης (σε περίπου 7% των ασθενών) (332). Η χορήγηση πενταμιδίνης μέσω εισπνοής μπορεί να προκαλέσει βρογχόσπασμο (*bronchospasm*) και βήχα που είναι δυνατό να αποφευχθούν με προφυλακτική χορήγηση βρογχοδιασταλτικών (*bronchodilators*) πριν τη δόση της πενταμιδίνης (333). Τέλος, η χορήγηση εισπνεόμενης πενταμιδίνης μπορεί να προκαλέσει αναστρέψιμη μεταλλική γεύση και ερεθισμό του φάρυγγα (333).

δ. Αντιμικροβιακό φάσμα

Η πενταμιδίνη έχει σημαντική δραστικότητα έναντι αρκετών πρωτοζώων μικροοργανισμών όπως είναι η *Leishmania donovani* (*visceral leishmaniasis*) (344), το *Trypanosoma brucei gambiense* (*West African trypanosomiasis*) και έναντι αρκετών στελεχών του *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*East African trypanosomiasis*) (345). Στην Κεντρική Αφρική όπου η τρυπανοσωμίαση από το παράσιτο *Trypanosoma brucei gambiense* είναι ενδημική, η πενταμιδίνη χρησιμοποίειται μαζί με τη σουραμίνη (*suramin*) για τη θεραπεία της νόσου αυτής εφόσον δεν υπάρχει συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος (345). Η πενταμιδίνη αντίθετα δεν έχει δραστικότητα έναντι του τρυπανοσώματος *Trypanosoma cruzi*, το παθογόνο παράσιτο της Αμερικάνικης Τρυπανοσωμίασης ή νόσου του *Chagas* (*Chagas disease*) (27, 345). Επίσης, η πενταμιδίνη δεν έχει σημαντική δραστικότητα έναντι βακτηριακών οργανισμών (27) όμως έχει δειχθεί να έχει δράση έναντι αρκετών μυκήτων. Για παράδειγμα, η χρήση πενταμιδίνης αποτελεί θεμελιώδη θεραπευτική στρατηγική τόσο ως προφύλαξη όσο και ως θεραπεία έναντι της πνευμονίας από *Pneumocystis jiroveci* (329), ενός μικροοργανισμού που πρόσφατα ταξινομήθηκε ως μύκητας και άλλαξε όνομα από το προηγούμενα χρησιμοποιούμενο *Pneumocystis carinii* (328). Η πενταμιδίνη έχει επίσης δειχθεί ότι έχει *in vitro* δραστικότητα έναντι διαφόρων άλλων μυκητιασικών οργανισμών όπως είναι οι ζυμομύκητες *Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae* και *Cryptococcus neoformans* και οι υφομύκητες *Scedosporium prolificans* και *Aspergillus terreus* (346–350).

Με βάση την προαναφερθείσα ευρεία αντιμυκητιασική δραστικότητα της πενταμιδίνης, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η δράση της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* τόσο *in vitro* χρησιμοποιώντας ανεξάρτητες μικροβιολογικές τεχνικές (*Ειδικό Μέρος Α΄*) όσο και *in vivo* σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαριώση (*Ειδικό Μέρος Γ΄*). Επίσης, στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε η *in vitro* αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β (*Ειδικό Μέρος Β΄*), η οποία αποτελεί τη θεραπεία εκλογής για τη διηθητική φουσαρίωση στην κλινική πράξη.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α΄

IN VITRO ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΜΙΔΙΝΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΦΟΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM*

Στο αρχικό αυτό τμήμα της διδακτορικής διατριβής, μέσω μιας σειράς πειραμάτων, σκοπός ήταν να αναδειχθεί η δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του *Fusarium in vitro* στο εργαστήριο, χρησιμοποιώντας διάφορα μέσα καλλιέργειας, με ανεξάρτητες μικροβιολογικές μεθόδους προσδιορισμού της ευαισθησίας του υφομύκητα έναντι της πενταμιδίνης, κάτω από διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου, και έναντι των δύο αναπτυξιακών μορφών (*developmental programs of growth*) του υφομύκητα *Fusarium*, δηλαδή των κονιδίων και των υφών.

1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Α΄

1α. Στελέχη *Fusarium*

Για τη διενέργεια των *in vitro* πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν 10 (*δέκα*) κλινικά στελέχη *Fusarium* από το Εργαστήριο Μοριακής Μυκητολογίας (*Molecular Mycology Laboratory*) του *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* στο Χιούστον του Τέξας. Από αυτά τα κλινικά στελέχη, 5 (*πέντε*) ανήκαν στο σύμπλεγμα *Fusarium solani* και 5 (*πέντε*) ήταν non-*solani Fusarium* στελέχη (3 στο σύμπλεγμα *Fusarium oxysporum*, 1 *Fusarium proliferatum* και 1 *Fusarium pallidoroseum*). Λεπτομέρειες και χαρακτηριστικά για τους ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα στελέχη αυτά παρατίθενται συνοπτικά στον *Πίνακα 10*.

Ο χαρακτηρισμός των στελεχών *Fusarium* στο μοριακό επίπεδο έγινε χρησιμοποιώντας ενίσχυση (*amplification*) και ταυτοποίηση (*sequencing*) του μεταφραστικού παράγοντα επιμύκησης 1-άλφα (*translational elongation factor 1-alpha*) όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες από τους *O'Donnell* και συνεργάτες στο Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (*US Department of Agriculture*) (351). Το στέλεχος *Candida tropicalis American Type Culture Collection* (*ATCC*) 2697 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (*quality*

control) για τα *in vitro* πειράματα. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος του ζυμομύκητα *Candida* ως μάρτυρας και όχι κάποιο στέλεχος υφομύκητα (π.χ., *Aspergillus* ή *Zygomycetes*) είναι ότι η πενταμιδίνη έχει αποδεδειγμένη δραστικότητα έναντι του ζυμομύκητα *Candida* (346) σε αντίθεση με την έλλειψη καθολικής δραστικότητας έναντι των ανωτέρω υφομυκήτων (350).

Πίνακας 10. Χαρακτηριστικά των 10 κλινικών στελεχών *Fusarium* που χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* μελέτες της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Αριθμός στελέχους	Αρχικά ασθενούς	Προέλευση	Διάγνωση	Είδος *Fusarium*
F1	HD	Δέρμα	Οξεία μυελογενής λευχαιμία	*Fusarium solani*
F3	SS	Πτύελα	Οξεία μυελογενής λευχαιμία	*Fusarium solani*
F9	GJ	Πνεύμονες (βιοψία)	Οξεία μυελογενής λευχαιμία	*Fusarium solani*
F13	DM	Αίμα	Οξεία λεμφογενής λευχαιμία	*Fusarium solani*
F16	DW	Πτύελα	Πολλαπλό μυέλωμα	*Fusarium solani*
F5	BR	Πτύελα	Οξεία μυελογενής λευχαιμία	*Fusarium oxysporum*
F7	AC	Βρογχοκυψελιδική έκπλυση	Νεφρικός καρκίνος	*Fusarium oxysporum*
F15	SR	Πνεύμονες (βιοψία)	Οξεία μυελογενής λευχαιμία	*Fusarium oxysporum*
F20	ME	Αίμα	Οξεία μυελογενής λευχαιμία	*Fusarium proliferatum*
F10	DW	Βρογχοκυψελιδική έκπλυση	Πολλαπλό μυέλωμα	*Fusarium palidoroseum*

1β. Μέθοδος *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (*NCCLS*) *M38-P*

Αρχικά μελετήθηκε η *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης και μιας πλειάδας αντιμυκητιασικών φαρμάκων έναντι των 10 (*δέκα*) αυτών στελεχών *Fusarium* εφαρμόζοντας τις οδηγίες του πρωτόκολλου *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (*NCCLS*) *M-38P* (352). Εκτός από την πενταμιδίνη τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το πολυενικό αντιβιοτικό αμφοτερικίνη Β, ο αντιμεταβολίτης 5-φλουκυτοσίνη, οι αζόλες φλουκοναζόλη, ιτρακοναζόλη και βορικοναζόλη και η εχινοκανδίνη κασποφουγκίνη. Η αμφοτερικίνη Β αγοράστηκε από την *Pharma-Tek* (*Huntington, New York, NY*), η 5-φλουκυτοσίνη από την *Sigma-Aldrich* (*St. Louis, Missouri, MO*), η φλουκοναζόλη και βορικοναζόλη από την *Pfizer Inc.* (*New York, NY*), η ιτρακοναζόλη από

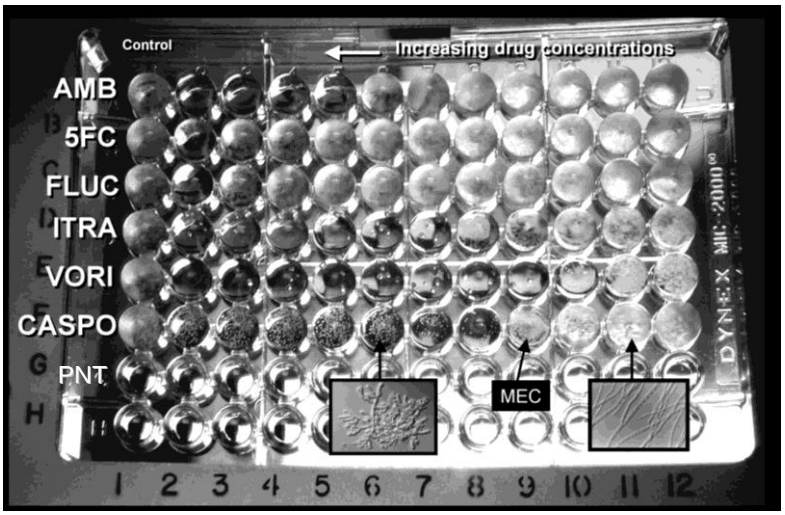
την *Janssen Pharmaceutica* (*Titusville, New Jersey, NJ*) και η κασποφουγκίνη από τη *Merck & Co. Inc.* (*Whitehouse Station, New Jersey, NJ*). Όλα τα φάρμακα αποκτήθηκαν σε μορφή σκόνης (*powder*). Η αμφοτερικίνη Β και ιτρακοναζόλη διαλύθηκαν σε 100% διμεθυλσουλφοξίδη (*dimethyl sulfoxide; DMSO*), ενώ τα υπόλοιπα φάρμακα διαλύθηκαν σε διπλά απεσταγμένο (*double distilled*) νερό.

Εν συνεχεία, τα φάρμακα αραιώθηκαν ένα προς πενήντα (*1:50*) σε *RPMI 1640* (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) σύμφωνα με το πρωτόκολλο *NCCLS M-38P* ώστε να επιτευχθεί η διπλάσια συγκέντρωση από την επιθυμητή για το τελικό στάδιο της διαδικασίας. Το μέσο *RPMI 1640* προετοιμάστηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, MO*) (352). Έπειτα, το μέσο *RPMI*, μετά από την προσθήκη L-γλουταμίνης (*L-glutamine*) αλλά χώρις την προσθήκη διττανθρακικών (*bicarbonate*), αναμίχθηκε με 0.165 M *MOPS* (*morpholinepropanesulfonic acid*) με σκοπό την επίτευξη ενός τελικού *pH* ίσου με 7 (352). Για την αξιολόγηση της *in vitro* δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών του υφομύκητα *Fusarium*, η μέθοδος *NCCLS M38-P* πραγματοποιήθηκε σε 2 (*δύο*) ακόμα μέσα καλλιέργειας εκτός του τυποποιημένου *RPMI 1640*: το ένα ήταν το *RPMI* με προσθήκη 2% γλυκόζης (*RPMI-2*) και το άλλο ήταν ένα *yeast nitrogen based* (*YNB*) μέσο (*Difco, Detroit, Michigan, MI*). Το εύρος των τελικών συγκεντρώσεων των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.03 εώς 16 μg/ml για την αμφοτερικίνη Β, ιτρακοναζόλη και βορικοναζόλη, από 0.125 εώς 64 μg/ml για την 5-φλουκυτοσίνη και φλουκοναζόλη, από 0.06 εώς 32 μg/ml για την κασποφουγκίνη και από 0.125 εώς 128 μg/ml για την πενταμιδίνη (352). Η μέθοδος *NCCLS M38-P* πραγματοποιήθηκε σε *microtitration plates* με 96 οπές (*Εικόνα 33*) τα οποία παρέμειναν κατεψυγμένα στους –70 ^{o}C εώς την ημέρα της διεξαγωγής του εκάστοτε πειράματος (352).

Τα διαλύματα των κονιδίων των στελεχών *Fusarium* προετοιμάστηκαν από καλλιέργειες κονιδίων ηλικίας 7 (*επτά*) ημερών σε *potato dextrose agar* (*PDA*) σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτόκολλου *NCCLS* (352). Στη συνέχεια, τα διαλύματα προσαρμόστηκαν σπεκτροφωτομετρικά σε οπτικές πυκνότητες (*optical densities*; *ODs*) με εύρος από 0.09 εώς 0.30 (60 – 82% *transmittance*). Την ημέρα του εκάστοτε πειράματος, σε κάθε οπή του *NCCLS microtitration plate* η οποία ήδη περιείχε 100 μl από τη διπλάσια συγκέντρωση του εκάστοτε αντιμυκητιασικού φαρμάκου προστέθηκαν 100 μl από τη διπλάσια συγκέντρωση κονιδίων του εκάστοτε κλινικού στελέχους *Fusarium* με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τελικού

όγκου σε κάθε οπή ίσου με 200 μl. Η τελική συγκέντρωση των κονιδίων κυμαινόταν από 0.4 x 10^4 εώς 5 x 10^4 *CFU* (*colony forming units*)/ml (352).

Εικόνα 33. Απεικόνιση ενός *microtitration plate* που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή πειραμάτων ευαισθησίας του υφομύκητα *Fusarium* σε διάφορα αντιμυκητιασικά φάρμακα με βάση τις οδηγίες του πρωτοκόλλου *NCCLS M38-P*
AMB, αμφοτερικίνη Β; 5FC, 5-φλουκυτοσίνη; FLUC, φλουκοναζόλη, ITRA, ιτρακοναζόλη; VORI, βορικοναζόλη; CASPO, κασποφουγκίνη; PNT, πενταμιδίνη



Τα *microtitration plates* τοποθετήθηκαν στους 35 ^oC και μετά από 48 ώρες επώασης υπολογίστηκαν οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (*minimal inhibitory concentrations*; *MICs*) των διάφορων αντιμυκητιασικών φαρμάκων έναντι των 10 (*δέκα*) στελεχών του υφομύκητα *Fusarium*. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ορίστηκε ως η μικρότερη συγκέντρωση φαρμάκου στην οποία υπήρχε ολική έλλειψη (για την αμφοτερικίνη Β) ή σημαντική ελάττωση της ανάπτυξης του υφομύκητα (αντιστοιχώντας σε περίπου 50% ελάττωση για τις αζόλες, την 5-φλουκυτοσίνη και την κασποφουγκίνη) (352). Επειδή η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την πενταμιδίνη έναντι μυκητιασικών μικροοργανισμών δεν έχει σαφώς καθοριστεί μέχρι σήμερα, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε 2 μεθόδους προσδιορισμού της: την τιμή *MIC-2* και την τιμή *MIC-0*. Η πρώτη τιμή ορίστηκε ως η ελάχιστη συγκέντρωση της πενταμιδίνης η οποία προκάλεσε οπτικά εμφανή ελάττωση της ανάπτυξης του συγκεκριμένου στελέχους *Fusarium* (περίπου > 50%), ενώ η δεύτερη ορίστηκε ως η ελάχιστη συγκέντρωση της πενταμιδίνης η οποία προκάλεσε οπτικά εμφανή ολική ελάττωση της ανάπτυξης του στελέχους *Fusarium* (περίπου > 95%). Όλα τα στελέχη *Fusarium* ελέγχθηκαν τρεις φορές σε διαφορετικές ημέρες. Όταν βρίσκονταν διαφορετικές τιμές *MICs* για ένα συγκεκριμένο στέλεχος υφομύκητα στα

τρία διαφορετικά πειράματα, η μεγαλύτερη τιμή *MIC* καταγραφόταν ως το τελικό αποτέλεσμα για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της πενταμιδίνης έναντι του συγκεκριμένου στελέχους.

Η ελάχιστη μυκητοκτόνος συγκέντρωση (*minimal fungicidal concentration; MFC*) του κάθε αντιμυκητιασικού φαρμάκου υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας μια τυποποιημένη μεθοδολογία που ανακοινώθηκε από την *Espinel-Ingroff* και συνεργάτες (353). Συγκεκριμένα, 20 μl από κάθε οπή του *microtitration plate* που είχε οπτικά εμφανή ολική αναστολή της ανάπτυξης του εκάστοτε στελέχους *Fusarium* μεταφέρθηκαν σε δισκία *petri* με μέσο καλλιέργειας *YNB* μετά από προσθήκη 2% γλυκόζης και 2% αγαρ (*agar*), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (353). Τα δισκία με μέσο *YNB* επωάστηκαν στους 35 ^{o}C για 48 με 72 ώρες. Η ελάχιστη μυκητοκτόνος συγκέντρωση ορίστηκε ως η ελάχιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στην οποία λιγότερες από 3 (*τρεις*) αποικίες αναπτύχθηκαν το οποίο αντιστοιχεί σε μυκητοκτόνο δράση μεταξύ 99 και 99.5% (353).

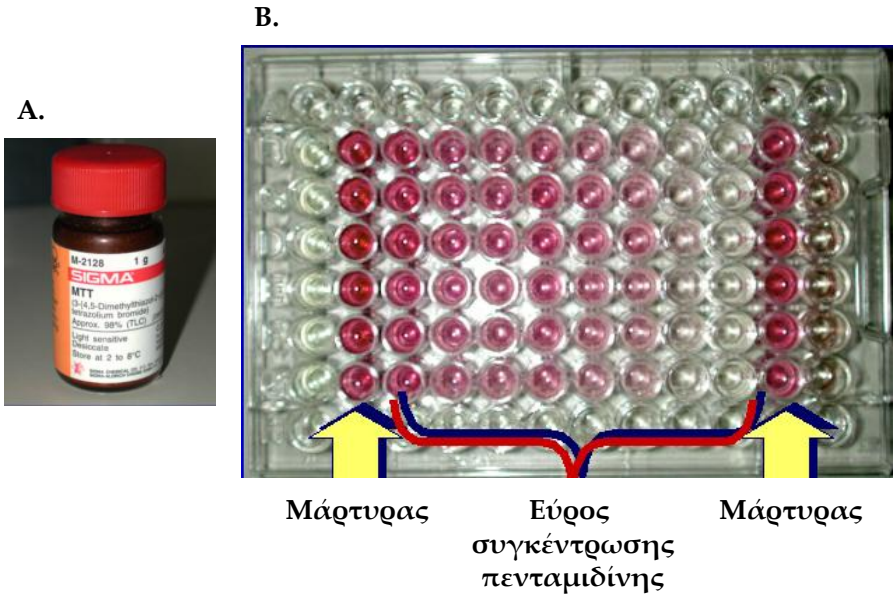
1γ. Χρωματομετρική μέθοδος *XTT*

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του τετραζολικού άλατος (*tetrazolium*) *2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-[(sulphenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide* (*XTT*) από ζωντανά κύτταρα με φυσιολογικές οξειδοαναγωγικές ικανότητες σε παράγωγα φορμαζάνης (*formazan*) τα οποία μπορούν έπειτα να μετρηθούν χρωματομετρικά (354). Τα *NCCLS microtitration plates* προετοιμάστηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω και επωάστηκαν στους 35 ^{o}C για 48 ώρες. Στη συνέχεια, 50 μl από το διάλυμα *XTT* (συγκέντρωση ίση με 1 mg/ml) προετοιμασμένο σε απεσταγμένο νερό το οποίο περιείχε 125 *mM* μεναδιόνης (*menadione*) προστέθηκε σε κάθε οπή. Η επώαση (*incubation*) συνεχίστηκε για 2 ακόμα ώρες στους 35 ^{o}C στο σκοτάδι ώστε να επιτραπεί η μετατροπή του *XTT* στα παράγωγα φορμαζάνης (*Εικόνα 34*) (354). Στη συνέχεια, οι οπτικές πυκνότητες στα 492 και 690 *nm* μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα σπεκτροφωτόμετρο (*Powerwave X Select, Biotech Instruments, Winooski, Vermont, VT*) (*Εικόνα 35*). Το χρώμα μετρήθηκε σπεκτροφωτομετρικά βάσει της σχετικής οπτικής πυκνότητας στα 492 και 690 *nm*, εκ των οποίων το δεύτερο είναι ένα μήκος κύματος αναφοράς (*control wavelength*) αφαιρούμενο από τα 492 *nm* (354).

1δ. Χρώση των στελεχών *Fusarium* με *CFDA* και *DiBAC*

Η χρώση με τις φθορίζουσες (*fluorescent*) χρωστικές *CFDA* [*5,(6)-carboxyfluorescein diacetate*] και *DiBAC* [*bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol*] πραγματοποιήθηκε με βάση τις μεθόδους που περιγράφονται από τους *Bowman* και συνερευνητές (355). Συγκεκριμένα, κονίδια από 2 (*δύο*) αντιπροσωπευτικά στελέχη *Fusarium* (το στέλεχος *Fusarium solani F16* και το στέλεχος *Fusarium oxysporum F15; Πίνακας 10*) διαλύθηκαν σε *RPMI 1640* ώστε να επιτευχθεί η διπλάσια επιθυμητή τελική συγκέντρωση (0.4 x 10^4 εώς 5 x 10^4 κονίδια/ml). Στη συνέχεια, 100 μl από αυτά τα διαλύματα προστέθηκαν σε *NCCLS microtitration plates* και επωάστηκαν για 48 ώρες στους 35 ^oC ώστε να επιτευχθεί μετατροπή (*germination*) των κονιδίων σε υφές. Στις 48 ώρες, 100 μl από τις υφές αναμίχθηκαν με 100 μl από διάφορα διαλύματα πενταμιδίνης με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις αυτές αντιστοιχούσαν στην τιμή *MIC-0* και σε τιμή ίση με 8 (*οκτώ*) φορές την *MIC-0* για το συγκεκριμένο στέλεχος *Fusarium solani* (32 και 256 μg/ml αντίστοιχα) και στην τιμή *MFC* και σε τιμή ίση με 4 (*τέσσερις*) φορές την *MFC* για το συγκεκριμένο στέλεχος *Fusarium oxysporum* (8 και 32 μg/ml αντίστοιχα).

Εικόνα 34. *XTT* χρωματομετρική μέθοδος. (Α) Η ουσία *XTT*. (Β) Διακρίνεται η ελάττωση της οπτικής πυκνότητας από τη μετατροπή του *XTT* σε παράγωγα φορμαζάνης με την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων πενταμιδίνης (από αριστερά προς τα δεξιά: 0.125 – 128 μg/ml)



Μετά από επώαση για 10 ώρες στους 35 ^oC οι υφές *Fusarium* οι οποίες είχαν εκτεθεί στις διάφορες συγκεντρώσεις πενταμιδίνης αναμείχθηκαν με το διάλυμα *CFDA* ή *DiBAC*. Πριν

την προσθήκη των χρωστικών, οι υφές φυγοκεντρήθηκαν για 5 (*πέντε*) λεπτά σε 10.000 x *g* και το μέσο καλλιέργειας *RPMI* ή *YNB* στο οποίο είχαν επωαστεί τις προηγούμενες ώρες απομακρύνθηκε με τη χρήση αποστειρωμένης πιπέτας (*pipette*). Οι υφές εν συνεχεία αναμείχθηκαν είτε με διάλυμα *MOPS 3* (στην περίπτωση χρώσης με *CFDA*) ή με διάλυμα *MOPS 7* (στην περίπτωση χρώσης με *DiBAC*). Για την πρώτη χρώση, έγινε προσθήκη *CFDA* (*Molecular Probes, Eugene, Oregon, OR*) από ένα αρχικό διάλυμα 5 mg/ml σε 100% *DMSO* με επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 50 μg/ml (355). Τα δείγματα των υφών επωάστηκαν εν συνεχεία στους 35 ^{o}C για 45 λεπτά στο σκοτάδι και μετά αποθηκεύτηκαν στον πάγο μέχρι την ανάλυση τους. Για τη δεύτερη χρώση, έγινε προσθήκη *DiBAC* (*Molecular Probes*) από ένα αρχικό διάλυμα 1 mg/ml σε 100% αιθανόλης (*ethanol*) με επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 2 μg/ml (355). Τα δείγματα των υφών εν συνεχεία επωάστηκαν στους 25 ^{o}C για 45 λεπτά στο σκοτάδι και μετά αποθηκεύτηκαν στον πάγο μέχρι την ανάλυση τους. Ως μάρτυρας, υφές από το ίδιο κλινικό στέλεχος *Fusarium oxysporum* επωάστηκε για 10 ώρες είτε με αμφοτερικίνη Β (συγκέντρωση 4 μg/ml ίση με την ελάχιστη μυκητοκτόνο συγκέντρωση του στελέχους) είτε με 1.5% υπεροξειδίου του οξυγόνου (H_2O_2).

Εικόνα 35. Σπεκτροφωτόμετρο με βάση το οποίο έγιναν οι μετρήσεις *XTT*

Μικροφωτογραφίες των υφών *Fusarium* ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο *Olympus BX-51* (*Εικόνα 36*) εξοπλισμένο με *Nomarski optics* και φθορίζον φίλτρο με *fluorescein isothiocyanate*. Οι φωτογραφίες πάρθηκαν σε μεγέθυνση x 400 με τη βοήθεια ειδικής ψηφιακής κάμερας (*Spot Diagnostics, Sterling Heights, Michigan, MI*). Ο χρόνος έκθεσης και η ισορροπία του φωτός ελέγχονταν από ένα λογισμικό πρόγραμμα (*Image Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, MD*) (355).

1ε. *Time-kill* μέθοδος με τη χρήση *XTT*

Ειδικά *microtitration plates* (*Εικόνα 33*) με 96 οπές κατασκευάστηκαν με προσθήκη πενταμιδίνης σε όλες τις παράλληλες σειρές (τελική συγκέντρωση πενταμιδίνης: από 0.125 εώς 128 μg/ml). Παράλληλα, προετοιμάστηκαν διαλύματα κονιδίων από 3 (*τρία*) στελέχη *Fusarium solani* και από 3 (*τρία*) στελέχη *Fusarium oxysporum* σε μέσο καλλιέργειας *RPMI-2* όπως περιγράφηκε προηγουμένως (τελική συγκέντρωση κονιδίων: μεταξύ 0.4 x 10^4 και 5 x 10^4/ml). Κατά την έναρξη κάθε επώασης, 100 μl από τα διαλύματα κονιδίων προστίθεντο σε κάθε οπή του *microtitration plate* τα οποία μετά επωάζονταν στους 35 ^oC. Στη συνέχεια, σε καθορισμένα τακτά χρονικά σημεία μετά την προσθήκη των κονιδίων *Fusarium* στις οπές με πενταμιδίνη (συγκεκριμένα στις 4, 12, 24, 36 και 48 ώρες), 50 μl από το διάλυμα *XTT* που παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται παραπάνω (354) προστέθηκαν στις οπές μιας συγκεκριμένης παράλληλης σειράς του *microtitration plate* που αντιστοιχούσε στην εκάστοτε χρονική στιγμή του πειράματος. Οι οπτικές πυκνότητες στα 492 και 690 *nm* υπολογίστηκαν στη συγκεκριμένη παράλληλη σειρά μετά από μια δίωρη επώαση στο σκοτάδι στους 35 ^oC. Το παραγόμενο χρώμα φορμαζάνης μετρήθηκε όπως περιγράφηκε σε παραπάνω παράγραφο (βλέπε "*Χρωματομετρική μέθοδος XTT*") (354).

Εικόνα 36. Μικροσκόπιο *Olympus BX-51* για την εμφάνιση φωτογραφιών μετά από χρώση με *CFDA* και *DiBAC*

Με αυτή τη μέθοδο, κατέστη δυνατή η μελέτη της χρονοεξαρτώμενης μετατροπής των κονιδίων *Fusarium* σε υφές και της επίδρασης των αυξανόμενων συγκεντρώσεων της πενταμιδίνης στην ανάπτυξη του υφομύκητα (*Εικόνα 37*). Ένα ανάλογο πείραμα

σχεδιάστηκε με χρήση μέσου καλλιέργειας *YNB* αντί για *RPMI-2*. Επιπλέον, με ανάλογο τρόπο μελετήθηκε η ανασταλτική επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων πενταμιδίνης μετά από προσθήκη της σε ήδη σχηματισμένες υφές 2 (*δύο*) στελεχών *Fusarium solani* και 2 (*δύο*) στελεχών *Fusarium oxysporum*.

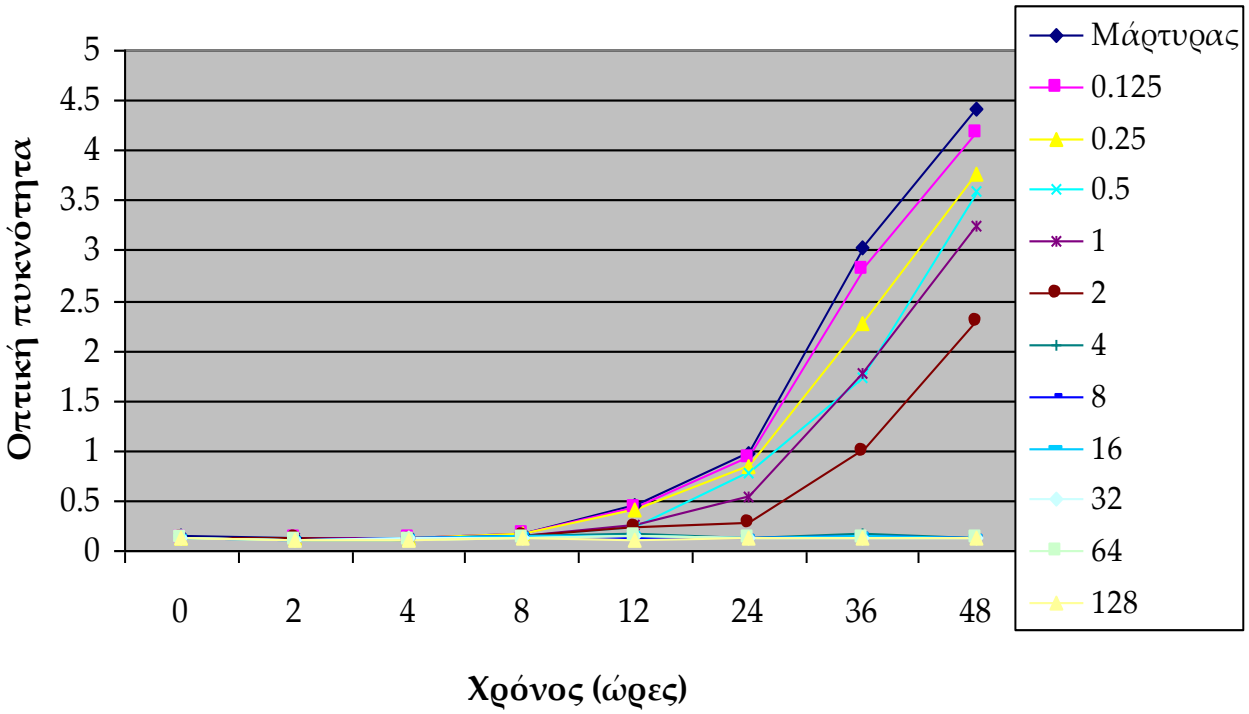
1ζ. Δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών *Fusarium* σε ένα θάλαμο με χαμηλή τάση οξυγόνου

Άλλα *microtitration plates* προετοιμάστηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω και τοποθετήθηκαν σε ειδικά διαμορφωμένους θαλάμους (*Εικόνα 38B*) που περιείχαν φακέλους οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα απελευθέρωσης αερίων (*CampyPak Plus* και *GasPak Plus* [*Εικόνα 38A*] για πρόκληση μικροαεροφιλικών [6% οξυγόνο] και αναερόβιων [0.25% οξυγόνο] συνθηκών αντίστοιχα, *Becton Dickinson and Co., Sparks, Maryland, MD*) (356, 357). Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι τιμές *MIC-2*, *MIC-0* και *MFC* της πενταμιδίνης έναντι των 10 (*δέκα*) κλινικών στελεχών *Fusarium* σε μικροαεροφιλικές και αναερόβιες συνθήκες και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές υπό αερόβιες συνθήκες. Παράλληλα, υπολογίστηκαν τις τιμές *MIC* και *MFC* των υπολοίπων αντιμυκητιασικών φαρμάκων (αμφοτερικίνη B, 5-φλουκυτοσίνη, φλουκοναζόλη, ιτρακοναζόλη, βορικοναζόλη και κασποφουγκίνη) έναντι των ίδιων στελεχών του υφομύκητα υπό τις ίδιες συνθήκες υποξίας για σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές υπό αερόβιες συνθήκες.

1η. Μέθοδος *disk diffusion susceptibility testing*

Προετοιμάστηκε ένα αρχικό διάλυμα πενταμιδίνης με συγκέντρωση ίση με 60 mg/ml σε απεσταγμένο νερό και αποθηκεύθηκε στους –70 ^{o}C μέχρι τη χρήση του. Η διενέργεια του *disk diffusion susceptibility testing* έγινε σε δισκία άγαρ με *RPMI* τα οποία είχαν προηγουμένως προετοιμαστεί χρησιμοποιώντας τυποποιημένες μεθόδους (358). Συγκεκριμένα, 200 μl από ένα βαθμονομημένο διάλυμα κονιδίων από το εκάστοτε στέλεχος του υφομύκητα *Fusarium* (συγκέντρωση ίση με 10^6 κονίδια/ml) απλώθηκε ομοιόμορφα πάνω στα δισκία με άγαρ και *RPMI*. Αφού τα τρυβλία *petri* αφέθηκαν να στεγνώσουν, ένας αποστειρωμένος χάρτινος δίσκος με διαστάσεις ίσες με το ¼ της ίντσας (*Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire, NH*) τοποθετήθηκε στο κέντρο της επιφάνειας του άγαρ και επωάστηκε με 8.3 μl από το διάλυμα της πενταμιδίνης δημιουργώντας μια τελική συγκέντρωση 20 μg/ml.

Εικόνα 38. ***Time-kill*** **μέθοδος με τη χρήση** ***XTT*****.**
Απεικονίζεται η δοσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης ενός στελέχους ***Fusarium oxysporum*** **μετά από προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων πενταμιδίνης, η οποία γίνεται περισσότερο εμφανής μετά τις πρώτες 12 ώρες της επώασης των κονιδίων** ***Fusarium***



Εικόνα 38. Φάκελος ***GasPak Plus*** **(Α) ο οποίος χρησιμοποίηθηκε μέσα στους ειδικά διαμορφωμένους θαλάμους (Β) για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών (0.25% οξυγόνο)**

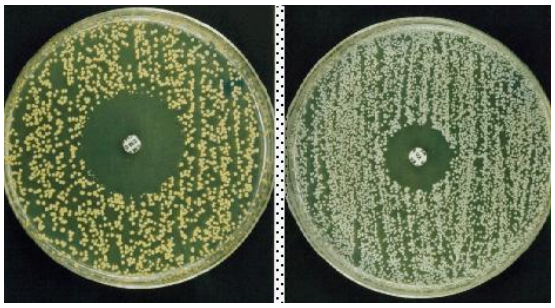
Α **Β**

Εν συνεχεία, τα τρυβλία *petri* τοποθετήθηκαν στους ειδικά διαμορφωμένους θαλάμους με τους φακέλους που παρήγαγαν μικροαεροφιλικές (6% οξυγόνο) ή αναερόβιες (0.25% οξυγόνο) συνθήκες όπως περιγράφηκε παραπάνω (356, 357) ή τοποθετήθηκαν σε συνθήκες δωματίου με φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21%). Η ακτίνα (*radius*) της ζώνης

αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα από την πενταμιδίνη μετρήθηκε με ένα μικρόμετρο μετά από 48 ώρες επώασης στους 35 ^{o}C (*Εικόνα 39*) (358).

Εκτός από την πενταμιδίνη η αμφοτερικίνη Β χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Συγκεκριμένα, 50 μl από ένα αρχικό διάλυμα αμφοτερικίνης Β (5 mg/ml σε *DMSO*) τοποθετήθηκαν πάνω στο χάρτινο δίσκο δημιουργώντας μια τελική συγκέντρωση αμφοτερικίνης Β ίσης με 10 μg/ml. Τρία διαφορετικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές ημέρες.

Εικόνα 39. ***Disk diffusion susceptibility testing***



1θ. Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές *MIC-2* και *MIC-0* της πενταμιδίνης έναντι των 10 (*δέκα*) στελεχών *Fusarium* σε μέσο καλλιέργειας *RPMI* συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές στα μέσα καλλιέργειας *RPMI-2* και *YNB*. Επιπλέον, οι τιμές *MIC-2*, *MIC-0* και *MFC* της πενταμιδίνης και οι τιμές *MIC* και *MFC* των υπόλοιπων αντιμυκητιασικών φαρμάκων έναντι των στελεχών *Fusarium solani* συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές έναντι των στελεχών non-*solani Fusarium*. Το *Mann-Whitney two-tailed t test* χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών *MIC-2*, *MIC-0* και *MFC* (359).

Επιπρόσθετα, οι τιμές *MIC-2* και *MIC-0* (όπως επίσης και οι ακτίνες της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του υφομύκητα *Fusarium*) της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών *Fusarium* υπό αερόβιες συνθήκες συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές υπό μικροαεροφιλικές ή αναερόβιες συνθήκες. Η μέθοδος *Kruskal-Wallis one-way analysis of variance with Dunn's test* χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των τιμών *MIC* με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος *GraphPad Prism 3* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, California, CA)* (359).

Οι τιμές EC_{50} και EC_{90} της πενταμιδίνης υπολογίστηκαν μέσω εισαγωγής των τιμών που υπολογίστηκαν από την *time-kill* μέθοδο με τη χρήση *XTT* σε ένα σιγμοειδικό μοντέλο δόσης-αποτελέσματος χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο:

$$y = EC_{min} + \frac{EC_{max} - EC_{min}}{1 + 10\ log^{(EC_{50}\ -\ x)Hill}}$$

όπου η τιμή *ECmin* αντιπροσωπεύει την μικρότερη συγκέντρωση πενταμιδίνης που προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του υφομύκητα, η τιμή *ECmax* αντιπροσωπεύει τη μέγιστη συγκέντρωση πενταμιδίνης που προκάλεσε μέγιστο ανασταλτικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη του υφομύκητα, και η παράμετρος *Hill* προσδιορίζει την κλίση του διαγράμματος και ονομάζεται *Hill coefficient* της καμπύλης δόσης-αποτελέσματος.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Α'

2α. Ευαισθησία των στελεχών *Fusarium* στα αντιμυκητιασικά φάρμακα και την πενταμιδίνη

Μέσω των πειραμάτων του Ειδικού Μέρους Α' βρέθηκε ότι η αμφοτερικίνη Β, η βορικοναζόλη και η πενταμιδίνη ήταν τα μοναδικά αντιμυκητιασικά φάρμακα τα οποία είχαν *in vitro* δραστικότητα έναντι των κλινικών στελεχών του υφομύκητα *Fusarium*. Αντίθετα, η 5-φλουκυτοσίνη, η φλουκοναζόλη, η ιτρακοναζόλη και η κασποφουγκίνη δεν είχαν *in vitro* δραστικότητα έναντι του υφομύκητα. Οι τιμές *MIC* και *MFC* της αμφοτερικίνης Β, 5-φλουκυτοσίνης, φλουκοναζόλης, ιτρακοναζόλης, βορικοναζόλης και κασποφουγκίνης συνοψίζονται στον *Πίνακα 11*.

Πίνακας 11. Ευαισθησία των 10 κλινικών στελεχών *Fusarium* σε διάφορα αντιμυκητιασικά φάρμακα στο μέσο καλλιέργειας *RPMI* (με βάση το πρωτόκολλο *NCCLS M38-P*)

Φάρμακο	Στελέχη *Fusarium solani* (*n* = 5)				Στελέχη non-*solani Fusarium* (*n* = 5)			
	MIC_{50}	MIC_{90}	MFC_{50}	MFC_{90}	MIC_{50}	MIC_{90}	MFC_{50}	MFC_{90}
AMB	2[α]	4	2	4	2	4	2	4
5FC	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
FLC	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
ITC	>16	>16	>16	>16	8	8	>16	>16
VRC	4[β]	8	>16[γ]	>16	1[β]	1	8[γ]	8
CAS	32	>32	>32	>32	32	>32	>32	>32

[α] οι μονάδες μέτρησης είναι σε μικρογραμμάρια ανά χιλιόλιτρο (μg/ml)
[β] $P = 0.09$ για τις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (*MICs*) της βορικοναζόλης έναντι των στελεχών *Fusarium solani* σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές *MICs* έναντι των στελεχών non-*solani Fusarium*
[γ] $P < 0.05$ για τις ελάχιστες μυκητοκτόνες συγκεντρώσεις (*MFCs*) της βορικοναζόλης έναντι των στελεχών *Fusarium solani* σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές *MFCs* έναντι των στελεχών non-*solani Fusarium*
AMB: αμφοτερικίνη Β, *5FC*: 5-φλουκυτοσίνη, *FLC*: φλουκοναζόλη, *ITC*: ιτρακοναζόλη, *VRC*: βορικοναζόλη, *CAS*: κασποφουγκίνη
MIC_{50}: Η τιμή *MIC* που αναστέλει την ανάπτυξη του 50% των στελεχών *Fusarium*
MIC_{90}: Η τιμή *MIC* που αναστέλει την ανάπτυξη του 90% των στελεχών *Fusarium*
MFC_{50}: Η τιμή *MFC* που σκοτώνει το 50% των στελεχών *Fusarium*
MFC_{90}: Η τιμή *MFC* που σκοτώνει το 90% των στελεχών *Fusarium*

Πιο συγκεκριμένα, η αμφοτερικίνη Β είχε παρόμοια μυκητοκτόνο (*fungicidal*) δράση έναντι των στελεχών *Fusarium solani* και έναντι των στελεχών non-*solani Fusarium*. Αντίθετα,

η βορικοναζόλη ήταν μυκητοκτόνος έναντι των στελεχών *Fusarium* non-*solani*, αλλά είχε μυκητοστατική (*fungistatic*) και ασθενέστερη δραστικότητα έναντι των στελεχών *Fusarium solani*. Η ιτρακοναζόλη είχε μόνο μικρή μυκητοστατική δράση έναντι των στελεχών *Fusarium* non-*solani* αλλά δεν είχε καμιά δραστικότητα έναντι των στελεχών *Fusarium solani*.

Οι τιμές *MIC-2*, *MIC-0* και *MFC* της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών *Fusarium* στα μέσα καλλιέργειας *RPMI* και *YNB* απεικονίζονται στον *Πίνακα 12*. Συγκεκριμένα, η πενταμιδίνη είχε *in vitro* δραστικότητα έναντι όλων των 10 στελεχών του υφομύκητα *Fusarium* στα οποία έγιναν πειράματα. Όμως, οι τιμές *MIC* της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών *Fusarium* non-*solani* ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές έναντι των στελεχών *Fusarium solani* ($P < 0.05$). Επιπρόσθετα, με βάση τον υπολογισμό του κλάσματος *MFC/MIC* (όπου κάθε κλάσμα ≤ 8 ισοδυναμεί με μυκητοκτόνο δράση του φαρμάκου), η πενταμιδίνη ήταν μυκητοκτόνος έναντι όλων των στελεχών *Fusarium* non-*solani* και ενός στελέχους *Fusarium solani*, ενώ είχε μυκητοστατική δράση έναντι των υπολοίπων 4 στελεχών *Fusarium solani*. Οι τιμές *MIC* της πενταμιδίνης ήταν πανομοιότυπες στα μέσα καλλιέργειας *RPMI* και *RPMI-2* (οι τιμές για το μέσο καλλιέργειας *RPMI-2* ως εκ τούτου δεν έχουν συμπεριληφθεί στον *Πίνακα 12*), αλλά οι αντίστοιχες τιμές *MIC* ήταν πολύ χαμηλότερες στο μέσο καλλιέργειας *YNB* ($P < 0.001$). Αντίθετα, οι τιμές *MFC* της πενταμιδίνης στα μέσα καλλιέργειας *RPMI*, *RPMI-2* και *YNB* δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (*Πίνακας 12*).

Επιπλέον, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων με βάση το πρωτόκολλο *NCCLS M38-P*, τα πειράματα με τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing* έδειξαν ότι η ακτίνα της ζώνης αναστολής ανάπτυξης των στελεχών *Fusarium* non-*solani* από την πενταμιδίνη ήταν μικρότερες από τις αντίστοιχες ακτίνες αναστολής ανάπτυξης των στελεχών *Fusarium solani*. Συγκεκριμένα, η μέση ακτίνα για τα στελέχη *Fusarium solani* ήταν 5.867 χιλιοστά (*mm*) με μέση διακύμανση (*standard deviation*) ± 2.694 χιλιοστά, ενώ η αντίστοιχη μέση ακτίνα για τα στελέχη *Fusarium* non-*solani* ήταν 14.66 χιλιοστά με μέση διακύμανση ± 1.65 χιλιοστά ($P < 0.05$).

Πίνακας 12. Τιμές *MIC-2*, *MIC-0* και *MFC* της πενταμιδίνης έναντι 10 κλινικών στελεχών *Fusarium* σε μέσο καλλιέργειας *RPMI* και *YNB* (πρωτόκολλο *NCCLS M38-P*)

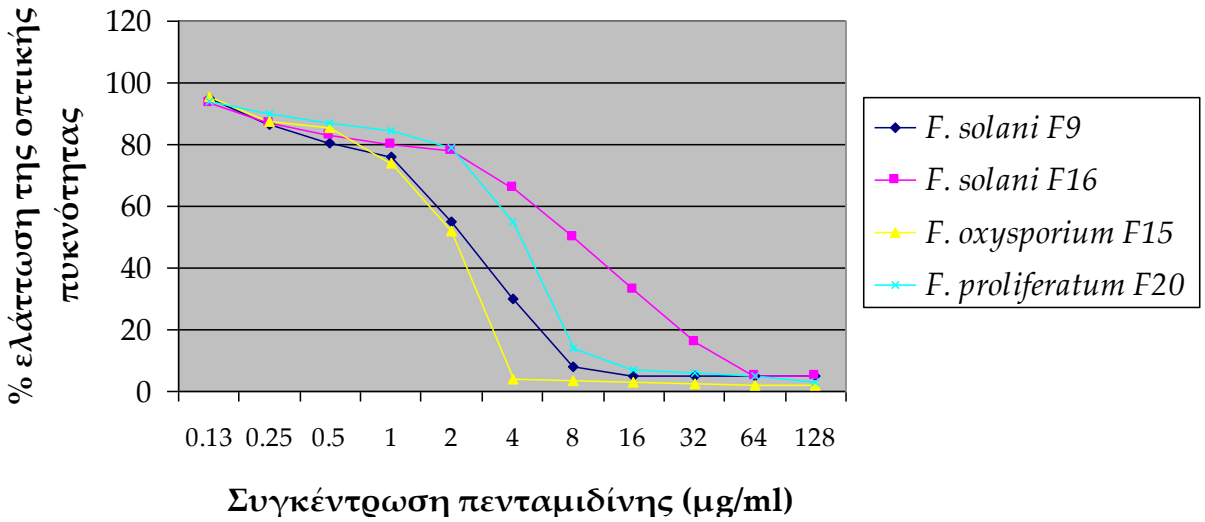
Είδος *Fusarium* (αριθμός στελεχών)	Μέσο καλλιέργειας *RPMI*			Μέσο καλλιέργειας *YNB*		
	MIC_{50} (εύρος, μέσος όρος)		MFC_{50} (εύρος, μέσος όρος)	MIC_{50} (εύρος, μέσος όρος)		MFC_{50} (εύρος, μέσος όρος)
	MIC-2[α]	MIC-0[β]		MIC-2[α]	MIC-0[β]	
***Fusarium solani* (5)**	4[ζ] (2-4, 3.6)[γ]	32 (8-32, 24)[δ]	>128 (8->128, 206.4)[δ]	1 (1-2, 1.4)	8 (4-16, 10.4)	>128 (8->128, 206.4)
Non-*solani Fusarium* (5)	2 (1-2, 1.8)[γ]	8 (4-8, 6.4)[δ]	8 (4-16, 8.8)[ε]	0.5 (0.5-1, 0.6)	1 (1-2, 1.2)	8 (4-8 6.4)

[α] ***P* < 0.001 για τις τιμές *MIC-2* της πενταμιδίνης έναντι του *Fusarium* σε μέσο καλλιέργειας *RPMI* σε σχέση με το μέσο καλλιέργειας *YNB***
[β] ***P* < 0.05 για τις τιμές *MIC-0* της πενταμιδίνης έναντι του *Fusarium* σε μέσο καλλιέργειας *RPMI* σε σχέση με το μέσο καλλιέργειας *YNB***
[γ] ***P* < 0.05 για τις τιμές *MIC-2* της πενταμιδίνης έναντι στελεχών *Fusarium solani* σε σχέση με στελέχη non-*solani Fusarium***
[δ] ***P* < 0.05 για τις τιμές *MIC-0* της πενταμιδίνης έναντι στελεχών *Fusarium solani* σε σχέση με στελέχη non-*solani Fusarium***
[ε] ***P* < 0.001 για τις τιμές *MFC* της πενταμιδίνης έναντι στελεχών *Fusarium solani* σε σχέση με στελέχη non-*solani Fusarium***
[ζ] **οι μονάδες μέτρησης είναι σε μικρογραμμάρια ανά χιλιόλιτρο (μg/ml)**

2β. Σύγκριση των οπτικών (μέθοδος *NCCLS*) και σπεκτροφωτομετρικών (μέθοδος *XTT*) τιμών ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*MIC*) έναντι του υφομύκητα *Fusarium*

Οι τιμές *MIC-2* και *MIC-0* της πενταμιδίνης με βάση τη σπεκτροφωτομετρική μέθοδο *XTT* ήταν παρόμοιες με τις ανάλογες τιμές οι οποίες καθορίστηκαν οπτικά με βάση τη μέθοδο *NCCLS M-38P*. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την τιμή *MIC-2*, σε 8 από τα 10 κλινικά στελέχη *Fusarium* οι τιμές *MIC-2* ήταν πανομοιότυπες μετρώμενες οπτικά ή σπεκτροφωτομετρικά, ενώ στα 2 υπόλοιπα στελέχη οι παραπάνω τιμές διέφεραν κατά μία κλίμακα συγκέντρωσης (*Εικόνα 39*). Αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας την τιμή *MIC-0*, σε 9 από τα 10 στελέχη *Fusarium* οι τιμές *MIC-0* ήταν πανομοιότυπες μετρώμενες οπτικά ή σπεκτροφωτομετρικά, ενώ στο ένα εναπομείνον στέλεχος οι ανωτέρω τιμές διέφεραν κατά μία κλίμακα συγκέντρωσης (*Εικόνα 40*).

Εικόνα 40. Δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι 4 κλινικών στελεχών *Fusarium* με βάση τη σπεκτροφωτομετρική μέθοδο *XTT*



Στο διάγραμμα φαίνεται η εκατοστιαία ελάττωση της οπτικής πυκνότητας με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις πενταμιδίνης. Απεικονίζονται δύο στελέχη *Fusarium solani* και από ένα στέλεχος *Fusarium oxysporum* και *Fusarium proliferatum*. Οι τιμές *MIC-2* των στελεχών *F9, F16, F15* και *F20* με βάση τη μέθοδο *NCCLS* ήταν 1, 4, 1 και 2 μg/ml αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, οι τιμές αυτές είναι σε πλήρη αναλογία με το σημείο που η ελάττωση της οπτικής πυκνότητας φτάνει το 50%. Ανάλογα, οι τιμές *MIC-0* των στελεχών *F9, F16, F15* και *F20* με βάση τη μέθοδο *NCCLS* ήταν 4, 32, 2 και 4 μg/ml, οι οποίες είναι σε πλήρη αντιστοιχία με τα σημεία που η ελάττωση της οπτικής συχνότητας φτάνει το 100%.

Αντίστοιχα, σε 9 από τα 10 στελέχη του υφομύκητα *Fusarium* οι τιμές *MIC* της αμφοτερικίνης Β ήταν πανομοιότυπες μετρώμενες σπεκτροφωτομετρικά ή οπτικά. Στην *Εικόνα 40* απεικονίζεται η εκατοστιαία ελάττωση της οπτικής πυκνότητας κατά τη διενέργεια της σπεκτροφωτομετρικής μεθόδου *XTT* με προσθήκη αυξανόμενων

συγκεντρώσεων πενταμιδίνης έναντι 4 στελεχών *Fusarium* (2 *Fusarium solani*, 1 *Fusarium oxysporum* και 1 *Fusarium proliferatum*).

2γ. Φαρμακοδυναμική ανάλυση της δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* με βάση τη μέθοδο *XTT*

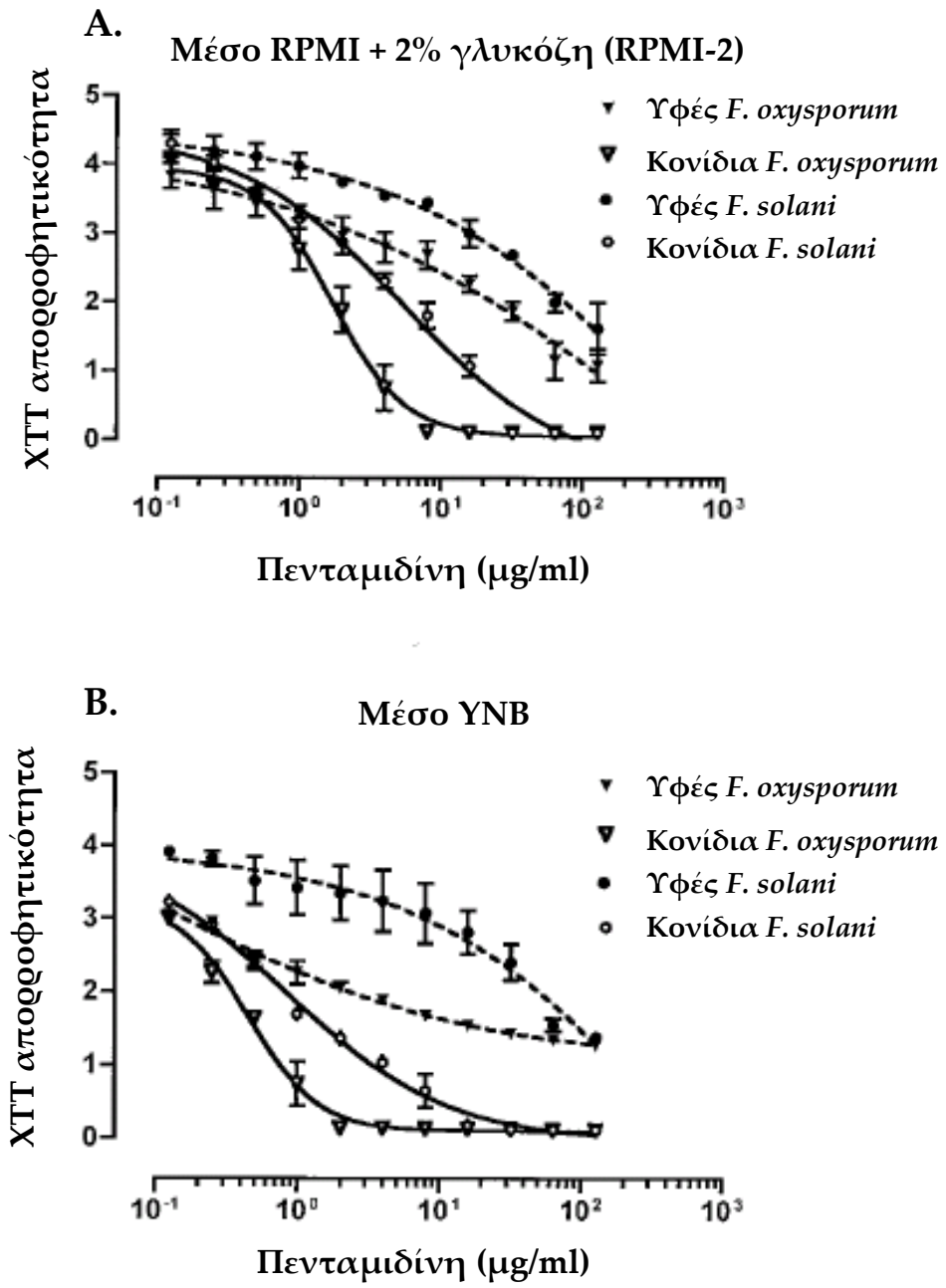
Δημιουργήθηκαν καμπύλες δόσης–αποτελέσματος της πενταμιδίνης και υπολογίστηκε η αποτελεσματική συγκέντρωση (*effective concentration; EC*) της πενταμιδίνης που προκάλεσε 50% (EC_{50}) και 90% (EC_{90}) ελάττωση στην απορρόφηση (*absorbance*) του *XTT* σε σύγκριση με την απορρόφηση του *XTT* χωρίς την επίδραση κάποιου αντιμυκητιασικού φαρμάκου. Ο υπολογισμός των παραπάνω συγκεντρώσεων έγινε 48 ώρες μετά την προσθήκη της πενταμιδίνης. Οι τιμές EC_{50} και EC_{90} της πενταμιδίνης έναντι των δύο αναπτυξιακών μορφών (κονίδια, υφές) των στελεχών του *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum* σε δύο διαφορετικά μέσα καλλιέργειας (*RPMI-2*, *YNB*) συνοψίζονται στον *Πίνακα 13*.

Πίνακας 13. Φαρμακοδυναμική ανάλυση (με βάση τη χρωματομετρική μέθοδο *XTT*) της δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι δύο ειδών *Fusarium*, έναντι των δύο αναπτυξιακών μορφών του υφομύκητα, σε δύο μέσα καλλιέργειας [α]

Μέσο καλλιέργειας	Είδος *Fusarium*	Αναπτυξιακή μορφή υφομύκητα	Συγκέντρωση πενταμιδίνης (μg/ml)	
			EC_{50}	EC_{90}
RPMI-2	*Fusarium solani*	Κονίδια	3.9	29.7
		Υφές	53.1	>128
	Fusarium oxysporum	Κονίδια	1.6	5.8
		Υφές	30.3	>128
YNB	*Fusarium solani*	Κονίδια	1.4	8.6
		Υφές	50.5	>128
	Fusarium oxysporum	Κονίδια	0.5	1.57
		Υφές	17.8	>128

[α] Η φαρμακοδυναμική ανάλυση της πενταμιδίνης έναντι των κονιδίων του υφομύκητα βασίστηκε σε τρία στελέχη *Fusarium solani* και τρία στελέχη *Fusarium oxysporum*, ενώ η ανάλυση έναντι των υφών του υφομύκητα βασίστηκε σε δύο στελέχη *Fusarium solani* και δύο στελέχη *Fusarium oxysporum*.

Εικόνα 41. Φαρμακοδυναμική ανάλυση (με βάση τη σπεκτροφασματοσκοπική μέθοδο *XTT*) της δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι στελεχών *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum* στις δύο αναπτυξιακές μορφές του υφομύκητα (κονίδια και υφές) σε δύο διαφορετικά μέσα καλλιέργειας (*RMPI-2* και *YNB*)



Τα παραπάνω γραφήματα απεικονίζουν την ελάττωση της απορρόφησης (*absorbance*) *XTT* η οποία προκλήθηκε από την δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι κονιδίων (3 στελέχη *Fusarium solani* και 3 *Fusarium oxysporum*) και υφών (2 στελέχη *Fusarium solani* και 2 *Fusarium oxysporum*) σε μέσο καλλιέργειας *RPMI-2* (A) και *YNB* (B). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν *standard deviations*, οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις καμπύλες υφών και οι συνεχείς γραμμές απεικονίζουν τις καμπύλες κονιδίων. Στα πειράματα με αφετηρία τα κονίδια *Fusarium*, η πενταμιδίνη αναχαίτησε τη μετατροπή (*germination*) των κονιδίων σε υφές με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, η μετατροπή των κονιδίων σε υφές υπέστη καθολική αναστολή σε συγκέντρωση πενταμιδίνης ίση με τιν τιμή *MIC-0* των στελεχών. Σε μια

συγκέντρωση παραπλήσια της τιμής *MIC-2* για τα εκάστοτε στελέχη η πενταμιδίνη προκάλεσε περίπου 50% ελάττωση της απορρόφησης *XTT* σε σχέση με την απορρόφηση *XTT* που παρατηρήθηκε χωρίς την προσθήκη κάποιου φαρμάκου. Στα πειράματα με αφετηρία τις υφές *Fusarium*, η πενταμιδίνη ανέστειλε την περαιτέρω αύξηση της απορρόφησης *XTT* σε σχέση με την απορρόφηση που παρατηρήθηκε χωρίς την προσθήκη κάποιου φαρμάκου με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Όμως, η πενταμιδίνη δεν προκάλεσε ολική αναστολή της ανάπτυξης των υφών σε κανένα από τα στελέχη *Fusarium* που μελετήθηκαν.

Η πενταμιδίνη είχε μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι των κονιδίων του υφομύκητα *Fusarium* σε σχέση με τη δραστικότητα της έναντι των υφών *Fusarium* (*Εικόνα 41*). Επίσης, σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα με τις μεθόδους *NCCLS M38-P* και *disk diffusion susceptibility testing*, οι τιμές EC_{50} και EC_{90} της πενταμιδίνης ήταν χαμηλότερες έναντι των στελεχών *Fusarium oxysporum* σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές έναντι των στελεχών *Fusarium solani* όπως επίσης και σε μέσο καλλιέργειας *YNB* σε σχέση με το μέσο καλλιέργειας *RPMI-2*.

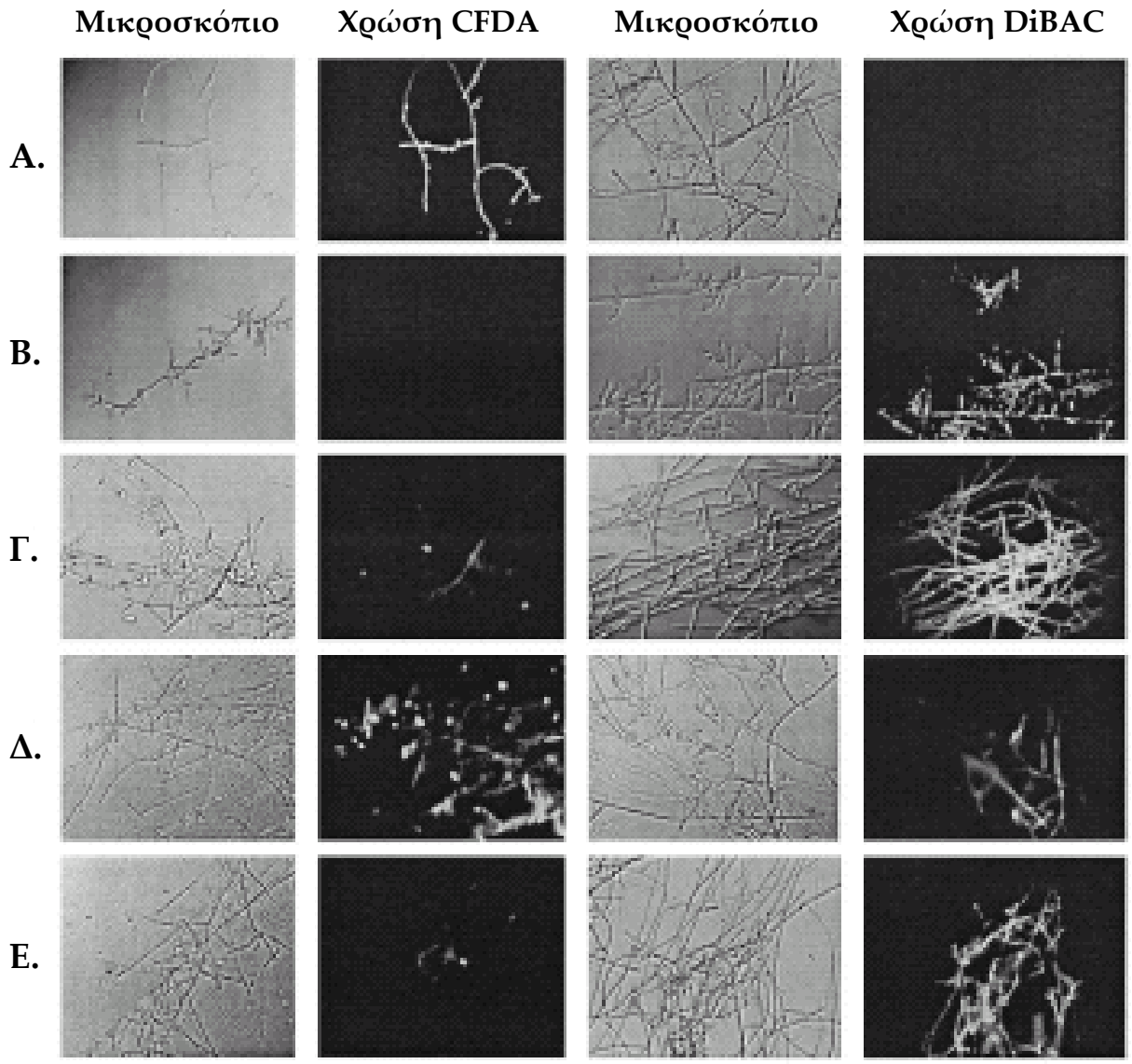
2δ. Χρώση στελεχών *Fusarium* με *CFDA* και *DiBAC*

Μετά από χρώση των στελεχών του υφομύκητα *Fusarium* με τις χρώσεις *CFDA* και *DiBAC* διαπιστώθηκε ότι η πενταμιδίνη προκάλεσε την καταστροφή κορυφαίων (*apical*) και υποκορυφαίων (*subapical*) τμημάτων ζωντανών υφών *Fusarium oxysporum* σε μια συγκέντρωση ίση με την ελάχιστη μυκητοκτόνο συγκέντρωση (*MFC*) για το συγκεκριμένο κλινικό στέλεχος. Αυτή η μυκητοκτόνος δράση της πενταμιδίνης ήταν περισσότερο εμφανής όταν οι υφές *Fusarium* εκτέθηκαν σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πενταμιδίνης. Οι *Εικονες 42Δ* και *42Ε* απεικονίζουν τις χρώσεις *CFDA* και *DiBAC* ενός στελέχους *Fusarium oxysporum* μετά από έκθεση σε πενταμιδίνη (σε συγκεντρώσεις ίσες με την *MFC* και 4 φορές την *MFC* αντίστοιχα). Αξιοσημείωτο επίσης ήταν το γεγονός ότι η αμφοτερικίνη Β δεν προκάλεσε την καταστροφή όλων των τμημάτων των υφών του υφομύκητα σε συγκέντρωση ίση με την τιμή *MFC* του συγκεκριμένου στελέχους (*Εικόνα 42Γ*). Στις *Εικόνες 43* και *44* απεικονίζονται περισσότερες έγχρωμες εικόνες μετά από χρώση των υφών *Fusarium oxysporum* εκτεθειμένων σε πενταμιδίνη με *CFDA* και *DiBAC* αντίστοιχα.

Επιπλέον, στις υφές του στελέχους *Fusarium solani* που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα η πενταμιδίνη δεν είχε μυκητοκτόνο δράση όταν προστέθηκε σε συγκέντρωση ίση με την τιμή *MIC-0* του στελέχους. Όμως, σε μια αρκετά μεγαλύτερη συγκέντρωση (ίση με 8 φορές

την τιμή *MIC-0* του συγκεκριμένου στελέχους) η πενταμιδίνη προκάλεσε την καταστροφή μεγάλων τμημάτων των υφών *Fusarium solani* (*Εικόνα 45*).

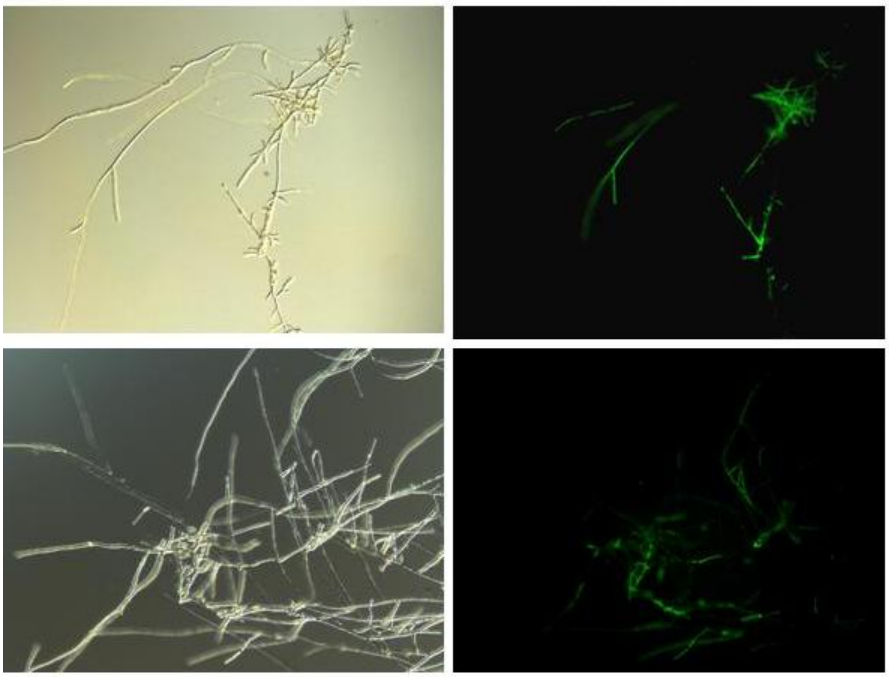
Εικόνα 42. *CFDA* και *DiBAC* χρώσεις υφών ενός στελέχους *Fusarium oxysporum* μετά από έκθεση σε υπεροξείδιο του οξυγόνου (H_2O_2), αμφοτερικίνη Β και πενταμιδίνη



Απεικονίζονται οι υφές του στελέχους *Fusarium oxysporum* που δεν έχουν εκτεθεί σε κανένα αντιμυκητιασικό φάρμακο (Α), οι υφές μετά από έκθεση τους σε 1.5% H_2O_2 (Β), και οι υφές μετά από έκθεση τους σε αμφοτερικίνη Β (συγκέντρωση ίση με την *MFC* του συγκεκριμένου στελέχους, 4 μg/ml) (Γ), σε πενταμιδίνη (συγκέντρωση ίση με την *MFC* του συγκεκριμένου στελέχους, 8 μg/ml) (Δ) και συγκέντρωση ίση με τέσσερις φορές την *MFC* του συγκεκριμένου στελέχους, 32 μg/ml (Ε).

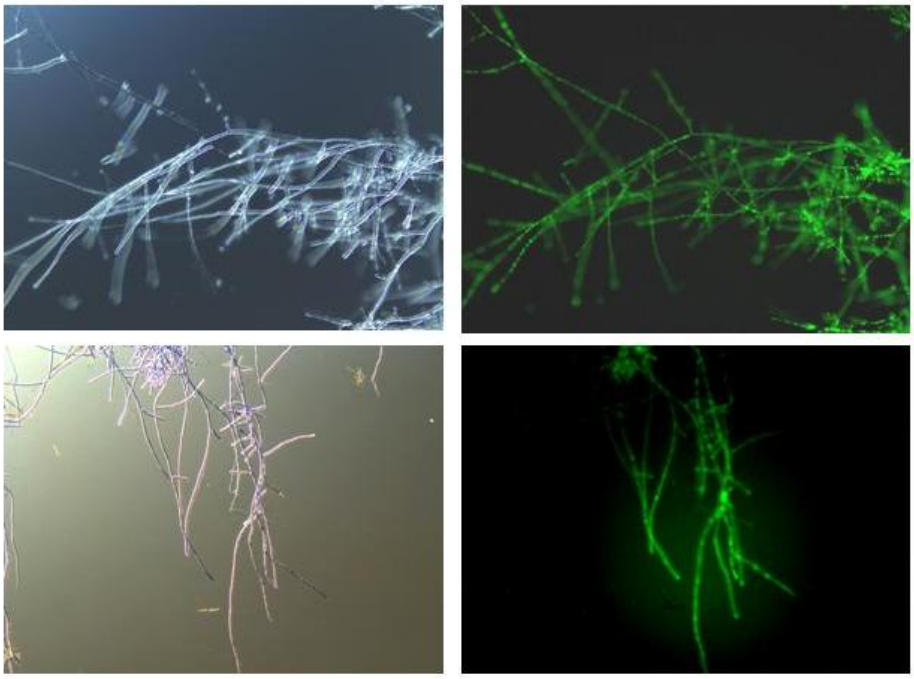
Εικόνα 43. Χρώση με *CFDA* υφών του στελέχους *Fusarium oxysporum F15* μετά από έκθεση τους σε πενταμιδίνη (συγκέντρωση ίση με την τιμή *MFC* του στελέχους, 8 μg/ml). Απεικονίζονται τμήματα υφών που είναι ζωντανά (με πράσινο) μετά από έκθεση τους σε πενταμιδίνη. Τα τμήματα υφών που δεν απεικονίζονται αναλογούν σε υφές που έχουν υποστεί καταστροφή

Μικροσκόπιο **Χρώση CFDA**

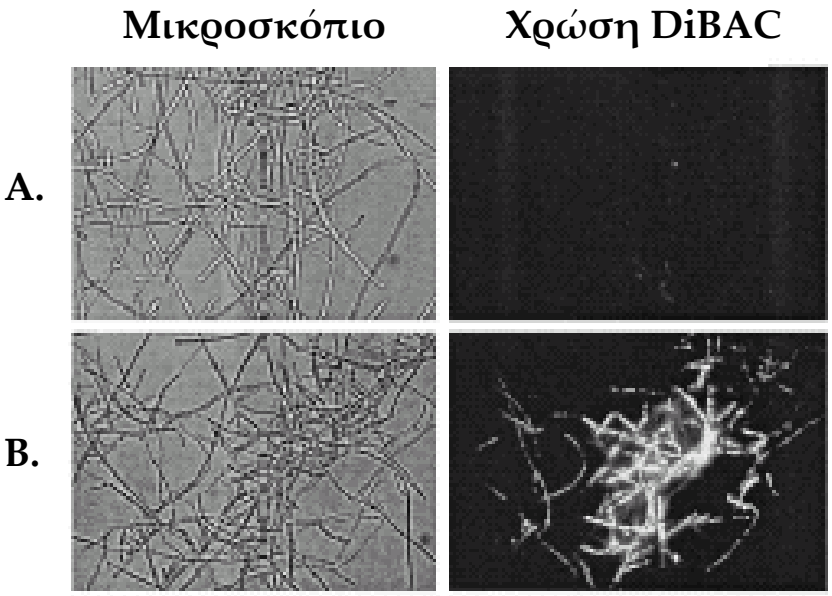


Εικόνα 44. Χρώση με *DiBAC* υφών του στελέχους *Fusarium oxysporum F15* μετά από έκθεση τους σε πενταμιδίνη (συγκέντρωση ίση με την τιμή *MFC* του στελέχους, 8 μg/ml). Απεικονίζονται τμήματα υφών που είναι νεκρά (με πράσινο) μετά από έκθεση τους στην πενταμιδίνη. Τα τμήματα υφών που δεν απεικονίζονται αναλογούν σε ζωντανές υφές

Μικροσκόπιο **Χρώση DiBAC**



Εικόνα 45. Χρώση με *DiBAC* υφών του στελέχους *Fusarium solani F16* μετά από έκθεση τους σε πενταμιδίνη. Απεικονίζονται υφές εκτεθειμένες σε συγκέντρωση πενταμιδίνης ίση με την τιμή *MIC-0* (32 μg/ml) (A) και ίση με 8 φορές την τιμή *MIC-0* του στελέχους (256 μg/ml) (B)



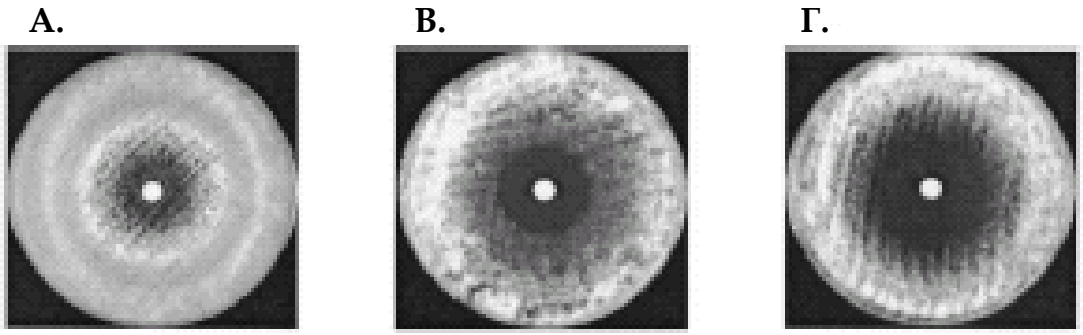
2ε. Δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* υπό συνθήκες υποξίας

Με βάση τη μέθοδο *NCCLS M38-P* οι τιμές *MIC-2* και *MIC-0* της πενταμιδίνης ήταν χαμηλότερες υπό μικροαεροφιλικές (6% οξυγόνο) και αναερόβιες (0.25% οξυγόνο) συνθήκες οξυγόνου σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% οξυγόνο) (*Πίνακας 14*). Αντίθετα, οι τιμές *MFC* της πενταμιδίνης υπό συνθήκες υποξίας έναντι όλων των στελεχών *Fusarium* δεν διέφεραν από τις αντίστοιχες τιμές *MFC* υπό αερόβιες συνθήκες. Επίσης, η χαμηλή τάση οξυγόνου δεν επηρέασε τις τιμές *MIC* και *MFC* των υπολοίπων αντιμυκητιασικών φαρμάκων που μελετήθηκαν (αμφοτερικίνη Β, 5-φλουκυτοσίνη, φλουκοναζόλη, ιτρακοναζόλη, βορικοναζόλη και κασποφουγκίνη).

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing* διαπιστώθηκε ότι η ακτίνα της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα *Fusarium* από την πενταμιδίνη ήταν μεγαλύτερη υπό συνθήκες υποξίας σε σχέση με την αντίστοιχη ακτίνα υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ($P < 0.05$) (*Πίνακας 15*) (*Εικόνα 46*). Αντίθετα, η ακτίνα της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα *Fusarium* από την αμφοτερικίνη Β δεν επηρεάστηκε από τις διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος της ακτίνας της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα από την

αμφοτερικίνη Β σε αερόβιες, μικροαεροφιλικές και αναερόβιες συνθήκες ήταν 1.83, 1.73 και 1.92 χιλιοστά αντίστοιχα ($P = 0.71$).

Εικόνα 46. Επίδραση της πενταμιδίνης με βάση τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing* έναντι ένος κλινικού στελέχους *Fusarium solani* υπό διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου: φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (Α), μικροαεροφιλικές συνθήκες οξυγόνου (Β), και αναερόβιες συνθήκες οξυγόνου (Γ). Κάθε χάρτινος δίσκος περιέχει 8.3 μl πενταμιδίνης από ένα αρχικό διάλυμα 60 mg/ml (τελική συγκέντρωση 20 μg/ml)



Πίνακας 14. *Disk diffusion susceptibility testing* της πενταμιδίνης έναντι στελεχών *Fusarium* υπό διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου

Είδος *Fusarium* (αριθμός στελεχών)	Μέσος όρος ± *standard deviation* της ακτίνας (σε χιλιοστά) αναστολής της ζώνης ανάπτυξης του υφομύκητα από την πενταμιδίνη [α]		
	Αερόβιες συνθήκες	Μικροαεροφιλικές συνθήκες	Αναερόβιες συνθήκες
Όλα τα στελέχη *Fusarium* (10)	10.267 ± 3.829 [β]	17.283 ± 3.695	20.783 ± 5.168 [β]
Fusarium solani (5)	5.687 ± 2.694 [γ,δ]	13.2 ± 3.532	16.6 ± 3.227 [δ]
Non-*solani* *Fusarium* (5)	14.66 ± 1.65 [γ,ε]	21.367 ± 2.162	24.967 ± 2.434 [ε]

[α] Κάθε δίσκος περιείχε 8.3 μl πενταμιδίνης από ένα αρχικό διάλυμα 60 mg/ml
[β] $P < 0.05$ για τις ακτίνες των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των στελεχών *Fusarium* από την πενταμιδίνη σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με αναερόβιες συνθήκες
[γ] $P < 0.05$ για τις ακτίνες των ζωνών αναστολής ανάπτυξης από την πενταμιδίνη έναντι στελεχών *Fusarium solani* σε σχέση με στελέχη non-*solani Fusarium* σε αερόβιες συνθήκες
[δ] $P < 0.05$ για τις ακτίνες των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των στελεχών *Fusarium solani* από την πενταμιδίνη σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με αναερόβιες συνθήκες
[ε] $P < 0.05$ για τις ακτίνες των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των στελεχών non-*solani Fusarium* από την πενταμιδίνη σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με αναερόβιες συνθήκες

Πίνακας 15. Οι τιμές *MIC-2* και *MIC-0* της πενταμιδίνης έναντι 10 κλινικών στελεχών *Fusarium* υπό διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου σε μέσο καλλιέργειας *RPMI* με βάση το πρωτόκολλο *NCCLS M-38P*

Είδος *Fusarium* (αριθμός στελεχών)	*MIC*$_{50}$ [δ] (εύρος, μέσος όρος)					
	Αερόβιες συνθήκες (21% οξυγόνο)		Μικροαεροφιλικές συνθήκες (6% οξυγόνο)		Αναερόβιες συνθήκες (0.25% οξυγόνο)	
	MIC-2[α,β]	*MIC-0*[γ]	*MIC-2*[α]	*MIC-0*	*MIC-2*[β]	*MIC-0*[γ]
Fusarium solani (5)	4 (2-4, 3.6)	32 (8-32, 24)	2 (1-2, 1.8)	16 (8-16, 12.8)	1 (1-2, 1.2)	8 (4-16, 8.8)
Non-*solani* *Fusarium* (5)	2 (1-2, 1.8)	8 (4-8, 6.4)	0.5 (0.5-1, 0.6)	2 (1-2, 1.6)	0.25 (0.125-0.5, 0.22)	1 (0.5-1, 0.9)

[α] $P < 0.05$ για τις τιμές MIC-2 της πενταμιδίνης έναντι στελεχών *Fusarium* σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με μικροαεροφιλικές συνθήκες
[β] $P < 0.001$ για τις τιμές MIC-2 της πενταμιδίνης έναντι στελεχών *Fusarium* σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με αναερόβιες συνθήκες
[γ] $P < 0.05$ για τις τιμές MIC-0 της πενταμιδίνης έναντι στελεχών *Fusarium* σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με αναερόβιες συνθήκες
[δ] *MIC*$_{50}$: Η τιμή *MIC* που αναστέλει την ανάπτυξη του 50% των στελεχών *Fusarium*

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Α'

Στο πρώτο αυτό μέρος των *in vitro* πειραμάτων της διδακτορικής διατριβής εξετάστηκε η *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι 10 (*δέκα*) κλινικών στελεχών του υφομύκητα *Fusarium*, έναντι των δύο αναπτυξιακών μορφών του υφομύκητα (κονίδια, υφές) σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* μελετήθηκε σε περισσότερα από ένα μέσα καλλιέργειας (*RPMI*, *RPMI-2*, *YNB*) χρησιμοποιώντας περισσότερες από μια μικροβιολογικές μεθόδους (*NCCLS*, *disk diffusion susceptibility testing*) με σκοπό να καταδειχθεί με αδιαμφισβήτητο τρόπο ότι η πενταμιδίνη έχει δραστικότητα η οποία είναι ανεξάρτητη από μεταβλητές όπως το χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας ή η εφαρμοσθείσα μικροβιολογική μεθοδος.

Η ευαισθησία των στελεχών *Fusarium* έναντι των υπόλοιπων (εκτός της πενταμιδίνης) αντιμυκητιασικών φαρμάκων ήταν παρόμοια με αυτή που έχει δημοσιευθεί σε προηγούμενες ερευνητικές μελέτες (210–213, 257, 263, 264, 266, 267, 271, 280–283). Συγκεκριμένα, η αμφοτερικίνη Β και η βορικοναζόλη ήταν τα μοναδικά δραστικά αντιμυκητιασικά φάρμακα έναντι του υφομύκητα. Όμως, οι τιμές MIC_{50} και MFC_{50} της αμφοτερικίνης Β ήταν μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις αμφοτερικίνης Β που μπορούν να επιτευχθούν στο πνευμονικό παρέγχυμα ασθενών (0.5 μg/ml) που λαμβάνουν συνήθεις δόσεις του φαρμάκου (0.5 – 1 mg/Kg/ημέρα) (214). Επίσης, η δραστικότητα της βορικοναζόλης ήταν άμεσα εξαρτώμενη από το είδος του στελέχους *Fusarium*. Έτσι, ενώ η βορικοναζόλη ήταν μυκητοκτόνος και είχε αρκετά χαμηλές τιμές *MIC* έναντι των στελεχών non-*solani Fusarium*, είχε μέτρια μυκητοστατική δράση έναντι των στελεχών *Fusarium solani*. Επίσης, όπως έχει δημοσιευθεί σε αρκετές προηγούμενες μελέτες, η φλουκοναζόλη, η ιτρακοναζόλη και η κασποφουγκίνη δεν είχαν *in vitro* δραστικότητα έναντι των στελεχών *Fusarium* (210, 211, 213, 257, 280).

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η πενταμιδίνη είχε αξιοσημείωτη *in vitro* δραστικότητα έναντι όλων των κλινικών στελεχών του υφομύκητα *Fusarium* που εξετάστηκαν. Η πενταμιδίνη είχε μεγαλύτερη δραστικότητα και ήταν μυκητοκτόνος έναντι των στελεχών non-*solani Fusarium*, ενώ είχε μυκητοστατική δράση έναντι της πλειοψηφίας των κλινικών στελεχών *Fusarium solani*. Πολλές ερευνητικές μελέτες στο παρελθόν έχουν καταδείξει ότι το είδος *Fusarium solani* είναι εν γένει πιο ανθεκτικό στα αντιμυκητιασικά φάρμακα σε αντίθεση με τα είδη non-*solani Fusarium* (210–213, 257, 263, 264, 266, 267, 271).

Όπως σε εκείνες τις μελέτες έτσι και στη παρούσα διδακτορική διατριβή, η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα (*resistance*) των στελεχών *Fusarium solani* έναντι των αντιστοίχων στελεχών non-*solani Fusarium* παρατηρήθηκε εκτός από την πενταμιδίνη και με τις νέας γενιάς τριαζόλες, ιτρακοναζόλη και βορικοναζόλη.

Επιπρόσθετα, η *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του *Fusarium* δεν ήταν εξαρτώμενη από το μέσο καλλιέργειας στο οποίο έγιναν τα πειράματα, αφού ήταν εμφανής και στα τρία μέσα καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν. Όμως, η πενταμιδίνη είχε σημαντικά μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι όλων των στελεχών *Fusarium* στο μέσο καλλιέργειας *YNB* σε σχέση με τα μέσα καλλιέργειας *RPMI* και *RPMI-2*. Παρόμοια αποτελέσματα που έχουν δείξει τη μεγαλύτερη *in vitro* δραστικότητα αρκετών αντιμυκητιασικών φαρμάκων (συμπεριλαμβανομένου και της πενταμιδίνης) στο πλουσιότερο μέσο καλλιέργειας *YNB* έχουν ήδη δημοσιευθεί στο παρελθόν (360).

Στις προηγούμενες αυτές μελέτες, είχε προταθεί ότι το μέσο καλλιέργειας *YNB* υποβοηθάει την ανάπτυξη των μυκήτων σε γρηγορότερους ρυθμούς με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα τους και ως εκ τούτου την καλύτερη ενδοκυττάρια διείσδυση των αντιμυκητιασικών φαρμάκων. Για παράδειγμα, η μελέτη των Μελετιάδη και συνεργατών (360) έδειξε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης στελεχών των υφομυκήτων *Aspergillus* και *Zygomycetes* στα μέσα καλλιέργειας *RPMI* και *RPMI-2* ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο ρυθμό ανάπτυξης σε μέσο καλλιέργειας *YNB* (*Εικόνα 47*). Στα πειράματα της παρούσας εργασίας δεν ήταν δυνατόν να εξηγηθεί η αυξημένη *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης στο μέσο *YNB* με βάση την παραπάνω υπόθεση. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum* ήταν σημαντικά μικρότερος στο μέσο καλλιέργειας *YNB* από ότι στο μέσο *RPMI* (*Εικόνα 48*), μια παρατήρηση η οποία έχει επίσης βρεθεί να ισχύει στο παρελθόν και για τον υφομύκητα *Scedosporium prolificans* (*Εικόνα 47*) (360).

Στη συνέχεια των πειραμάτων του Ειδικού Μέρους Α' της διδακτορικής διατριβής, η μυκητοκτόνος δράση της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών non-*solani Fusarium* επιβεβαιώθηκε μικροσκοπικά με τη διενέργεια χρώσεων υφών ενός στελέχους *Fusarium oxysporum* οι οποίες είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε πενταμιδίνη με τις φθορίζουσες χρώσεις *CFDA* και *DiBAC*, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν επιτυχώς για να χαρακτηρίσουν τη μυκητοκτόνο δράση της αμφοτερικίνης Β και κασποφουγκίνης έναντι

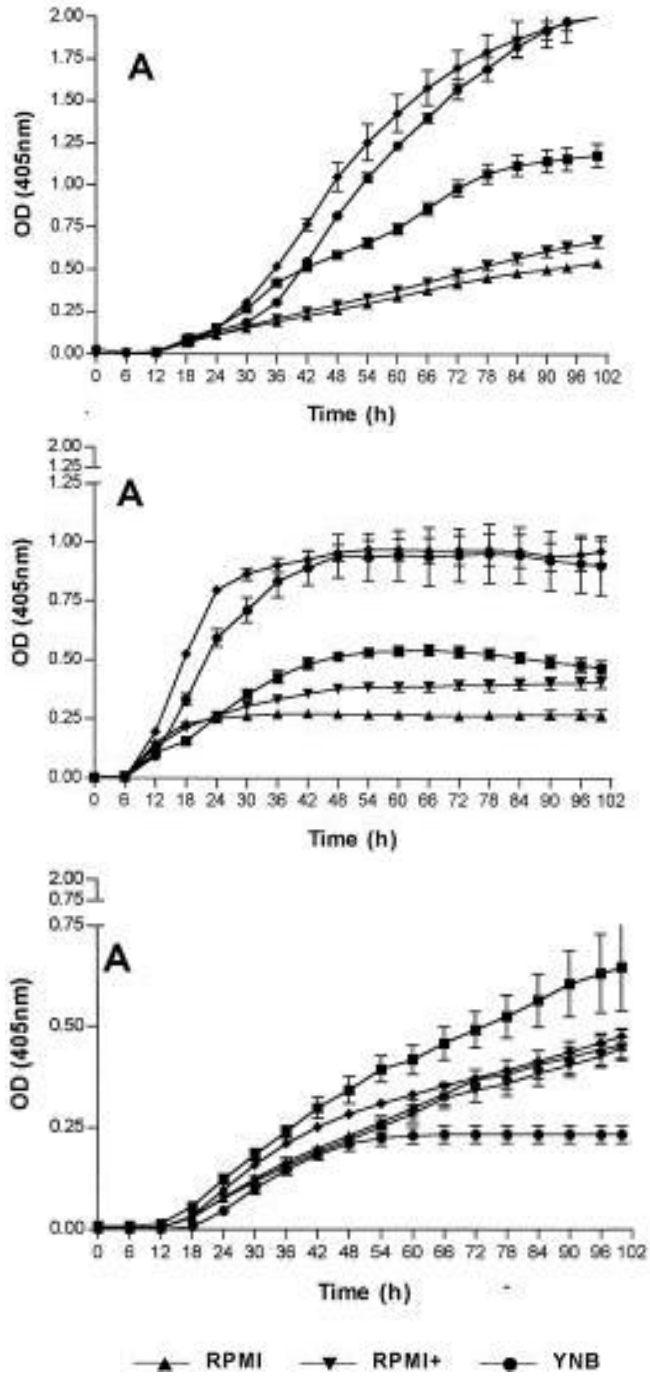
των μυκήτων *Candida albicans* και *Aspergillus fumigatus* αντίστοιχα (355, 361). Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε μικροσκοπικά ότι η χορήγηση πενταμιδίνης είχε ως αποτέλεσμα την καταστροφή σημαντικών τμημάτων ζωντανών υφών *Fusarium oxysporum* σε συγκεντρώσεις πενταμιδίνης ίσες με την ελάχιστη μυκητοκτόνο συγκέντρωση (*MFC*) για το συγκεκριμένο στέλεχος *Fusarium*. Επίσης αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι η πενταμιδίνη είχε παρόμοια μυκητοκτόνο δράση έναντι στελέχους *Fusarium solani*, αλλά σε αρκετά υψηλοτερες συγκεντρώσεις.

Στο μικρό αριθμό φαρμακοκινητικών μελετών (*pharmacokinetic studies*) οι οποίες έχουν διενεργηθεί σε ιστούς ασθενών μετά από νεκροψία στους οποίους είχε προηγουμένως χορηγηθεί πενταμιδίνη, έχει δειχθεί ότι η πενταμιδίνη επιτυγχάνει υψηλές ιστικές συγκεντρώσεις όταν χορηγείται στις συνήθεις δόσεις (4 mg/Kg/ημέρα ενδοφλεβίως) (362–364). Για παράδειγμα, η επιτευχθείσα συγκέντρωση στο αίμα κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 3.2 μg/ml (362). Όμως, πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις επιτυγχάνονται στους ιστούς με τιμές έως 56 μg/g στους πνεύμονες, 123 μg/g στα νεφρά, 300 μg/g στο ήπαρ και 368 μg/g στο σπλήνα (362–364). Οι τιμές MIC_{50}, MIC_{90} και MFC_{50} της πενταμιδίνης έναντι των στελεχών του υφομύκητα *Fusarium* στην παρούσα μελέτη ήταν πολύ χαμηλότερες από τις παραπάνω συγκεντρώσεις πενταμιδίνης που έχουν παρατηρηθεί σε ανθρώπινους ιστούς μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου.

Εν συνεχεία, χρησιμοποιώντας τη χρωματομετρική τεχνική *XTT*, διαπιστώθηκε ότι η πενταμιδίνη έχει μεγαλύτερη *in vitro* δραστικότητα έναντι των κονιδίων *Fusarium* σε σχέση με τη δραστικότητα της έναντι των υφών του εκάστοτε στελέχους *Fusarium*. Αυτή η παρατήρηση είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πολλών άλλων μελετών σε υφομύκητες οι οποίες έχουν καταδείξει ότι οι υφές των υφομυκήτων είναι ενδογενώς πιο ανθεκτικές στα αντιμυκητιασικά φάρμακα σε σχέση με τα κονίδια. Για παράδειγμα, οι *Guarro* και συνερευνητές έδειξαν ότι οι τιμές *MIC* και *MFC* των αντιμυκητιασικών φαρμάκων αμφοτερικίνη Β, 5-φλουκυτοσίνη, φλουκοναζόλη, μικοναζόλη, κετοκοναζόλη και ιτρακοναζόλη έναντι των υφομυκήτων *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* και *Cladophialophora* ήταν κατά πολύ υψηλότερες (2 με 512 φορές) όταν τα φάρμακα αυτά εκτέθηκαν σε ήδη διαμορφωμένες υφές εν αντιθέσει με τις αντίστοιχες τιμές όταν τα φάρμακα εκτέθηκαν σε κονίδια των ίδιων στελεχών (365). Παρόμοιες παρατηρήσεις για

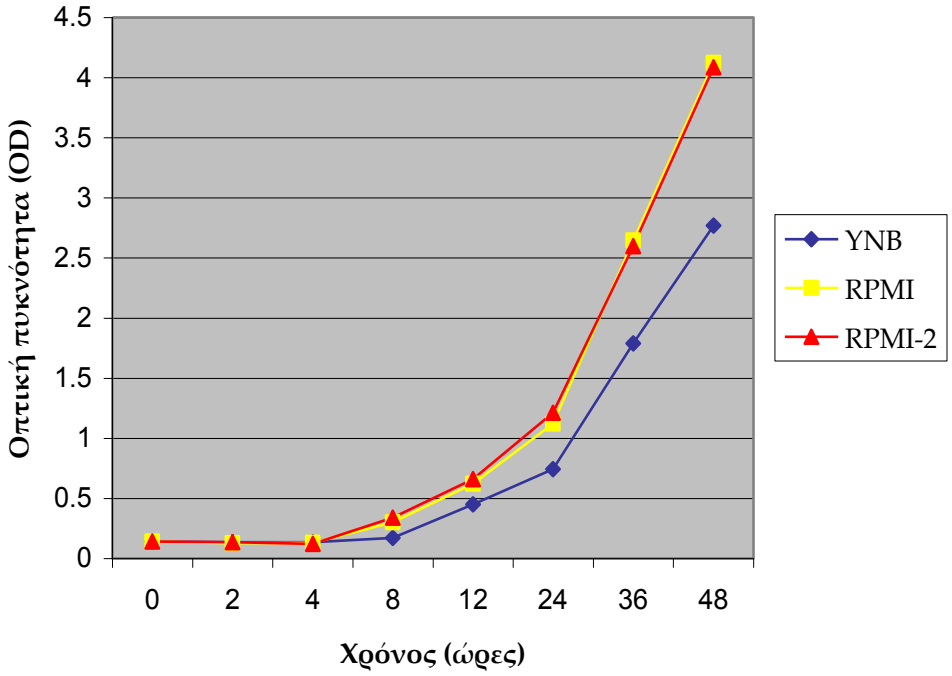
την ανθεκτικότητα των υφών εναντι των κονιδίων έχουν δημοσιευθεί και για τον υφομύκητα *Aspergillus* (366).

Εικόνα 47. Ρυθμός ανάπτυξης των υφομυκήτων *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus microsporus* και *Scedoporium prolificans* σε διάφορα μέσα καλλιέργειας. Φαίνεται η ταχύτερη ανάπτυξη των υφομυκήτων *Aspergillus* και *Rhizopus* στο μέσο καλλιέργειας *YNB* σε σύγκριση με τα μέσα *RPMI* και *RPMI-2*. Αντίθετα, απεικονίζεται η ταχύτερη ανάπτυξη του μύκητα *Scedosporium prolificans* στα μέσα καλλιέργειας *RPMI* και *RPMI-2* σε σύγκριση με το μέσο *YNB*. Τα σχήματα προέρχονται από τη δημοσίευση των Μελετιάδη και συνεργατών [360]



Επίσης, μια πρόσφατη μελέτη από τη Βραζιλία παρουσίασε αντίστοιχα ευρήματα για ένα κλινικό στέλεχος *Fusarium solani* και τη χρήση αμφοτερικίνης Β και ιτρακοναζόλης από ένα ασθενή με αλλογενή μεταμόσχευση του μυελού των οστών και διηθητική φουσαρίωση (367).

Εικόνα 48. Ρυθμός ανάπτυξης δύο κλινικών στελεχών *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum* σε μέσα καλλιέργειας *YNB*, *RPMI* και *RPMI-2*. Φαίνεται η ταχύτερη ανάπτυξη των στελεχών του υφομύκητα στα μέσα καλλιέργειας *RPMI* και *RPMI-2* σε σύγκριση με το μέσο καλλιέργειας *YNB*



Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές EC_{50} και EC_{90} της πενταμιδίνης έναντι των κονιδίων *Fusarium* ήταν πολύ χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου που μπορούν να επιτευχθούν στους ιστούς ασθενών στους οποίους έχει χορηγηθεί πενταμιδίνη. Οι αντίστοιχες τιμές EC_{50} και EC_{90} έναντι των υφών *Fusarium* ήταν σημαντικά υψηλότερες, αλλά και πάλι οι τιμές EC_{50} ήταν χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου που μπορούν να επιτευχθούν στους ιστούς ασθενών.

Ο αποικισμός με κονίδια του υφομύκητα *Fusarium* είναι το πρώτο βήμα στην αλυσίδα των γεγονότων που παρατηρούνται στην παθογένεση της διηθητικής φουσαρίωσης (9, 55). Σε ανοσοεπαρκείς ανθρώπους, τα κονίδια του υφομύκητα εισπνέονται από την ατμόσφαιρα σε μεγάλες ποσότητες μέσα στους πνεύμονες και εκεί καταστρέφονται αποτελεσματικά από τα μακροφάγα κύτταρα στο πνευμονικό παρέγχυμα (55). Όμως, σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με έκπτωση της λειτουργίας των μακροφάγων κυττάρων,

ορισμένα κονίδια διαφεύγουν της φαγοκυττάρωσης, μετατρέπονται σε υφές και εγκαθιστούν διηθητική λοίμωξη κατά τη διάρκεια παρατεταμένης και βαριάς ουδετεροπενίας (9, 55). Ως εκ τούτου, τα *in vitro* αποτελέσματα του Ειδικού Μέρους Α' της παρούσας διδακτορικής διατριβής έδωσαν το πρώτο επιστημονικό ερέθισμα ότι η πενταμιδίνη ίσως να είναι πιο αποτελεσματική ως προφύλαξη έναντι της εγκατάστασης της φουσαρίωσης με βάση τη μεγαλύτερη δραστικότητα της έναντι των κονιδίων του υφομύκητα. Η υπόθεση αυτή εξετάστηκε περαιτέρω *in vivo,* σε ένα ουδετεροπενικό πειραματικό μοντέλο ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση, στο Ειδικό Μέρος Γ' της παρούσας διατριβής.

Παρά το γεγονός ότι η πενταμιδίνη χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για αρκετές δεκαετίες, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί (27). Πολλοί πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί όπως για παράδειγμα είναι η αναστολή του *DNA*, του *RNA*, των φωσφολιπιδίων ή της πρωτεϊνικής σύνθεσης (27). Σε προηγούμενες μελέτες της δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* έχει προταθεί ότι η πενταμιδίνη δρα αναστέλλοντας τη λειτουργία των μιτοχονδρίων του συγκεκριμένου μυκητιασικού μικροοργανισμού (347). Έναντι του ζυμομύκητα *Candida albicans*, η πενταμιδίνη έχει βρεθεί να προκαλεί την αναστολή ιντρονίων (*group I intron ribozymes*).

Στο πρώτο αυτό τμήμα της παρούσας μελέτης βρέθηκε ότι η πενταμιδίνη ήταν πιο δραστική έναντι των στελεχών *Fusarium* σε συνθήκες υποξίας χρησιμοποιώντας δύο ανεξάρτητες μεθόδους, τη μέθοδο *NCCLS* και τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing*. Παρά το γεγονός ότι αυτή η διαφορά στην *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης μπορεί να οφείλεται στη βραδύτερη ανάπτυξη του μύκητα σε συνθήκες υποξίας, τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας μπορεί να αποτελούν ένδειξη ότι η πενταμιδίνη έχει πράγματι μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι του υφομύκητα *Fusarium* σε τέτοιες χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου καθώς η χαμηλή τάση οξυγόνου δεν επηρέασε τη δραστικότητα των υπολοίπων αντιμυκητιασικών φαρμάκων που μελετήθηκαν.

Η παρατήρηση αυτή είναι πιθανό να αποτελεί ένδειξη ότι η πενταμιδίνη μετατρέπεται σε κάποιο ενεργό μεταβολίτη σε συνθήκες υποξίας μιμούμενη ίσως το μηχανισμό δράσης που έχει η μετρονιδαζόλη (*metronidazole*) έναντι των αναερόβιων βακτηριακών μικροοργανισμών (368). Περισσότερες μελέτες χρειάζονται για τη επιβεβαίωση της

παραπάνω υπόθεσης. Πάντως, τα αποτελέσματα αυτά ήταν ελπιδοφόρα για τη διενέργεια *in vivo* μελετών της δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του *Fusarium* που ακολουθούν στα επόμενα τμήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Όπως ο *Aspergillus* έτσι και ο υφομύκητας *Fusarium* είναι αγγειοτρόπος μύκητας ο οποίος διηθεί αιμοφόρα αγγεία με αποτέλεσμα να προκαλεί ιστικά έμφρακτα, χαμηλή ιστική αιμάτωση και ως εκ τούτου ελαττωμένη πρόσβαση και χαμηλή δραστικότητα των αντιμυκητιασικών φαρμάκων (8, 9). Παίρνοντας ως δεδομένη τη δημιουργία υποξικών συνθηκών ως αποτέλεσμα της διηθητικής φουσαρίωσης αυτής καθεαυτής, η αυξημένη *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης υπό συνθήκες χαμηλής τάσης οξυγόνου ίσως να έχει κλινική σημασία και αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Εν κατακλείδει, τα πειράματα του Ειδικού Μέρους Α' της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατέδειξαν την αξιοσημείωτη *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι διαφόρων παθογόνων ειδών του υφομύκητα *Fusarium*. Τα αποτελέσματα αυτά αποτέλεσαν τη βάση για δημοσίευση στο επιστημονικό περιοδικό *Antimicrobial Agents* & *Chemotherapy* με τίτλο "Pentamidine is active *in vitro* against *Fusarium* species" (Lionakis MS, Lewis RE, Samonis G and Kontoyiannis DP. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47, 3252-3259) όπως επίσης και τη βάση για την περαιτέρω διενέργεια *in vivo* πειραμάτων για την διερεύνηση της δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του *Fusarium* σε ένα ουδετεροπενικό πειραματικό μοντέλο ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση. Οι μέθοδοι και τα αποτελέσματα των *in vivo* αυτών πειραμάτων περιγράφονται με λεπτομέρεια παρακάτω στο Ειδικό Μέρος Γ'.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β'

IN VITRO ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΜΙΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΜΦΟΤΕΡΙΚΙΝΗΣ Β ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΦΟΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM*

Σε αυτό το δεύτερο *in vitro* τμήμα της διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium.* Επειδή η θνητότητα από ευκαιριακές μυκητιασικές λοιμώξεις είναι υψηλή παρά τη χρήση μονοθεραπείας με αντιμυκητιασικά φάρμακα, η χρήση συνδυασμού φαρμάκων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης ως στρατηγική αντιμετώπισης τέτοιων λοιμώξεων είναι σε ιδιαίτερη άνθηση τα τελευταία χρόνια, κάτι στο οποίο έχει συντελέσει και η ανακάλυψη και διαθεσιμότητα πολλών νέων αντιμυκητιασικών φαρμάκων (369, 370). Συγκεκριμένα για τον υφομύκητα *Fusarium*, οι διάφοροι συνδυασμοί φαρμάκων που έχουν εξεταστεί είτε *in vitro* στο εργαστήριο ή στην κλινική πράξη για την πιθανή συνέργεια τους είναι οι εξής:

- Αμφοτερικίνη Β με: βορικοναζόλη (158, 310), ραβουκοναζόλη (309), κασποφουγκίνη (303), ανιδουλαφουγκίνη (304), 5-φλουκυτοσίνη (210, 302, 307), αζιθρομυκίνη (308), τερβιναφίνη (305), ριφαμπικίνη (210, 307) ή ριφαμπουτίνη (306)
- Βορικοναζόλη με μικαφουγκίνη (371) ή ανιδουλαφουγκίνη (304)
- Νικομυκίνη Ζ με: φλουκοναζόλη, ιτρακοναζόλη (286) ή μικαφουγκίνη (372)
- Ανιδουλαφουγκίνη με ιτρακοναζόλη (304)
- Τερβιναφίνη με βορικοναζόλη ή ραβουκοναζόλη (309)

Για την μελέτη της *in vitro* αλληλεπίδρασης της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β, τη βασική επιλογή για τη θεραπεία της διηθητικής φουσαριώσης στην κλινική πράξη, χρησιμοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες μικροβιολογικές τεχνικές στο εργαστήριο. Ο απώτερος σκοπός ήταν να διερευνηθεί αν η προσθήκη της πενταμιδίνης στην χρησιμοποιούμενη αντιμυκητιασική αγωγή στην κλινική πράξη (αμφοτερικίνη Β) θα άξιζε να διερευνηθεί περαιτέρω *in vivo* και αν θα μπορούσε μακροπρόθεσμα να αποτελέσει μια ακόμα θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση της ευκαιριακής αυτής λοίμωξης.

1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Β′

1α. Στελέχη *Fusarium*

Για τη διερεύνηση της *in vitro* αλληλεπίδρασης της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια 10 (*δέκα*) κλινικά στελέχη *Fusarium* που χρησιμοποιήθηκαν στο Ειδικό Μέρος Α′, 5 (*πέντε*) εκ των οποίων ανήκαν στο σύμπλεγμα *Fusarium solani* ενώ 5 (*πέντε*) στελέχη ήταν non-*solani Fusarium* (*Πίνακας 10*).

1β. Μέθοδος *checkerboard*

Οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*MIC*) της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β υπολογίστηκαν αρχικά όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στο Ειδικό Μέρος Α′. Εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *checkerboard* ώστε να υπολογιστεί η κλασματική ανασταλτική συγκέντρωση (*FIC*; *fractional inhibitory concentration*) του συνδυασμού της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β για το κάθε κλινικό στέλεχος του υφομύκητα *Fusarium* (286, 303). Επειδή η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την πενταμιδίνη έναντι μυκητιασικών μικροοργανισμών δεν έχει σαφώς καθοριστεί, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 2 μέθοδοι προσδιορισμού της, δηλαδή η τιμή *MIC-2* [*ορισμός*: η ελάχιστη συγκέντρωση του φαρμάκου που προκάλεσε οπτικά εμφανή ελάττωση της ανάπτυξης του εκάστοτε στελέχους *Fusarium* (περίπου > 50%)], και η τιμή *MIC-0* [*ορισμός*: η ελάχιστη συγκέντρωση του φαρμάκου που προκάλεσε οπτικά εμφανή ολική ελάττωση της ανάπτυξης του εκάστοτε στελέχους του υφομύκητα (περίπου > 95%)].

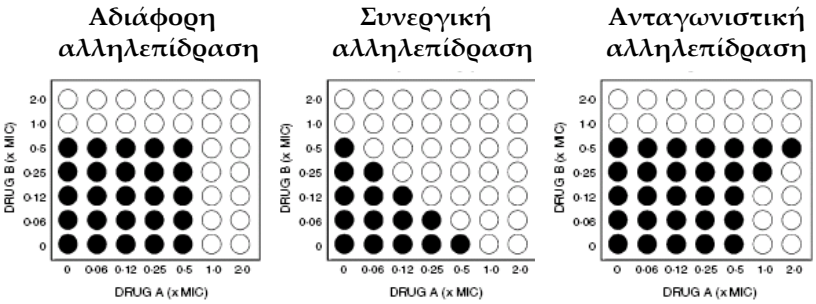
Τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των δύο φαρμάκων ερμηνεύτηκαν με βάση και τις δύο τιμές *MIC*. Η τιμή *FIC* του κάθε φαρμάκου για κάθε στέλεχος *Fusarium* ορίστηκε ως το κλάσμα της συγκεντρωσης του φαρμάκου όταν χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό η οποία πέτυχε την τιμή *MIC* ως προς τη τιμή *MIC* του φαρμάκου όταν χρησιμοποιήθηκε από μόνο του (286, 303). Ο δείκτης κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης (*FICI*; *fractional inhibitory concentration index)* για κάθε στέλεχος *Fusarium* υπολογίστηκε αθροίζοντας την τιμή *FIC* της πενταμιδίνης με την τιμή *FIC* της αμφοτερικίνης Β και στρογγυλοποιώντας το άθροισμα στην πλησιέστερη 0.1 μονάδα βάσει του μαθηματικού τύπου [(*MIC* της πενταμιδίνης σε συνδυασμό / *MIC* της πενταμιδίνης από μόνη της) + (*MIC* της αμφοτερικίνης Β σε συνδυασμό / *MIC* της αμφοτερικίνης Β από μόνη της)].

Οι τιμές *FICI* εν συνεχεία ερμηνεύτηκαν ως εξής (*Εικόνα 49*) (286, 303):

- *FICI* ≤ 0.5, συνέργεια
- 0.5 < *FICI* ≤ 1, αθροιστική δράση
- 1 < *FICI* ≤ 2, αδιάφορη αλληλεπίδραση
- *FICI* > 2, ανταγωνισμός

Πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα με τη μέθοδο *checkerboard* σε τρεις διαφορετικές ημέρες χρησιμοποιώντας τα 10 στελέχη *Fusarium* .

Εικόνα 49. Σχηματική απεικόνιση της εμφάνισης των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αντιμυκητιασικών φαρμάκων με βάση τη μέθοδο *checkerboard*



1γ. Μέθοδος *disk diffusion susceptibility testing*

Σε άλλα πειράματα, προετοιμάστηκε ένα αρχικό διάλυμα πενταμιδίνης με συγκέντρωση ίση με 60 mg/ml σε απεσταγμένο νερό και ένα αρχικό διάλυμα αμφοτερικίνης Β με συγκέντρωση ίση με 5 mg/ml σε *DMSO* τα οποία αποθηκεύτηκαν στους –70 ^{o}*C* μέχρι τη χρήση τους. Η διενέργεια του *disk diffusion susceptibility testing* έγινε σε δισκία άγαρ με *RPMI* τα οποία είχαν προηγουμένως προετοιμαστεί χρησιμοποιώντας τυποποιημένες μεθόδους (358). Συγκεκριμένα, 200 μl από ένα τυποποιημένο διάλυμα κονιδίων *Fusarium* (συγκέντρωση ίση με 10^6 κονίδια/ml) από το εκάστοτε στέλεχος του υφομύκητα απλώθηκε ομοιόμορφα πάνω στα δισκία με άγαρ και *RPMI*. Αφού τα δισκία *petri* αφέθηκαν να στεγνώσουν, ένας αποστειρωμένος χάρτινος δίσκος με διαστάσεις ίσες με το ¼ της ίντσας (*Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire, NH*) τοποθετήθηκε στο κέντρο της επιφάνειας του άγαρ και επωάστηκε είτε:

- με 8.3 μl από το αρχικό διάλυμα της πενταμιδίνης, δημιουργώντας μια τελική συγκέντρωση 20 μg/ml (*μονοθεραπεία με πενταμιδίνη*) ή
- με 50 μl από το αρχικό διάλυμα αμφοτερικίνης Β, δημιουργώντας μια τελική συγκέντρωση 10 μg/ml (*μονοθεραπεία με αμφοτερικίνη Β*) ή

- με 8.3 μl από το αρχικό διάλυμα της πενταμιδίνης και με 50 μl από το αρχικό διάλυμα αμφοτερικίνης Β, δημιουργώντας μια τελική συγκέντρωση 20 μg/ml και 10 μg/ml για τα δύο φάρμακα αντίστοιχα (*συνδυασμός πενταμιδίνης με αμφοτερικίνη Β*).

Εν συνεχεία, τα δισκία *petri* αφέθηκαν στους 35 ^{o}C και η ακτίνα της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα προκαλούμενη από το κάθε αντιμυκητιασικό φάρμακο ξεχωριστά ή το συνδυασμό των δύο φαρμάκων μετρήθηκε με ένα μικρόμετρο σε χιλιοστά μετά από 48 ώρες επώασης (358). Τρία πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές ημέρες.

1δ. Στατιστική ανάλυση

Οι διαφορές μεταξύ των ακτίνων των ζωνών αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα *Fusarium* προκαλούμενες από την πενταμιδίνη, την αμφοτερικίνη Β ή το συνδυασμό των ανωτέρω φαρμάκων αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το *Tukey's test* (359). Οι τιμές $P < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Β′

2α. Η πενταμιδίνη δρα συνεργικά με την αμφοτερικίνη Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium* σύμφωνα με τη μέθοδο *checkerboard*

Οι τιμές *MIC-2* και *MIC-0* της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β, χρησιμοποιούμενων μόνων ή σε συνδυασμό, καθώς επίσης και οι τιμές *FICI* για κάθε στέλεχος του υφομύκητα *Fusarium* περιλαμβάνονται στον *Πίνακα 16*. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των δύο αντιμυκητιασικών φαρμάκων με βάση τη μέθοδο *checkerboard* συνοψίζονται στον *Πίνακα 17*. Όπως φαίνεται στους δύο πίνακες, η πενταμιδίνη και η αμφοτερικίνη Β είχαν συνεργική δράση έναντι της συντριπτικής πλειοψηφίας των στελεχών *Fusarium*. Συγκεκριμένα, με βάση την τιμή *MIC-2*, τα δύο φάρμακα είχαν συνεργική δράση έναντι και των 10 στελεχών *Fusarium solani* και non-*solani Fusarium*. Με βάση την τιμή *MIC-0*, η πενταμιδίνη και η αμφοτερικίνη Β είχαν συνεργική αλληλεπίδραση έναντι και των 5 στελεχών non-*solani Fusarium* και έναντι 3 στελεχών *Fusarium solani*, ενώ είχαν αδιάφορη αλληλεπίδραση έναντι των 2 εναπομείναντων στελεχών *Fusarium solani*.

Οι τιμές *MIC-2* και *MIC-0* της πενταμιδίνης σε συνδυασμό με την αμφοτερικίνη Β ελαττώθηκαν σε σημαντικό βαθμό σε όλα τα στελέχη *Fusarium* (από 3 εώς 8 κλίμακες συγκέντρωσης) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές όταν η πενταμιδίνη χρησιμοποιήθηκε μόνη της. Αντίστοιχα, οι τιμές *MIC-2* και *MIC-0* της αμφοτερικίνης Β σε συνδυασμό με την πενταμιδίνη επίσης ελαττώθηκαν αλλά σε μικρότερο βαθμό (εώς 7 κλίμακες συγκέντρωσης) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές όταν η αμφοτερικίνη Β χρησιμοποιήθηκε μόνη της ενώ σε ένα στέλεχος *Fusarium solani* οι τιμές παρέμειναν σταθερές και σε ένα άλλο στέλεχος *Fusarium solani* αυξήθηκαν κατά μία κλίμακα συγκέντρωσης. Σε κανένα από τα 10 στελέχη του υφομύκητα *Fusarium* που χρησιμοποιήθηκε δεν παρατηρήθηκε *in vitro* ανταγωνισμός μεταξύ της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης της αμφοτερικίνης Β με την πενταμιδίνη έναντι των 10 κλινικών στελεχών *Fusarium* με βάση τη μέθοδο *checkerboard*

Στέλεχος	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) [α] (μg/ml)					FICI [β]	Αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης
	Τύπος MIC	AMB MIC	AMB MIC (συνδυασμός με PNT)	PNT MIC	PNT MIC (συνδυασμός με AMB)		
***Fusarium solani* (*n* = 5)**							
# 1	*MIC-2*	2	0.03	4	0.125	0.05	Συνέργεια
	MIC-0	2	0.125	32	0.125	0.06	Συνέργεια
# 2	*MIC-2*	2	0.03	4	0.125	0.05	Συνέργεια
	MIC-0	2	0.06	16	0.125	0.04	Συνέργεια
# 3	*MIC-2*	4	0.03	2	0.125	0.07	Συνέργεια
	MIC-0	4	0.125	8	0.125	0.05	Συνέργεια
# 4	*MIC-2*	2	0.03	4	0.125	0.05	Συνέργεια
	MIC-0	2	4	32	0.125	2	Αδιάφορο
# 5	*MIC-2*	4	0.03	4	0.125	0.04	Συνέργεια
	MIC-0	4	4	32	0.125	1	Αδιάφορο
Non-*solani* *Fusarium* (*n* = 5)							
# 1	*MIC-2*	1	0.03	2	0.125	0.09	Συνέργεια
	MIC-0	2	0.06	8	0.125	0.05	Συνέργεια
# 2	*MIC-2*	0.5	0.03	2	0.125	0.12	Συνέργεια
	MIC-0	2	0.03	4	0.125	0.05	Συνέργεια
# 3	*MIC-2*	1	0.03	1	0.125	0.16	Συνέργεια
	MIC-0	4	0.03	4	0.125	0.04	Συνέργεια
# 4	*MIC-2*	1	0.03	2	0.125	0.09	Συνέργεια
	MIC-0	2	0.03	8	0.125	0.03	Συνέργεια
# 5	*MIC-2*	1	0.03	2	0.125	0.09	Συνέργεια
	MIC-0	2	0.03	8	0.125	0.03	Συνέργεια

[α] ***MIC-2*: Συγκέντρωση του φαρμάκου που προκάλεσε εμφανή οπτική αναστολή της ανάπτυξης του υφομύκητα (~50%); *MIC-0*, ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (συγκέντρωση του φαρμάκου που προκάλεσε ολική οπτική αναστολή της ανάπτυξης του υφομύκητα)**

[β] ***FICI*, δείκτης κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης (*fractional inhibitory concentration index*)**

AMB, αμφοτερικίνη Β; PNT, πενταμιδίνη

Πίνακας 17. Συνοπτικά αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης της αμφοτερικίνης Β και της πενταμιδίνης έναντι των 10 κλινικών στελεχών *Fusarium* με βάση τη μεθοδο *checkerboard*

Είδος *Fusarium* (αριθμός στελεχών)	Αριθμός στελεχών που εμφάνισαν διαφορετική αλληλεπίδραση μεταξύ αμφοτερικίνης Β και πενταμιδίνης							
	Με βάση τις τιμές *MIC-2* [α]				Με βάση τις τιμές *MIC-0* [α]			
	Συν [β]	Αθρ	Αδιαφ	Ανταγ	Συν	Αθρ	Αδιαφ	Ανταγ
Fusarium solani (5)	5	0	0	0	3	0	2	0
Non-*solani Fusarium* (5)	5	0	0	0	5	0	0	0

[α] ***MIC-2*: Συγκέντρωση φαρμάκου που προκάλεσε οπτικά εμφανή ελάττωση (~ 50%) της ανάπτυξης του υφομύκητα, *MIC-0*: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση που προκάλεσε ολική οπτική αναστολή της ανάπτυξης του υφομύκητα**
[β] **Συν = συνέργεια, Αθρ = αθροιστική δράση, Αδιαφ = αδιάφορη αλληλεπίδραση, Ανταγ = ανταγωνισμός**

2β. Αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium* με βάση τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing*

Όπως με τη μέθοδο *checkerboard* έτσι και με τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing* παρατηρήθηκε μια θετική αλληλεπίδραση μεταξύ της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β εναντι της πλειοψηφίας των στελεχών του υφομύκητα *Fusarium*. Συγκεκριμένα, σε 6 από τα 10 στελέχη, οι ακτίνες της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα προκαλούμενες από το συνδυασμό των δύο αντιμυκητιασικών φαρμάκων ήταν μεγαλύτερες από τις ακτίνες ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα προκαλούμενες από το κάθε φάρμακο ξεχωριστά (*Πίνακας 18* και *Εικόνα 50*). Όπως και με τη μέθοδο *checkerboard*, η θετική αλληλεπίδραση μεταξύ της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β ήταν περισσότερο εμφανής έναντι των στελεχών *Fusarium solani* σε σχέση με τα στελέχη non-*solani Fusarium* (*Πίνακας 18*).

Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι στα στελέχη *Fusarium solani* η πενταμιδίνη από μόνη της προκάλεσε ζώνες αναστολής της ανάπτυξης τους με διττά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η πενταμιδίνη προκάλεσε μια εσωτερική καθαρή ζώνη αναστολής και μια εξωτερική μεγαλύτερη ζώνη αναστολής η οποία περιείχε όμως μικροαποικίες του υφομύκητα οι οποίες κατάφεραν να επιβιώσουν μέσα στη ζώνη αυτή. Το φαινόμενο αυτό έχει επίσης περιγραφεί με τη χρήση κασποφουγκίνης έναντι του υφομύκητα *Aspergillus fumigatus* (358), ονομάζεται *revertants* (*Εικόνα 51*), και οφείλεται στην

επιβίωση ορισμένων αποικιών του υφομύκητα οι οποίες ανέπτυξαν ανθεκτικότητα (*resistance*) κατά τη διάρκεια της έκθεσης τους στο χρησιμοποιούμενο φαρμάκο (373). Μετά από την προσθήκη αμφοτερικίνης Β στο δίσκο με την πενταμιδίνη, το εύρος της εσωτερικής καθαρής ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα αυξήθηκε σε αυτά τα στελέχη *Fusarium solani* και δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο *revertants*. Αντίθετα, στα στελέχη non-*solani Fusarium* δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο *revertants*. Όμως, σε 1 από τα 10 στελέχη *Fusarium* η αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β ήταν αδιάφορη και σε 3 στελέχη ήταν ανταγωνιστική με βάση τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing*, ένα εύρημα το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μεθόδου *checkerboard* κατά την οποία δεν είχε παρατηρηθεί ανταγωνισμός σε κανένα από τα δέκα στελέχη του υφομύκητα.

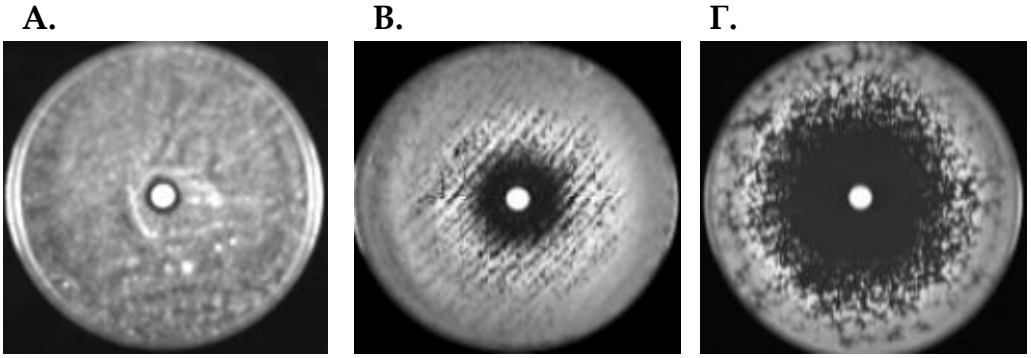
Όπως φαίνεται στον *Πίνακα 18* η διαφορά στις ακτίνες αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα μεταξύ των δύο φαρμάκων ξεχωριστα και του συνδυασμού τους πλησίασε αλλά δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας καθώς η τιμή P ήταν 0.063. Η στατιστική διαφορά ήταν ακόμα πιο μικρή όταν τα αποτελέσματα διαχωρίστηκαν για τα στελέχη *Fusarium solani* και τα στελέχη non-*Fusarium solani* ($P > 0.1$).

Πίνακας 18. Αποτελέσματα της μεθόδου *disk diffusion susceptibility testing* για την αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β έναντι των στελεχών *Fusarium*

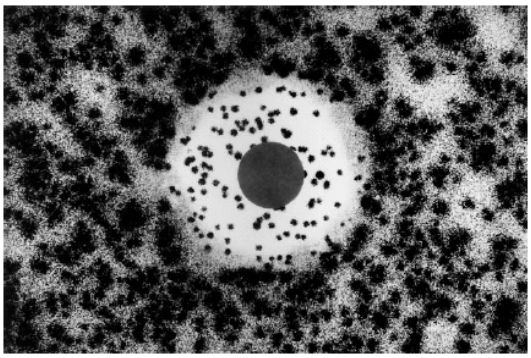
Είδος *Fusarium* (αριθμός στελεχών)	**Μέσος όρος της ακτίνας της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του υφομύκητα σε χιλιοστά (σε παρένθεση το *standard deviation*)**		
	Πενταμιδίνη [α]	**Αμφοτερικίνη Β** [β]	**Πενταμιδίνη και αμφοτερικίνη Β**
Όλα τα είδη *Fusarium* (10)	7.933 (± 4.671) *	1.792 (± 0.641)	12.617 (± 6.068) *
Fusarium solani (5)	3.533 (± 0.65)	2 (± 0.667)	6.33 (± 1.85)
Non-*F. solani* (5)	12.33 (± 0.527)	1.2 (± 0.506)	16.667 (± 1.155)

[α] κάθε δίσκος περιείχε 20 μg/ml πενταμιδίνης
[β] κάθε δίσκος περιείχε 10 μg/ml αμφοτερικίνης Β
*** P = 0.063**

Εικόνα 50. ***Disk diffusion susceptibility testing*** **της αμφοτερικίνης Β (20 μg/ml) (Α), πενταμιδίνης (10 μg/ml) (Β) και του συνδυασμού των δύο αντιμυκητιασικών φαρμάκων (στις ίδιες συγκεντρώσεις) έναντι ενός αντιπροσωπευτικού κλινικού στελέχους** ***Fusarium oxysporum***



Εικόνα 51. Φαινόνενο ***revertants*****. Απεικονίζονται οι αποικίες ενός στελέχους** ***Aspergillus fumigatus*** **εντός της ζώνης αναστολής προκαλούμενης από την κασποφουγκίνη οι οποίες υποδηλώνουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού κατά την έκθεση στο φάρμακο. Η εικόνα προέρχεται από την δημοσίευση των** ***Arikan*** **και συνεργατών** [358]



3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Β΄

Έχουν περάσει πάνω από τρεις δεκαετίες από τότε που οι *Schimpff* και συνερευνητές (374) εισήγαγαν την έννοια της χρησιμοποίησης συνδυασμού αντιμικροβιακής αγωγής έναντι βακτηριακών λοιμώξεων σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Την εποχή πριν από τη μελέτη εκείνη η θνητότητα ουδετεροπενικών ασθενών με σήψη από *Gram* αρνητικά βακτήρια ήταν μεγαλύτερη του 90% και οι περισσότεροι από αυτούς τους ασθενείς πέθαιναν σε λιγότερες από 48 ώρες από την διάγνωση της βακτηριακής τους λοίμωξης. Με τη έναρξη της χορήγησης συνδυασμού εμπειρικής αντιμικροβιακής θεραπείας με καρβενικιλλίνη (*carbenicillin*) και γενταμυκίνη (*gentamycin*) στην πρώτη ένδειξη πυρετού, οι ερευνητές αύξησαν τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με λοίμωξη από *Pseudomonas aeruginosa* σε περισσότερο από 60% (374).

Από εκείνη την εποχή έχουν περάσει πολλά χρόνια και το φάσμα των λοιμώξεων στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς έχει αλλάξει με τα *Gram* θετικά βακτήρια και το ζυμομύκητα *Candida* να αποτελούν πλεόν την πλειοψηφία των παθογόνων μικροοργανισμών που απομονώνονται από θετικές αιμοκαλλιέργειες. Σε αντίθεση με τις βακτηριακές λοιμώξεις, εξαιτίας της μεγαλύτερης δυσκολίας έγκαιρης και έγκυρης διάγνωσης και εξαιτίας της υψηλότερης θνητότητας, οι μυκητιασικές λοιμώξεις αποτελούν ένα πεδίο στο οποίο η χρησιμοποίηση συνδυαστικής αντιμυκητιασικής θεραπείας είναι ακόμα περισσότερο ελκυστική (369, 370). Αυτό έχει καταστεί δυνατό τα τελευταία χρόνια με την ανακάλυψη και τη διαθεσιμότητα αρκετών νέων αντιμυκητιασικών φαρμάκων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, η οποία έχει αυξήσει κατακόρυφα τις υπάρχουσες επιλογές σε σχέση με τη μοναδικότητα της επιλογής της χρησιμοποίησης αμφοτερικίνης Β στο παρελθόν για περισσότερο από τριάντα χρόνια.

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα από τη χρησιμοποίηση συνδυασμού αντιμυκητιασικών φαρμάκων (*Πίνακας 19*) (369, 370). Εκτός από τη διεύρυνση του αντιμυκητιασικού φάσματος και την ισχυρότερη αντιμυκητιασική δράση, τα θεραπευτικά σχήματα με συνδυασμό φαρμάκων είναι πιθανόν επίσης να προκαλούν πιο έγκαιρη έναρξη του θεραπευτικού αποτελέσματος και να επιτρέπουν την ελάττωση της χορηγούμενης δόσης φαρμάκων με τοξικότητα όπως είναι η αμφοτερικίνη Β. Επιπλέον,

είναι πιθανόν ότι η χρήση συνδυασμού φαρμάκων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης να αποτρέπει την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών μυκήτων (370).

Πίνακας 19. Πιθανά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα από τη χρήση συνδυασμού αντιμυκητιασικών φαρμάκων	
Πλεονεκτήματα	**Μειονεκτήματα**
Αυξημένο εύρος ή φάσμα της αντιμυκητιασικής δραστικότητας (αθροιστική δράση ή συνέργεια)	Ελάττωση του εύρους ή φάσματος της αντιμυκητιασικής δραστικότητας (ανταγωνισμός)
Αυξημένη ταχύτητα δράσης	Αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φαρμάκων
Ελάττωση της τοξικότητας	Αυξημένο κόστος
Ελάττωση της πιθανότητας εμφάνισης ανθεκτικότητας	Αυξημένη τοξικότητα

Ο Πίνακας προέρχεται από τη δημοσίευση των *Kontoyiannis* & *Lewis* [369]

Παρά τα προαναφερθέντα θεωρητικά πλεονεκτήματα όμως, λιγοστά αντικειμενικά κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν τη χρήση συνδυαστικής αντιμυκητιασικής θεραπείας σε μυκητιασικές λοιμώξεις. Σημαντική εξαίρεση αποτελεί η κρυπτοκοκκική μηνιγγίτιδα (*cryptococcal meningitis*) όπου ο συνδυασμός αμφοτερικίνης Β και 5-φλουκυτοσίνης αποτελεί τη θεραπεία εκλογής καθώς έχει δειχθεί ότι ελαττώνει τη συχνότητα υποτροπών της λοίμωξης αυτής σε βάθος χρόνου και αποστειρώνει το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ταχύτερα (375). Αυτή η ένδεια επιβεβαιωμένων κλινικών δεδομένων για τη χρησιμοποίηση διαφόρων συνδυασμών αντιμυκητιασικών στην κλινική πράξη σε ένα μεγάλο βαθμό οφείλεται στην έλλειψη τυποποιημένων *in vitro* και *in vivo* τεχνικών στη πειραματική μυκητολογία για την αντικειμενική διερεύνηση της αλληλεπίδρασης διαφορετικών συνδυασμών αντιμυκητιασικών φαρμάκων. Στον *Πίνακα 20* συνοψίζονται τα επιστημονικά δεδομένα προερχόμενα από *in vivo* μελέτες για τη χρήση συνδυαστικής αντιμυκητιασικής θεραπείας στις τρεις πιο συχνές ευκαιριακές μυκητιασικές λοιμώξεις που συναντώνται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς: την καντιντίαση (*candidiasis*), την διηθητική ασπεργίλλωση (*invasive aspergillosis*) και την κρυπτοκόκκωση (*cryptococcosis*).

Πίνακας 20. Σύνοψη των *in vivo* μελετών για τη χρήση συνδυαστικής αντιμυκητιασικής θεραπείας στις πιο συχνές μυκητιασικές λοιμώξεις

		Αλληλεπίδραση		
Συνδυασμός	**Βιβλιογραφική αναφορά**	***Candida***	***Cryprococcus***	***Aspergillus***
Συνδυασμοί με βάση την αμφοτερικίνη Β				
5FC + AMB	Polak (376)	Αδ = Σ	Αδ < Σ	Αδ > Σ
AMB + KET	Schaffner & Frick (377); Polak (376); Schmitt *et al* (378); Sugar & Liu (379);			
AMB + ITC	Barchiesi *et al* (380) George *et al* (381); Sugar *et al* (382); O'Reilly *et al* (383); Diamond *et al* (384);	Αδ < Αντ	Αδ > Σ	Αδ < Αντ
AMB + FLC	Barchiesi *et al* (380); Louie *et al* (385)	Αδ < Αντ	Αδ < Σ	Αδ
AMB + POS	Najvar *et al* (386)			Αδ
AMB + TER	Kirkpatrick *et al* (387)			Αδ
Συνδυασμοί με βάση τις αζόλες				
5FC + KET/ITC	Hughes *et al* (388); Polak (376)	Αδ > Σ	Αδ > Σ	Αδ > Σ
5FC + FLC	Kartalija *et al* (389); Ding *et al* (390)	Αδ > Σ	Αδ < Σ	Αδ = Σ
Συνδυασμοί με βάση τις εχινοκανδίνες				
CAS + AMB	Flattery *et al* (370)	Αδ < Σ	Αδ	Αδ < Σ
CAS + VRC	Kirkpatrick *et al* (391)			Αδ < Σ
CAS + FLC	Graybill *et al* (392)	Αδ		
MIC + AMB	Graybill *et al* (393); Kohno *et al* (370); Capilla Luqeue *et al* (370)			Σ > Αδ
MIC + RAV	Petraitis *et al* (394)			Σ

***5FC*, 5-φλουροκυτοσίνη; *AMB*, αμφοτερικίνη Β; *KET*, κετοκοναζόλη; *ITC*, ιτρακοναζόλη; *FLC*, φλουκοναζόλη; *POS*, ποσακοναζόλη; *TER*, τερβιναφίνη; *VRC*, βορικοναζόλη; *CAS*, κασποφουγκίνη; *MIC*, μικαφουγκίνη; *RAV*, ραβουκοναζόλη**
Αδ, αδιάφορη αλληλεπίδραση; Σ, συνέργεια; Αντ, ανταγωνισμός
<, λιγότερες μελέτες; >, περισσότερες μελέτες
Ο πίνακας προέρχεται από τη δημοσίευση των *Kontoyiannis & Lewis* [369]

Με βάση όλα τα παραπάνω εισαγωγικά στοιχεία, στο δεύτερο μέρος της παρούσας διδακτορικής εργασίας μελετήθηκε η *in vitro* αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium*. Ήταν επιθυμητό με αυτό τον τρόπο να διερευνηθεί η πιθανότητα ότι τα δύο αυτά αντιμυκητιασικά φάρμακα ίσως να έχουν θέση στην θεραπευτική φαρέτρα έναντι αυτής της εξαιρετικά ανθεκτικής ευκαιριακής λοίμωξης στην κλινική πράξη.

Ο συγκεκριμένος συνδυασμός φαρμάκων έχει δειχθεί πρόσφατα ότι είναι συνεργικός *in vitro* έναντι του υφομύκητα *Scedosporium prolificans* ο οποίος είναι γνωστό ότι είναι ανθεκτικός σχεδόν σε όλα τα χρησιμοποιούμενα αντιμυκητιασικά φάρμακα (349). Επιπλέον, ο συνδυασμός της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β είναι συνεργικός τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έναντι του πρωτοζώου *Leishmania donovani* (395, 396).

Με βάση τη μέθοδο *checkerboard*, η οποία αποτελεί την μέθοδο εκλογής για τη μελέτη του συνδυασμού αντιμυκητιασικών φαρμάκων, ο συνδυασμός της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β ήταν συνεργικός έναντι της συντριπτικής πλειοψηφίας των στελεχών του υφομύκητα *Fusarium* ενώ δεν παρατηρήθηκε ανταγωνισμός των δύο φαρμάκων έναντι κανενός από τα στελέχη *Fusarium* που μελετήθηκαν. Η συνέργεια αυτή ήταν περισσότερο εμφανής έναντι των στελεχών non-*solani Fusarium* σε σχέση με τα στελέχη *Fusarium solani*. Με βάση τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing*, η οποία επίσης χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή ώστε να μελετηθεί ο συνδυασμός της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β με περισσότερες από μεθόδους, ο παραπάνω συνδυασμός φαρμάκων είχε θετική αλληλεπίδραση έναντι περίπου των μισών στελεχών του υφομύκητα *Fusarium*. Και πάλι η συνέργεια αυτή αυτή ήταν περισσότερο ευδιάκριτη στα στελέχη non-*solani Fusarium* ενώ ήταν λιγότερο εμφανής στα στελέχη *Fusarium solani.*

Με τη δεύτερη αυτή μέθοδο όμως υπήρχαν 4 στελέχη *Fusarium* στα οποία η συνδυαστική χρήση των δύο αντιμυκητιασικών φαρμάκων ήταν αδιάφορη ή ανταγωνιστική. Είναι γνωστό ότι η αμφοτερικίνη Β, ως λιπόφιλη αντιμικροβιακή ουσία, δε διαχέεται επαρκώς πάνω στο θρεπτικό του δισκίου *petri* κατά τη διενέργεια των πειραμάτων *disk diffusion susceptibility testing* και αυτό ίσως να αποτελεί μια αιτία για την αδιάφορη και ανταγωνιστική αλληλεπίδραση των δύο φαρμάκων. Επειδή ο ακριβής μηχανισμός δράσης της πενταμιδίνης δεν είναι γνωστός (βλέπε παρακάτω) είναι δύσκολο να εξηγηθεί η μικροβιολογίκη βάση της πιθανής ύπαρξης ανταγωνισμού μεταξύ των δύο αυτών φαρμάκων. Είναι πιθανό η έκθεση του υφομύκητα στην πενταμιδίνη να τροποποιεί σε ορισμένα στελέχη *Fusarium* επιτόπους στην επιφάνεια του υφομύκητα και να αποτρέπει την πρόσδεση της αμφοτερικίνης Β στο κυτταρικό τοίχωμα ώστε να ασκήσει την αντιμυκητιασική της δράση.

Ανεξαρτήτως της αιτιολογίας, η διαφορά αυτή στην εκτίμηση της αλληλεπίδρασης των φαρμάκων μεταξύ των δύο χρησιμοποιούμενων *in vitro* μεθόδων καταδεικνύει την μη

ύπαρξη τυποποιημένων μεθόδων στην σύγχρονη πειραματική μυκητολογία οι οποίες να αποτυπώνουν αξιόπιστα και αντικειμενικά την ύπαρξη ή μη συνέργειας μεταξύ διαφορετικών φαρμάκων στο εργαστήριο (397). Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι η διενέργεια *in vivo* πειραμάτων για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ αντιμυκητιασικών φαρμάκων (*in vivo checkerboard method*) επίσης συναντά πολλές δυσκολίες καθώς απαιτείται ένας πολύ μεγάλος αριθμός πειραματοζώων ώστε να ελεγχθούν οι πολλές διαφορετικές συγκεντρώσεις των δύο φαρμάκων, ένα χαρακτηριστικό το οποίο καθιστά τέτοιου είδους μελέτες χρονοβόρες και οικονομικά ασύμφορες. Για το λόγο αυτό, νέες *in vitro* φαρμακοδυναμικές τεχνικές (398) και εναλλακτικά ασπονδυλωτά *in vivo* πειραματικά μοντέλα (π.χ., *Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Galleria mellonella, Acanthamoeba castellanii*) έχουν πρόσφατα προταθεί και δημοσιευθεί για να υπερνικηθεί αυτό το μειονέκτημα (399–402).

Αναφορικά με τον πιθανό μηχανισμό δράσης της συνεργικής αλληλεπίδρασης του συνδυασμού της πενταμιδίνης και της αμφοτερικίνης Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium*, είναι δύσκολο να βγουν σίγουρα συμπεράσματα επειδή ο μηχανισμός δράσης της πενταμιδίνης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Σε προηγούμενες μελέτες, η αμφοτερικίνη Β έχει δειχθεί να δρα συνεργικά με την ριφαμπικίνη, την αζιθρομυκίνη και τις τετρακυκλίνες έναντι των υφομυκήτων *Aspergillus* και *Fusarium* (305–308, 403). Ως εκ τούτου, επειδή ο μηχανισμός όλων των ανωτέρω αντιμικροβιακών φαρμάκων είναι η αναστολή διαφορετικών σταδίων της πρωτεϊνικής σύνθεσης είναι πιθανόν ότι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης να είναι και ο μηχανισμός δράσης της πενταμιδίνης σε συνδυασμό με τη δράση της αμφοτερικίνης Β στο κυτταρικό τοίχωμα με την πρόκληση οσμωτικής λύσης (*osmotic lysis*).

Ένα πιθανό μειονέκτημα της χρήσης των δύο αυτών φαρμάκων στην κλινική πράξη είναι η πιθανότητα εμφάνισης νεφροτοξικότητας. Επομένως, όταν τα δύο αυτά φάρμακα χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα σε ασθενείς, απαιτείται στενή παρακολούθηση της νεφρικής τους λειτουργίας. Πάντως, επειδή η πιο συχνή κλινική εκδήλωση της διηθητικής φουσαρίωσης είναι η εμφάνιση πνευμονίας, η χορήγηση αμφοτερικίνης Β δια της συστηματικής οδού μαζί με τη χορήγηση εισπνεόμενης πενταμιδίνης, η οποία απορροφάται ελάχιστα στη συστηματική κυκλοφορία και επομένως δεν προκαλεί

σημαντική τοξικότητα, θα μπορούσε πέρα από την αυξημένη συνεργική δραστικότητα να ελαττώσει και την συστηματική τοξικότητα των δύο αυτών αντιμυκητιασικών φαρμάκων.

Εν κατακλείδι, στο δεύτερο τμήμα αυτής της διδακτορικής διατριβής αποδείχθηκε ότι ο συνδυασμός της αμφοτερικίνης Β, η οποία είναι το φάρμακο που αποτελεί τη βάση της σύγχρονης θεραπείας για τη διηθητική φουσαρίωση, και της πενταμιδίνης ήταν συνεργικός έναντι των περισσότερων κλινικών στελεχών του υφομύκητα *Fusarium* που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη ότι ο συγκεκριμένος συνδυασμός φαρμάκων ίσως να έχει θέση στην κλινική πράξη στην αντιμετώπιση της διηθητικής φουσαρίωσης. Περισσότερες μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ζώων με διηθητική φουσαρίωση θα χρειαστούν ώστε να επιβεβαιωθεί η αρχική αυτή *in vitro* παρατήρηση και να διευκρινιστεί ο ρόλος του συγκεκριμένου αντιμικροβιακού συνδυασμού στην κλινική πράξη για την καλύτερη αντιμετώπιση της ευκαιριακής αυτής λοίμωξης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Γ′

IN VIVO ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΜΙΔΙΝΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΦΟΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM* ΣΕ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΜΕ ΔΙΗΘΗΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΦΟΥΣΑΡΙΩΣΗ

Μετά από την διενέργεια των *in vitro* πειραμάτων του Ειδικού Μέρους Α′ που κατέδειξαν την αξιοσημείωτη δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium*, έγινε διερεύνηση της δραστικότητας της πενταμιδίνης *in vivo*. Για το σκοπό αυτό, στην αρχή δημιουργήθηκε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση και εν συνεχεία μελετήθηκε η δραστικότητα της πενταμιδίνης τόσο ως προφύλαξη (χορηγούμενη πριν τη εγκατάσταση της λοίμωξης από τον υφομύκητα) όσο και ως θεραπεία (χορηγούμενη μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης) έναντι ενός κλινικού σελέχους *Fusarium oxysporum*.

1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Γ′

1α. Στέλεχος *Fusarium*

Για τη διερεύνηση της *in vivo* δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* χρησιμοποιήθηκε ένα κλινικό στέλεχος *Fusarium oxysporum* το οποίο απομονώθηκε από βιοψία πνεύμονα ενός ασθενούς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (*acute myelogenous leukemia*) ο οποίος πέθανε εξαιτίας της ανάπτυξης διηθητικής πνευμονικής φουσαρίωσης (*Πίνακας 10*, στέλεχος *F15*). Οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της αμφοτερικίνης Β και της πενταμιδίνης έναντι του συγκεκριμένου στελέχους *Fusarium oxysporum* ήταν 2 μg/ml και 4 μg/ml αντίστοιχα σύμφωνα με τη μέθοδο *NCCLS M38-P* (352). Οι τιμές ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης ήταν 2 μg/ml και 4 μg/ml για την αμφοτερικίνη Β και την πενταμιδίνη αντίστοιχα σύμφωνα με τη εργαστηριακή μέθοδο που προτάθηκε από τους *Espinel-Ingroff* και συνεργάτες (353).

1β. Ποντίκια

Λευκά θυληκά ποντίκια *Balb-c* (*Εικόνα 52*; *Harlan Sprague-Dawley Inc., Indianapolis, Indiana, IN*) χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την διερεύνηση της *in vivo* δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium*. Το βάρος των ποντικών κατά τη διενέργεια των πειραμάτων ήταν μεταξύ 20 και 25 γραμμαρίων το καθένα. Τα ποντίκια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα κλουβιά (5 ποντίκια ανά κλουβί) και ήταν ελεύθερα σε χρήση αποστειρωμένης τροφής και νερού στην εξειδικευμένη μονάδα χρησιμοποίησης πειραματικών μοντέλων ζώων (*Animal Care Facility*) του *The University of Texas MD Anderson Cancer Center*. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας τα υψηλότερα στάνταρ προστασίας και σεβασμού προς τα πειραματόζωα μετά από αποδοχή των συνθηκών αυτών από την αρμόδια επιτροπή του νοσοκομείου (*Institutional Animal Care and Use Committees*).

Εικόνα 52. Ποντίκια *Balb-c* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της *in vivo* δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium*

1γ. Ανοσοκαταστολή

Η ανοσοκαταστολή στα ποντίκια *Balb-c* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα επιτεύχθηκε με έγχυση κυκλοφωσφαμίδης (*cyclophosphamide*; *Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, MO; Εικόνα 53*), η οποία χορηγήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή (*IP; intraperitoneal*) ένεση 3 (*τρεις*) ημέρες πριν και 1 (*μία*) ημέρα μετά από την εγκατάσταση της λοίμωξης με το κλινικό στέλεχος *Fusarium oxysporum* (*Εικόνα 53*). Το διάλυμα κυκλοφωσφαμίδης προετοιμαζόταν κάθε φορά φρέσκο την ημέρα της χρησιμοποίησης του και η τελική χρησιμοποιούμενη δόση για κάθε ποντίκι ήταν 150 mg/kg η οποία προέκυπτε από τη χορήγηση 200 με 250 μl από ένα αρχικό διάλυμα κυκλοφωσφαμίδης σε απεσταγμένο φυσιολογικό ορό συγκέντρωσης ίσης με 15 mg/ml. Το ανοσοκατασταλτικό αυτό σχήμα έχει

δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες να προκαλεί ουδετεροπενία (απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων < 100/ml) εντός 3 (*τριών*) ημερών από την πρώτη δόση του φαρμάκου και η ουδετεροπενία αυτή διαρκεί για 4 (*τέσσερις*) ημέρες μετά την τελευταία χορηγούμενη δόση (404).

Εικόνα 53. Κυκλοφωσφαμίδη

1δ. Αντιμυκητιασικά φάρμακα

Η δεοξυχολική αμφοτερικίνη Β (*Pharma-Tek, Huntington, New York, NY*) αναμείχθηκε με απεσταγμένο νερό και χορηγήθηκε στα ποντίκια ενδοπεριτοναϊκά σε τελική συγκέντρωση ίση με 1.5 mg/kg κάθε 24 ώρες (*Εικόνα 54*). Η συγκέντρωση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε προηγούμενα πειραματικά μοντέλα ποντικών με διηθητικές λοιμώξεις από υφομύκητες (π.χ., *Aspergillus*, *Fusarium*) (216, 405) και έχει δειχθεί να οδηγεί σε συγκεντρώσεις αμφοτερικίνης Β στο αίμα και στους ιστούς των ποντικών οι οποίες είναι παρόμοιες με τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου που επιτυγχάνονται σε ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν συνήθεις δόσεις αμφοτερικίνης Β στην κλινική πράξη (0.5 – 1 mg/Kg κάθε 24 ώρες).

Η ισεθιονική πενταμιδίνη (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, MO*) αναμείχθηκε με απεσταγμένο νερό και χορηγήθηκε στα ποντίκια ενδοφλέβια (*intravenous; IV*) σε τελική συγκέντρωση ίση με 8.5 mg/Kg κάθε 24 ώρες (*Εικόνα 54*). Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη δόση πενταμιδίνης για τα *in vivo* πειράματα ήταν ο εξής: φαρμακοκινητικές μελέτες πενταμιδίνης που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση πενταμιδίνης σε δόση ίση με 17 mg/Kg κάθε 24 ώρες οδηγεί σε επίπεδα πενταμιδίνης στους ιστούς των ποντικών (συμπεριλαμβανομένου των πνευμόνων) οι οποίες είναι παρόμοιες με τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου που

επιτυγχάνονται στους ιστούς ασθενών μετά από χορήγηση συνήθων δόσεων πενταμιδίνης στην κλινική πράξη (4 mg/Kg κάθε 24 ώρες) (406, 407).

Με βάση αυτές τις φαρμακοκινητικές μελέτες, και επειδή στόχος της παρούσας έρευνας ήταν να δημιουργηθούν πειραματικές συνθήκες στα ποντίκια οι οποίες να είναι όσο το δυνατό παρόμοιες με ότι συμβαίνει σε ασθενείς, στα αρχικά *in vivo* πειράματα χρησιμοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση πενταμιδίνης σε δόση ίση με 17 mg/Kg/24 ώρες. Όμως, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση πενταμιδίνης στα ποντίκια τόσο στην προαναφερθείσα δόση (17 mg/Kg/24 ώρες) όσο και στη μισή δόση (8.5 mg/Kg/24 ώρες) οδήγησε σε σημαντική τοξικότητα. Συγκεκριμένα, σημαντικός αριθμός ποντικών ανέπτυξαν εκτεταμένη ενδοκοιλιακή νέκρωση όπως έγινε φανερό κατά τη διενέργεια νεκροψίας. Ο λόγος για αυτή την τοξική επίδραση της πενταμιδίνης είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα της πρόκλησης νεκρωτικής παγκρεατίτιδας, η οποία είναι μια γνωστή παρενέργεια από τη χορήγηση πενταμιδίνης σε ασθενείς (337).

Εν συνεχεία, σε επόμενα πειράματα, για να αποφευχθεί η ανωτέρω τοπική (*topical*) παρενέργεια εξαιτίας της ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης του φαρμάκου, χρησιμοποιήθηκε ενδοφλέβια χορήγηση πενταμιδίνης σε δόση ίση με 17 mg/Kg/24 ώρες. Όμως, η ενδοφλέβια αυτή δόση πάλι οδήγησε σε σημαντική τοξικότητα στα ποντίκια, πολλά από τα οποία πέθαναν εντός μερικών λεπτών από τη χορήγηση του φαρμάκου. Ο λόγος για αυτή την τοξική επίδραση της πενταμιδίνης είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα πρόκλησης σοβαρών ηλεκτρολυτικών διαταραχών όπως υποασβεστιαιμία και υπομαγνησιαιμία, πρόκλησης υπογλυκαιμικού κώματος (*hypoglycemic coma*) ή εμφάνισης θανατηφόρων καρδιακών αρρυθμιών όπως *torsades de pointes* εξαιτίας της επιμύκηνσης του διαστήματος QT (335, 342, 343). Όλες οι ανωτέρω παρενέργειες μπορούν να παρατηρηθούν μετά από τη χορήγηση πενταμιδίνης σε ασθενείς που λαμβάνουν το φάρμακο (335, 342, 343).

Τέλος, η ενδοφλέβια χορήγηση πενταμιδίνης σε δόση ίση με 8.5 mg/Kg/24 ώρες (μισή δόση από την 17 mg/Kg/24 ώρες που προκάλεσε την τοξικότητα που αναφέρθηκε παραπάνω) ήταν ανεκτή από τα ποντίκια χωρίς την πρόκληση καμίας εμφανούς τοξικής επίδρασης. Ως εκ τούτου, αυτή ήταν η δόση η οποία χρησιμοποιήθηκε για τα *in vivo* πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

1ε. Καλλιέργεια κονιδίων *Fusarium*

Για την προετοιμασία των διαλυμάτων με κονίδια *Fusarium*, καλλιέργειες με κονίδια αφέθηκαν για 5 ημέρες στους 37 ^{o}C σε μέσο καλλιέργειας *potato dextrose agar* (*PDA; Remel, Lenexa, Kansas, KS*) (405). Το τελικό διάλυμα προετοιμάστηκε μετά από πλύση της επιφάνειας των τρυβλίων *petri* με διάλυμα *0.1% Tween 80* σε 10 ml απεσταγμένο φυσιολογικό ορό (*sterile physiological saline*) και φιλτράρισμα του διαλύματος μέσα από ένα διπλό φίλτρο ώστε να απομακρυνθούν οι υφές *Fusarium* και να παραμείνουν μόνο τα κονίδια (405). Ο αριθμός των κονιδίων εν συνεχεία επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια ενός αιματοκυτόμετρου (*hemocytometer*) και ενός λογισμικού προγράμματος (*Image Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, MD*). Η βιωσιμότητα των κονιδίων ήταν μεγαλύτερη από 99% σε κάθε πείραμα όπως διαπιστώθηκε με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος, επίστρωση των κονιδίων σε τρυβλία *petri* και μέτρηση των βιώσιμων καλλιεργειών (*CFU; colony forming units*) (405).

1ζ. Διαλύματα κονιδίων *Fusarium* με διαφορετικές συγκεντρώσεις

Για την εγκατάσταση του πειραματικού μοντέλου ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά διαλύματα κονιδίων του στελέχους *Fusarium oxysporum F15* με διαφορετική συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, το εύρος των διαλυμάτων κονιδίων ήταν μεταξύ 10^7 κονίδια ανά ml και 10^9 κονίδια ανά ml. Ως εκ τούτου, σε διαφορετικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα με συγκέντρωση ίση με:

- 10^7 κονίδια ανά ml,
- 2 x 10^7 κονίδια ανά ml,
- 5 x 10^7 κονίδια ανά ml,
- 10^8 κονίδια ανά ml,
- 2 x 10^8 κονίδια ανά ml,
- 5 x 10^8 κονίδια ανά ml, και
- 10^9 κονίδια ανά ml.

Για τον ενοφθαλμισμό κάθε ποντικού με κονίδια του στελέχους *Fusarium oxysporum* χρησιμοποιήθηκαν περίπου 35 μl από το εκάστοτε αρχικό διάλυμα κονιδίων. Ως εκ τούτου, για την εγκατάσταση του πειραματικού μοντέλου ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση το εύρος του αριθμού των κονιδίων που τελικά μεταφέρονταν σε κάθε ποντίκι

ήταν μεταξύ ~ 35 x 10^4 κονίδια (στα ποντίκια τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με 35 μl από το αρχικό διάλυμα κονιδίων με συγκέντρωση ίση με 10^7 κονίδια ανά ml) και ~ 35 x 10^6 κονίδια (στα ποντίκια τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με 35 μl από το αρχικό διάλυμα κονιδίων με συγκέντρωση ίση με 10^9 κονίδια ανά ml). Ο ακριβής αριθμός κονιδίων που ενοφθαλμίστηκαν σε κάθε ποντίκι στο εκάστοτε πείραμα (σε παρένθεση αναφέρεται η αντίστοιχη συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος κονιδίων *Fusarium oxysporum* που χρησιμοποιήθηκε για την εγκατάσταση της λοίμωξης) ήταν:

- ~ 35 x 10^4 κονίδια (10^7 κονίδια ανά ml),
- ~ 70 x 10^4 κονίδια (2 x 10^7 κονίδια ανά ml),
- ~ 105 x 10^4 κονίδια (5 x 10^7 κονίδια ανά ml),
- ~ 35 x 10^5 κονίδια (10^8 κονίδια ανά ml),
- ~ 70 x 10^5 κονίδια (2 x 10^8 κονίδια ανά ml),
- ~ 105 x 10^5 κονίδια (5 x 10^8 κονίδια ανά ml), και
- ~ 35 x 10^6 κονίδια (10^9 κονίδια ανά ml).

1η. Εγκατάσταση της πνευμονικής λοίμωξης

Τα ποντίκια μολύνθηκαν με κονίδια *Fusarium oxysporum* με ενοφθαλμισμό (*inoculation*) τους μέσω της ενδορινικής/αναπνευστικής (*sinopulmonary*) οδού χρησιμοποιώντας τη μέθοδο η οποία είχε αρχικά περιγραφεί από τους *Dixon* και συνεργάτες (408) και έχοντας ως οδηγό την εκτεταμένη πρότερη εμπειρία της ερευνητικής ομάδας υπό τον κ. Δημήτριο Κοντογιάννη με τη χρήση του αντίστοιχου πειραματικού μοντέλου ποντικού με οξεία διηθητική πνευμονική ασπεργίλλωση (405).

Τα ανοσοκατασταλμένα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν μέσα σε ένα ειδικό θάλαμο αναισθησίας (*anesthesia chamber*) ο οποίος περιείχε ισοφλουράνιο (*isoflurane*) σε συγκέντρωση 5% με συνεχή παροχή οξυγόνου σε συγκέντρωση ίση με 5 λίτρα ανά λεπτό (5 *liters/min*) (405). Ο μέσος χρόνος κατά τον οποίο τα ποντίκια ήταν εκτεθειμένα στο ισοφλουράνιο ήταν περίπου 180 με 240 δευτερόλεπτα. Κατά τη διάρκεια του ενδορινικού ενοφθαλμισμού με κονίδια *Fusarium*, τα ποντίκια βρισκόνταν σε κατακόρυφη θέση με το στόμα τους κλειστό και μία σταγόνα όγκου 35 μl από ένα από τα διαλύματα με διαφορετική συγκέντρωση κονιδίων *Fusarium oxysporum* που αναφέρθηκαν παραπάνω μεταφερόταν στα ρουθούνια (*nares*) των ποντικών (405, 408). Η σταγόνα αυτή εν συνεχεία εισπνεόταν

ακούσια από τα αναισθητοποιημένα ποντίκια. Η μύτη των ποντικών μετά σκουπιζόταν με διάλυμα αιθανόλης (συγκέντρωση 70%) και τα ποντίκια τοποθετούνταν πίσω στα κλουβιά τους.

Τα ποντίκια παρακολουθούνταν κάθε 12 ώρες μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης για 96 ώρες συνολικά και ζυγίζονταν καθημερινά (405). Για τον εντοπισμό πιθανής τοξικότητας από τη χορήγηση των αντιμυκητιασικών φαρμάκων αυτών καθεαυτών, σε πιλοτικά πειράματα (*pilot experiments*), ποντίκια τα οποία δε μολύνθηκαν με κονίδια *Fusarium* αλλά στα οποία χορηγήθηκε πενταμιδίνη ή αμφοτερικίνη Β ζυγίζονταν καθημέρινα για ανίχνευση πιθανής απώλειας βάρους ή άλλων συμπτωμάτων που θα υποδήλωναν τοξική επίδραση κάποιου από τα αντιμυκητιασικά αυτά φάρμακα. Ποντίκια τα οποία ήταν ετοιμοθάνατα πριν το τελικό χρονικό σημείο των 96 ωρών μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης θανατώνονταν με τη χρήση ασφυξίας με διοξείδιο του άνθρακα (CO_2 *asphyxiation*) και μετατόπισης της αυχενικής μοίρας της σπονδυλικής τους στήλης (*cervical spine dislocation*) και ο θάνατος του συγκεκριμένου ποντικού καταγραφόταν ως να έλαβε χώρα 12 ώρες αργότερα (*Εικόνα 54*) (405). Στις 96 ώρες μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης όλα τα εναπομείναντα ζωντανά ποντίκια θανατώνονταν με ευθανασία χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω (*Εικόνα 54*) (405).

1θ. Προφύλαξη και θεραπεία με πενταμιδίνη και αμφοτερικίνη Β

Τα ποντίκια χωρίστηκαν σε υποομάδες των 10 (*δέκα*) ζώων η καθεμία και σε κάθε ξεχωριστή υποομάδα χορηγήθηκε (*Εικόνα 54*):

- <u>*Προφύλαξη με πενταμιδίνη*</u> με χορήγηση δόσης 8.5 mg/Kg/24 ώρες ενδοφλέβια (*intravenously*; *IV*) ξεκινώντας 24 ώρες πριν από την εγκατάσταση της λοίμωξης, ή
- <u>*Προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β*</u> με χορήγηση δόσης 1.5 mg/Kg/24 ώρες ενδοπεριτοναϊκά (*intraperitoneally*; *IP*) ξεκινώντας 24 ώρες πριν από την εγκατάσταση της λοίμωξης, ή
- <u>*Θεραπεία με πενταμιδίνη*</u> με χορήγηση δόσης 8.5 mg/Kg/24 ώρες ενδοφλέβια (*IV*) ξεκινώντας 6 ώρες μετά από την εγκατάσταση της λοίμωξης, ή
- <u>*Φυσιολογικός ορός*</u> (*physiological saline*) ενδοφλέβια (*IV*) κάθε 24 ώρες. Τα ποντίκια αυτά ήταν τα ποντίκια-μάρτυρες (*control group*).

Τα παραπάνω πειράματα προφύλαξης και θεραπείας διενεργήθηκαν 3 (*τρεις*) ανεξάρτητες φορές σε 3 (*τρεις*) διαφορετικές μέρες.

1η. Ποσοτικοποίηση του εύρους πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* με βάση τη μέθοδο της ποσοτικής αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης (*qPCR*)

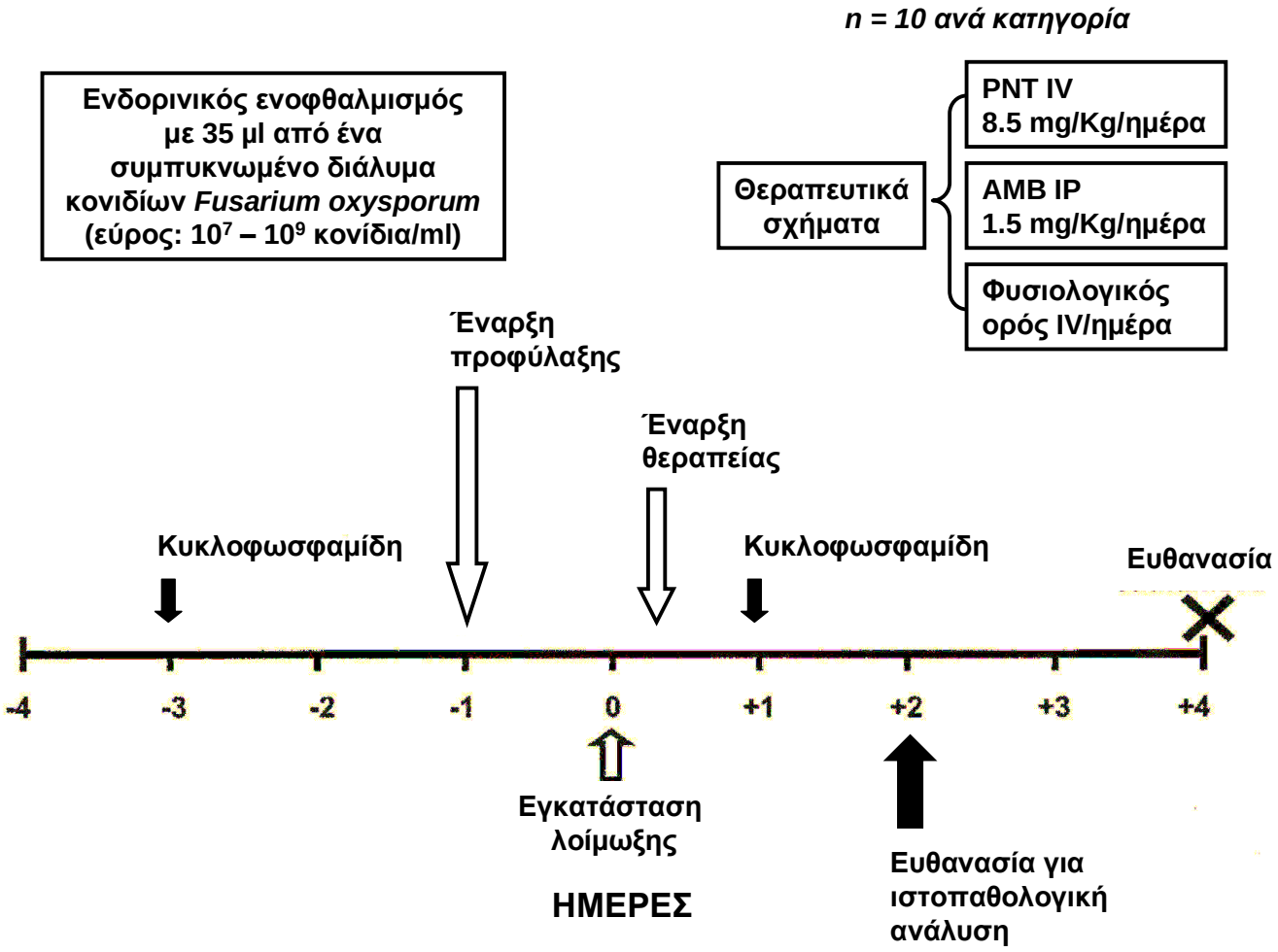
Σε δύο από τα τρία παραπάνω πειράματα, οι πνεύμονες των 10 (*δέκα*) ποντικών που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη, των 10 (*δέκα*) ποντικών που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β, των 10 (*δέκα*) ποντικών που έλαβαν θεραπεία με πενταμιδίνη και των 10 (*δέκα*) ποντικών-μαρτύρων που δεν έλαβαν καμία αντιμυκητιασική αγωγή απομακρύνθηκαν αμέσως μετά από την ευθανασία των ζώων και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους –80 ^{o}C μέχρι την μετέπειτα ποσοτικοποίηση (*quantification*) του εύρους πνευμονικής διήθησης (*pulmonary fungal burden*) από τον υφομύκητα *Fusarium* με βάση τη μέθοδο της ποσοτικής αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης (*real time quantitative PCR; qPCR*) (409).

Το *DNA* εξήχθηκε (*extracted*) από τους ομογενοποιημένους πνεύμονες (*lung homogenates*) χρησιμοποιώντας το σύστημα *DNeasy tissue kit* (*QIAGEN, Valencia, California, CA*) και τα δείγματα *DNA* αναλύθηκαν εις διπλούν χρησιμοποιώντας το σύστημα *ABI PRISM 7000 sequence detection system* (*Applied Biosystems, Foster City, California, CA*). Τα *primers* και τα φθορίζοντα υβριδικά *probes* (*dual-labeled fluorescent hybridization probes*) τα οποία ήταν ειδικά για το *18S* ριβοσωμικό *RNA* (*rRNA*) του *Fusarium oxysporum* σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα *ABI PRISM SeqScape* (έκδοση 2; *Applied Biosystems*) (409).

Τα *primers* και το *probe* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:
forward primer: 5'-TGGTGCATGGCCGTTCTTA-3', *reverse primer*: 5'-GGTCTCGTTCGTTATCGCAATT-3', *probe*: 5'-6-carboxyfluorescein-TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT-6-carboxytetramethylrhodamine-3'.

Το μεταίχμιο (*threshold cycle;* C_t) του κάθε δείγματος συγκρίθηκε εν συνεχεία με μια τυποποιημένη καμπύλη με 6 (*έξι*) τιμές C_t (*six-point standard curve*) που προέκυψαν από την επώαση άθικτων πνευμόνων ποντικών *Balb-c* (που δεν είχαν προηγουμένως μολυνθεί με τον υφομύκητα) με 10^2 εώς 10^7 κονίδια *Fusarium oxysporum* σε διαφορετικά πειράματα. Τα αποτελέσματα μετά αναφέρθηκαν ως κονιδιακά ανάλογα (*conidial equivalents*) του *DNA* του *Fusarium oxysporum* σε λογαριθμική κλίμακα (*log scale*) (409).

Εικόνα 54. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού μοντέλου ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση



1θ. Ιστοπαθολογική ανάλυση

Σε άλλα ξεχωριστά πειράματα, οι πνεύμονες 3 (*τριών*) ποντικών που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη, 3 (*τριών*) ποντικών που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β, 3 (*τριών*) ποντικών που έλαβαν θεραπεία με πενταμιδίνη και 3 (*τριών*) ποντικών-μαρτύρων που δεν έλαβαν καμία αντιμυκητιασική αγωγή απομακρύνθηκαν αμέσως μετά την ευθανασία των ζώων αυτών 2 (*δύο*) ημέρες μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης με σκοπό τη ποιοτική (*qualitative*) σύγκριση της βαρύτητας της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* με βάση την ιστοπαθολογική εικόνα και χρώση με *Grocott-Gomori methenamine-silver nitrate* (*GMS*) (*Εικόνα 54*).

1ι. Στατιστική ανάλυση

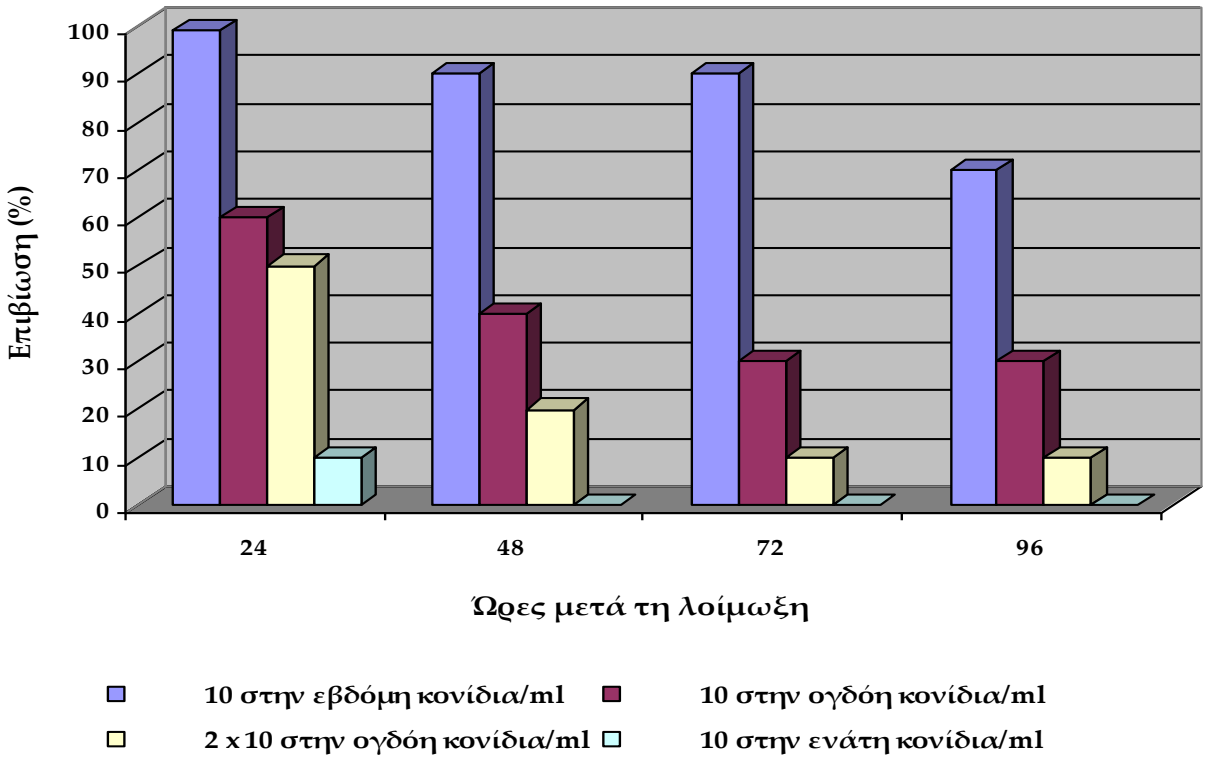
Καμπύλες επιβίωσης (*survical curves*) απεικονίστηκαν με βάση την ανάλυση *Kaplan-Meier* και διαφορές στην επιβίωση των διαφόρων υποομάδων ποντικών αναλύθηκαν με βάση το *log-rank test*. Για όλες τις συγκρίσεις, τιμές *P* μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Ανάλυση της μεταβλητότητας (*analysis of variance*) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση διαφορών μεταξύ των τιμών του εύρους πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* στις διάφορες υποομάδες των ποντικών.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Γ′

2α. Εγκατάσταση ουδετεροπενικού πειραματικού μοντέλου ποντικού *Balb-c* με οξεία διηθητική πνευμονική φουσαρίωση

Ο ενδορινικός ενδοφθαλμισμός των ποντικών *Balb-c* με κονίδια του στελέχους *Fusarium oxysporum* οδήγησε στην εγκατάσταση οξείας νεκρωτικής πνευμονίας με θνητότητα η οποία ήταν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση των κονιδίων του υφομύκητα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στον ενοφθαλμισμό. Συγκεκριμένα, ενοφθαλμισμός χρησιμοποιώντας το διάλυμα με συγκέντρωση 10^7 κονίδια ανά ml οδήγησε σε υποξεία λοίμωξη με θνητότητα ίση με 30% την τέταρτη ημέρα μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης, ενώ ενοφθαλμισμός χρησιμοποιώντας το διάλυμα με συγκέντρωση 10^9 κονίδια ανά ml οδήγησε σε υπεροξεία λοίμωξη με θνητότητα ίση με 90% μόλις την πρώτη ημέρα μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης (*Εικόνα 55*).

Εικόνα 55. Εγκατάσταση του ουδετεροπενικού πειραματικού μοντέλου ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση. Απεικονίζεται η δοσοεξαρτώμενη συνάρτηση της επιβίωσης των ποντικών ανάλογα με τη συγκέντρωση του διαλύματος των κονιδίων *Fusarium* η οποία χρησιμοποιήθηκε για την εγκατάσταση της λοίμωξης



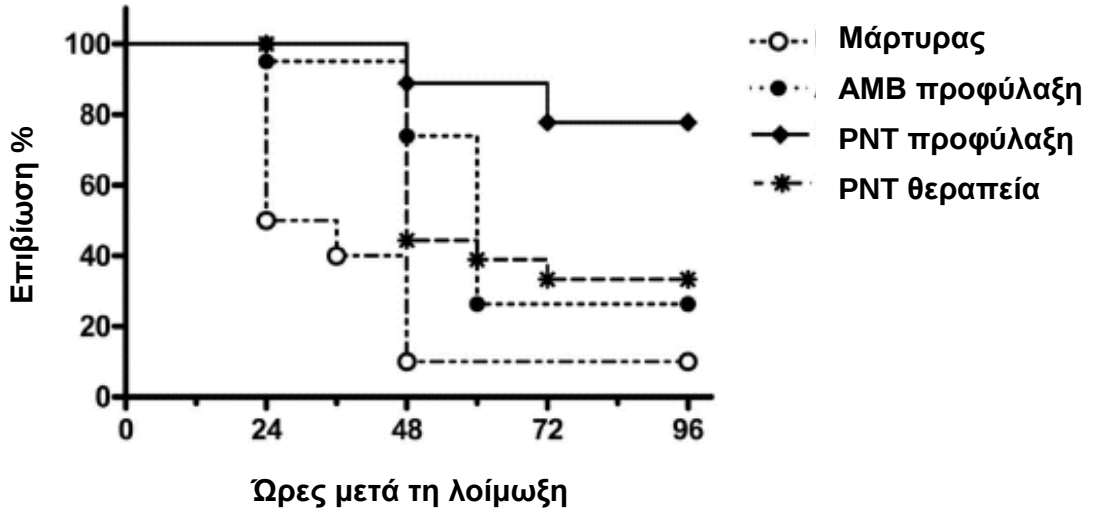
Για τη διενέργεια των πειραμάτων αξιολόγησης της δραστικότητας της πενταμιδίνης ως προφύλαξη ή θεραπεία έναντι του υφομύκητα *Fusarium* μολύνθηκαν τα ποντίκια χρησιμοποιώντας το διάλυμα με συγκέντρωση ίση με 2 x 10^8 κονίδια ανά ml η οποία συνεπαγόταν εγκατάσταση λοίμωξης με περίπου 70 x 10^5 κονίδια ανά ποντίκι. Η πιθανότητα ότι η οξεία θνητότητα (~ 50%) η οποία παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά τον ενδορινικό ενοφθαλμισμό ήταν εξαιτίας ανάπτυξης βακτηριακής λοίμωξης αποκλείστηκε με τη διενέργεια καλλιεργειών των ομογενοποιημένων πνευμόνων ποντικών που πέθαναν 24 ώρες μετά από τον ενοφθαλμισμό με κονίδια *Fusarium* σε τυποποιημένα μέσα καλλιέργειας. Σε αυτές τις καλλιέργειες δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηρίων. Επιπλέον, σε άλλα πειράματα, ιστοπαθολογικές εικόνες πνευμόνων ποντικών τα οποία πέθαναν 24 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό με κονίδια *Fusarium* με χρήση χρώσης *Grocott-Gomori methenamine silver nitrate* (*GMS*) κατέδειξε εκτεταμένη διήθηση από υφές του υφομύκητα και αιμορραγικές βλάβες χαρακτηριστικές της ύπαρξης διηθητικής φουσαρίωσης αλλά δεν έδειξε διήθηση από βακτήρια.

2β. Η προφύλαξη με πενταμιδίνη έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση των ποντικών *Balb-c* και την ελάττωση του εύρους της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* σε σχέση με την προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β.

Τα ποντίκια *Balb-c* τα οποία έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη είχαν σημαντικά υψηλότερη επιβίωση (77%) την τέταρτη ημέρα μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες τα οποία δεν έλαβαν αντιμυκητιασική προφύλαξη (10%, $P < 0.001$, *Εικόνα 56*). Επιπλέον, η προφύλαξη με πενταμιδίνη ήταν πιο αποτελεσματική από την αντίστοιχη με αμφοτερικίνη Β η οποία είχε ως αποτέλεσμα την επιβίωση μόνο του 27% των ποντικών την τέταρτη ημέρα μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης ($P = 0.01$, *Εικόνα 56*).

Εκτός από την επίτευξη καλύτερης επιβίωσης με τη χρήση προφύλαξης με πενταμιδίνη, τα ποντίκια τα οποία έλαβαν τέτοια προφύλαξη είχαν επίσης σημαντικά ελαττωμένο εύρος πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* σε σχέση τόσο με τα ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β ($P < 0.05$) όσο και με τα ποντίκια-μάρτυρες τα οποία δεν έλαβαν καμιά αντιμυκητιασική προφύλαξη ($P < 0.05$). Η ελάττωση αυτή του εύρους πνευμονικής διήθησης ήταν εμφανής τόσο με τη χρήση *qPCR* (*Εικόνα 57*) όσο και κατά την ιστοπαθολογική ανάλυση (*Εικόνα 58*).

Εικόνα 56. Διάγραμμα που απεικονίζει την επιβίωση ουδετεροπενικών ποντικών *Balb-c* με λοίμωξη από *Fusarium oxysporum* που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β, προφύλαξη με πενταμιδίνη, θεραπεία με πενταμιδίνη ή καμιά αντιμυκητιασική αγωγή (ποντίκια-μάρτυρες). Η επιβίωση ήταν σημαντικά αυξημένη στα ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες (*P* = 0.0003), στα ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη σε σχέση με τα ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β (*P* = 0.01) και στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με πενταμιδίνη (ή προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β) σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες (*P* = 0.02). Τα αποτελέσματα αποτελούν τη σύνοψη τριών διαφορετικών πειραμάτων. AMB, αμφοτερικίνη Β; PNT, πενταμιδίνη

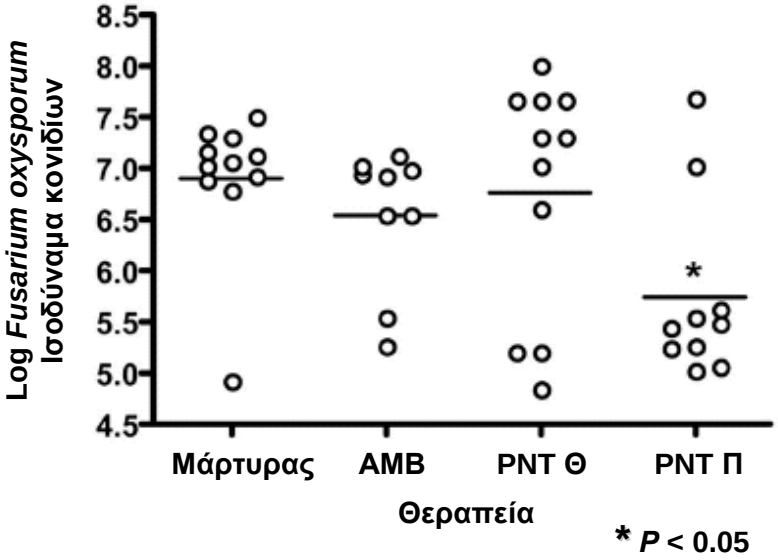


Τέλος, η προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β βελτίωσε την επιβίωση των ποντικών σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες (*P* = 0.02, *Εικόνα 56*) αλλά δεν ελάττωσε το εύρος πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* με βάση τη χρήση *qPCR* (*Εικόνα 57*) ή την ιστοπαθολογική ανάλυση (*Εικόνα 58–61*).

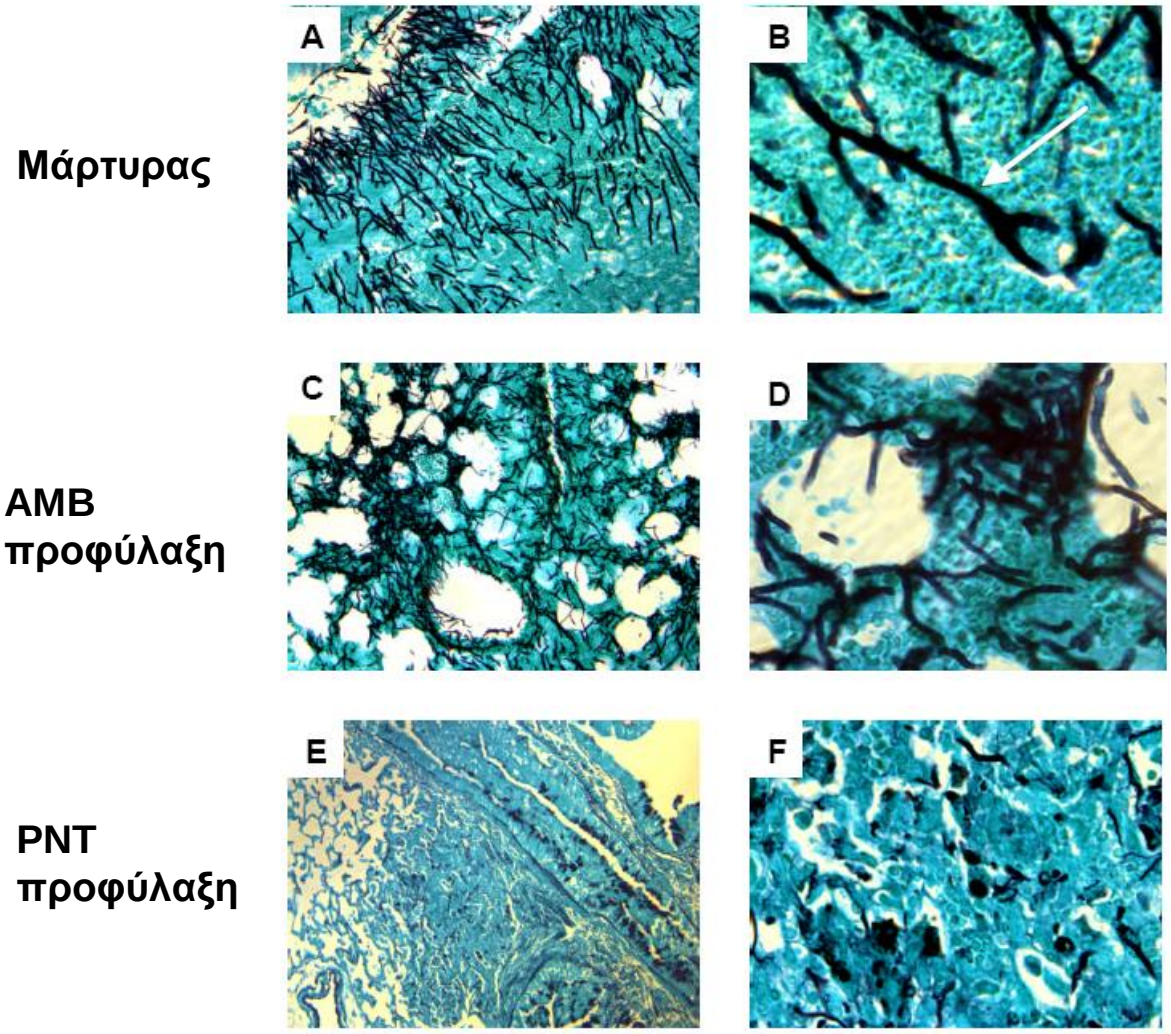
2γ. Η θεραπεία με πενταμιδίνη έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση των ποντικών *Balb-c* αλλά δεν επηρεάζει το εύρος της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα *Fusarium* σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες

Τα ποντίκια *Balb-c* τα οποία έλαβαν θεραπεία με πενταμιδίνη είχαν σημαντικά υψηλότερη επιβίωση (33%) την τέταρτη ημέρα μετά την εγκατάσταση της λοίμωξης σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες τα οποία δεν έλαβαν καμία αντιμυκητιασική θεραπεία (10%, *P* = 0.02, *Εικόνα 56*). Αντίθετα, η θεραπεία με πενταμιδίνη δεν ελάττωσε το εύρος της πνευμονικης διήθησης από τον υφομύκητα σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες τόσο με τη χρήση *qPCR* (*Εικόνα 57*) όσο και με βάση την ιστοπαθολογική ανάλυση (*Εικόνα 62*).

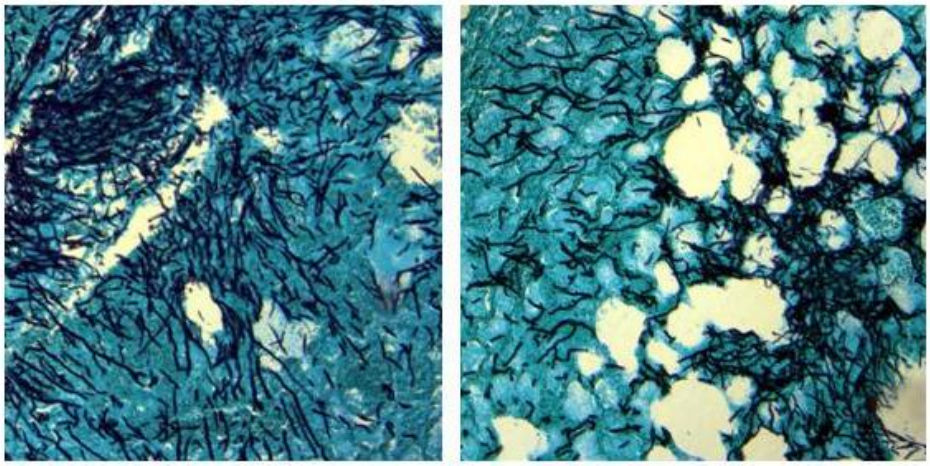
Εικόνα 57. Διαφορές στο εύρος της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα (εκφρασμένες ως κονιδιακά ανάλογα *DNA* του *Fusarium oxysporum*) με βάση τη χρήση *qPCR* σε ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη, προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β, θεραπεία με πενταμιδίνη και ποντίκια-μάρτυρες που δεν έλαβαν καμιά αντιμυκητιασική αγωγή. Το εύρος της πνευμονικής διήθησης ήταν σημαντικά ελαττωμένο στα ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη σε σχέση με όλες τις άλλες υποομάδες ποντικών ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα αποτελούν τη σύνοψη δύο διαφορετικών πειραμάτων. ΑΜΒ, προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β; ΡΝΤ Θ, θεραπεία με πενταμιδίνη; ΡΝΤ Π, προφύλαξη με πενταμιδίνη



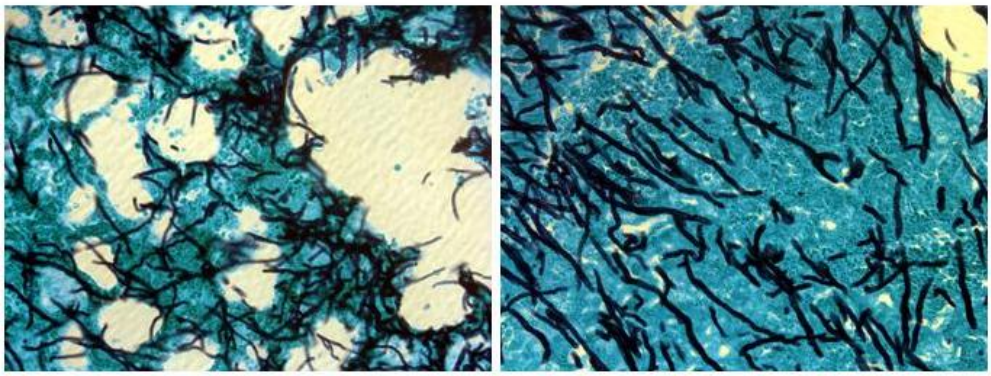
Εικόνα 58. Αντιπροσωπευτικές ιστοπαθολογικές εικόνες (με χρώση *Grocott-Gomori methenamine silver* [*GMS*]) πνευμονικού ιστού από ποντίκια-μάρτυρες (A, B), ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη B (C, D), και ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη (E, F). Το λευκό βέλος δείχνει τις υφές του *Fusarium oxysporum*. Είναι εμφανής η ελάττωση του εύρους της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα σε ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη. Η μεγέθυνση στις εικόνες A, C και E είναι x 200 ενώ στις εικόνες B, D και F είναι x 1000. AMB, αμφοτερικίνη B; PNT, πενταμιδίνη



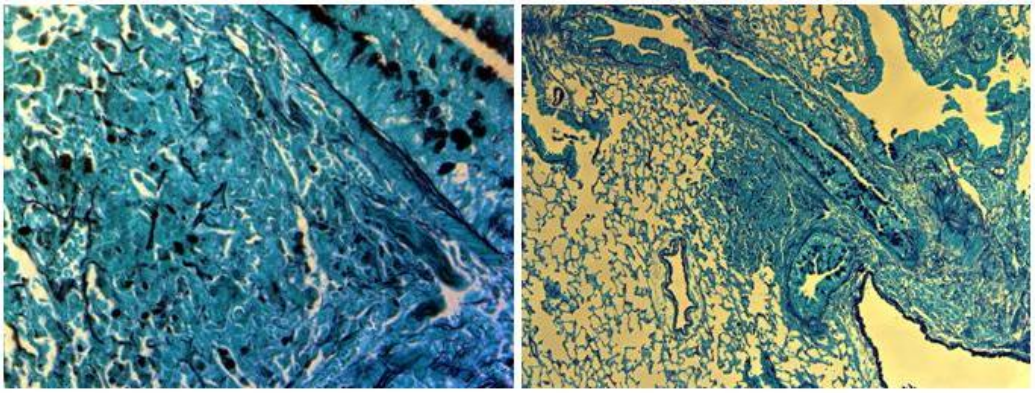
Εικόνα 59. Αντιπροσωπευτικές ιστοπαθολογικές εικόνες (με χρώση *Grocott-Gomori methenamine silver* [*GMS*]) πνευμονικού ιστού από ποντίκια-μάρτυρες που δεν έλαβαν καμιά αντιμυκητιασική αγωγή



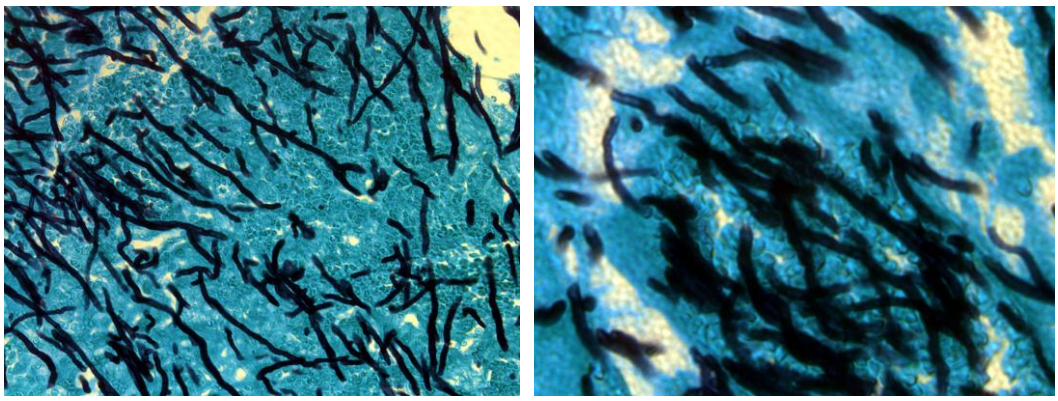
Εικόνα 60. Αντιπροσωπευτικές ιστοπαθολογικές εικόνες (με χρώση *Grocott-Gomori methenamine silver* [*GMS*]) πνευμονικού ιστού από ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β



Εικόνα 61. Αντιπροσωπευτικές ιστοπαθολογικές εικόνες (με χρώση *Grocott-Gomori methenamine silver* [*GMS*]) πνευμονικού ιστού από ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με πενταμιδίνη. Φαίνεται η ελαττωμένη διήθηση από τον υφομύκητα σε σχέση με τις αντίστοιχες εικόνες ποντικών που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β (Εικόνα 60) ή ποντίκια-μάρτυρες που δεν έλαβαν καμιά αντιμυκητιασική αγωγή (Εικόνα 59)



Εικόνα 62. Αντιπροσωπευτικές ιστοπαθολογικές εικόνες (με χρώση *Grocott-Gomori methenamine silver* [*GMS*]) πνευμονικού ιστού από ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με πενταμιδίνη. Η μεγέθυνση στην αριστερή εικόνα είναι x 200 ενώ στη δεξιά εικόνα είναι x 1000



3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ Γ'

Στο τρίτο αυτό τμήμα της διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium in vivo* ώστε να επιβεβαιωθούν και να επεκταθούν τα *in vitro* ευρήματα που αναφέρθηκαν στο Ειδικό Μέρος Α' της μελέτης αυτής. Ως εκ τούτου, για το σκοπό αυτό χρειάστηκε αρχικά να γίνει η εγκατάσταση ενός ουδετεροπενικού πειραματικού μοντέλου ποντικού *Balb-c* με οξεία διηθητική πνευμονική φουσαρίωση. Επειδή ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της διηθητικής φουσαρίωσης και ο πιο καθοριστικός προγνωστικός παράγοντας για τη λοίμωξη αυτή είναι η ύπαρξη ουδετεροπενίας (8, 9, 25, 26), επελέγη να γίνει εγκατάσταση ένός ουδετεροπενικού πειραματικού μοντέλου ποντικού με τη νόσο αντί να χρησιμοποιηθεί ένα μοντέλο φουσαρίωσης με χρήση κορτικοστεροειδών έτσι ώστε να γίνει προσομοίωση όσο το δυνατό πλησιέστερα στις συνθήκες που συναντώνται σε ασθενείς με τη θανατηφόρο αυτή λοίμωξη.

Όπως έχει αναφερθεί λεπτομερώς στο Γενικό Μέρος της διδακτορικής διατριβής η διηθητική φουσαρίωση αποτελεί μια ευκαιριακή μυκητιασική λοίμωξη έναντι της οποίας τα μοντέρνα αντιμυκητιασικά φάρμακα έχουν μικρή δραστικότητα, ειδικά σε ασθενείς με ουδετεροπενία (8–26). Τα *in vivo* μοντέλα διηθητικής φουσαρίωσης τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τη διερεύνηση της δραστικότητας αντιμυκητιασικών φαρμάκων έναντι του υφομύκητα *Fusarium* έχουν βασιστεί στην εγκατάσταση της λοίμωξης διαμέσω της ενδοφλέβιας χορήγησης κονιδίων *Fusarium* (212, 215, 216). Η ενδοφλέβια αυτή έγχυση κονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση διασπαρμένης νόσου. Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη, εγκαταστάθηκε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με διηθητική πνευμονική φουσαρίωση η οποία μιμείται την παθοφυσιολογία της λοίμωξης στους ανθρώπους (55) διαμέσω της ενδορινικής/αναπνευστικής χορήγησης των κονιδίων *Fusarium* η οποία προκαλεί εισπνοή των κονιδίων και εγκατάσταση πνευμονικής νόσου.

Μετά την εγκατάσταση αυτού του πειραματικού μοντέλου έγινε αξιολόγηση της δραστικότητας της πενταμιδίνης ως προφύλαξη ή θεραπεία έναντι ενός κλινικού στελέχους *Fusarium oxysporum*. Η προφύλαξη με πενταμιδίνη οδήγησε σε ελάττωση της θνητότητας και του εύρους πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα σε σχέση με την προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β ή τη μη χορήγηση προφύλαξης με κάποιο αντιμυκητιασικό φάρμακο. Παρά το γεγονός ότι η αμφοτερικίνη Β χορηγούμενη ως προφύλαξη ελάττωσε τη

θνητότητα των ποντικών σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες που δεν έλαβαν αντιμυκητιασική προφύλαξη, η ελάττωση αυτή της θνητότητας ήταν σημαντικά πιο περιορισμένη σε σχέση με την ελάττωση που προκάλεσε η προφύλαξη με πενταμιδίνη, ενώ επίσης η προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β δεν περιόρισε το εύρος της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα. Η περιορισμένη δραστικότητα της αμφοτερικίνης Β ως προφύλαξη έναντι της πνευμονικής φουσαρίωσης στο πειραματικό μοντέλο οφείλεται ως ένα βαθμό και είναι σε συμφωνία με την υψηλή τιμή ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*MIC*) του χρησιμοποιούμενου στελέχους *Fusarium oxysporum*. Όμως, εκτός από την υψηλή τιμή *MIC*, η περιορισμένη *in vivo* δραστικότητα της αμφοτερικίνης Β έναντι του υφομύκητα *Fusarium* σε περιπτώση ουδετεροπενίας έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε άλλα πειραματικά μοντέλα ποντικών με διασπαρμένη φουσαρίωση όσο και σε ασθενείς με τη διηθητική λοίμωξη στην κλινική πράξη (8–26, 212, 216).

Αντίστοιχα, η χορήγηση θεραπείας με πενταμιδίνη αύξησε την επιβίωση των ποντικών σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες που δεν έλαβαν καμιά αντιμυκητιασική θεραπεία. Όμως, η θεραπεία με πενταμιδίνη δεν ελάττωσε το εύρος της πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες. Η μεγαλύτερη *in vivo* δραστικότητα της πενταμιδίνης χορηγούμενης ως προφύλαξη σε σχέση με τη δραστικότητα της χορηγούμενης ως θεραπεία είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα του Ειδικού Μέρους Α' της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τα οποία φανέρωσαν ότι η πενταμιδίνη είναι περισσότερο δραστική *in vitro* έναντι των κονιδίων *Fusarium* σε σχέση με τη δραστικότητα της έναντι των υφών *Fusarium*. Η σχετική αυτή ανθεκτικότητα (*resistance*) των υφών υφομυκήτων σε σχέση με τα κονίδια στα αντιμυκητιασικά φάρμακα (αμφοτερικίνη Β, αζόλες) έχει δειχθεί στο παρελθόν και έναντι άλλων υφομυκήτων (*Aspergillus, Paecilomyces, Cladosporium, Scopulariopsis, Cladophialophora spp*) (365, 366) ενώ πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ισχύει και για την αμφοτερικίνη Β και ιτρακοναζόλη σε ένα κλινικό στέλεχος *Fusarium solani* (367).

Η αρχική πρόθεση στην παρούσα μελέτη ήταν να εξετασθεί η σχέση δόσης-αποτελέσματος στη χορήγηση πενταμιδίνης όπως επίσης και να μελετηθεί η χορήγηση του φαρμάκου χρησιμοποιώντας περισσότερες οδούς χορήγησης. Δυστυχώς, η τοξικότητα της πενταμιδίνης απέτρεψε από αυτό το εγχείρημα. Για παράδειγμα, όταν η πενταμιδίνη χορηγήθηκε ενδοφλεβίως σε δόση 17 mg/Kg/24 ώρες σημαντικός αριθμός ποντικών πέθανε

εντός λίγων λεπτών από την ενδοφλέβια χορήγηση του φαρμάκου, πιθανότατα εξαιτίας σημαντικών ηλεκτρολυτικών διαταραχών ή καρδιακών αρρυθμιών (342, 343). Επιπλέον, όταν η πενταμιδίνη χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά, σημαντικός αριθμός ποντικών ανέπτυξε ενδοκοιλιακή νέκρωση όπως παρατηρήθηκε στη νεκροψία των ζώων, πιθανότατα εξαιτίας ανάπτυξης νεκρωτικής παγκρεατίτιδας (337).

Το *in vivo* τμήμα της παρούσας μελέτης έχει ορισμένα μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, χρησιμοποιήθηκε μια δόση πενταμιδίνης η οποία έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε συγκεντρώσεις του φαρμάκου στους πνεύμονες ποντικών ίσες με τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου που επιτυγχάνονται σε ανθρώπους οι οποίοι λαμβάνουν τις συνήθεις δόσεις του φαρμάκου στην κλινική πρακτική (362–364, 406, 407). Όμως, στην παρούσα μελέτη δεν επιβεβαιώθηκε η συγκέντρωση της πενταμιδίνης στους πνεύμονες ή το αίμα των ποντικών με φαρμακοκινητικές μελέτες. Επιπλέον, η υπεροξεία φύση του πειραματικού μοντέλου διαφέρει ως ένα βαθμό από την πορεία της νόσου σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση η οποία τείνει να είναι περισσότερο υποξεία και να έχει ένα πιο αργό ρυθμό εγκατάστασης (55). Ως εκ τούτου, το πειραματικό μοντέλο ίσως να μην αποτελεί το πιο κατάλληλο μοντέλο για να δείξει τη *in vivo* δραστικότητα της πενταμιδίνης ως θεραπείας έναντι της διηθητικής φουσαρίωσης.

Ανεξάρτητα από αυτά τα μειονεκτήματα όμως, τα ευρήματα του *in vivo* αυτού τμήματος της διδακτορικής διατριβής επεκτείνουν και επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα του Ειδικού Μέρους Α’ τα οποία έδειξαν τη σημαντική *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium*. Επίσης, καταδεικνύουν ότι η πενταμιδίνη, σε φαρμακολογικά σχετικές συγκεντρώσεις, έχει σημαντική *in vivo* δραστικότητα έναντι της διηθητικής φουσαρίωσης, ειδικά όταν χρησιμοποιείται ως προφύλαξη. Μάλιστα, η χρήση της πενταμιδίνης ως προφύλαξη έναντι της πνευμονίας από *Pneumocystis jiroveci* σε ασθενείς με το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (*AIDS*) και σε αποδέκτες αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών έχει μελετηθεί εκτενώς (410–414). Ως εκ τούτου, η υιοθέτηση της υπόθεσης ότι οι ασθενείς αυτοί κατά τη διάρκεια της προφύλαξης με πενταμιδίνη προστατεύονται και έναντι της ανάπτυξης διηθητικής φουσαρίωσης είναι ελκυστική. Όμως, εξαιτίας της χαμηλής επίπτωσης της ευκαιριακής αυτής λοίμωξης, θα απαιτηθεί μεγάλος αριθμός ασθενών ώστε να ερευνηθεί και να απαντηθεί επαρκώς το ερώτημα αυτό.

ΣΥΝΟΨΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΩΝ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εξέτασε τη δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium*, ενός μυκητιασικού μικροοργανισμού ο οποίος είναι ανθεκτικός στην πλειοψηφία των μοντέρνων αντιμυκητιασικών φαρμάκων με αποτέλεσμα η διηθητική φουσαρίωση να έχει υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς παρά τη χρησιμοποίηση κατάλληλης αντιμυκητιασικής αγωγής.

Αρχικά, εξετάστηκε η *in vitro* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι δέκα κλινικών στελεχών *Fusarium* (τόσο στελέχη *Fusarium solani* όσο και non-*solani Fusarium*) τα οποία απομονώθηκαν από ασθενείς με νεοπλασίες από το *The University of Texas MD Anderson Cancer Center* στο Χιούστον των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής. Τα αποτελέσματα δύο ανεξάρτητων μικροβιολογικών τεχνικών (μέθοδος *NCCLS M38-P* και *disk diffusion susceptibility testing*) ανέδειξαν την σημαντική δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι όλων των στελεχών *Fusarium*. Η *in vitro* αυτή δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του *Fusarium* επιβεβαιώθηκε εν συνεχεία με άλλες μικροβιολογικές τεχνικές στο εργαστήριο όπως η χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου *XTT* και των φθορίζουσων χρωστικών *CFDA* και *DiBAC*. Επιπρόσθετα, η πενταμιδίνη είχε μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι των κονιδίων *Fusarium* σε σχέση με τη δραστικότητα της έναντι των υφών *Fusarium*, ένα εύρημα το οποίο έχει περιγραφεί στο παρελθόν και σε άλλους υφομύκητες συμπεριλαμβανομένου του *Aspergillus*.

Επιπλέον, υπό συνθήκες υποξίας δείχθηκε ότι η πενταμιδίνη έχει ακόμα πιο σημαντική δραστικότητα έναντι του υφομύκητα *Fusarium*, ένα εύρημα το οποίο επιβεβαιώθηκε τόσο με τη μέθοδο *NCCLS M38-P* όσο και με τη μέθοδο *disk diffusion susceptibility testing*. Μάλιστα, το συγκεκριμένο ερευνητικό αποτέλεσμα ίσως να έχει κλινική σημασία καθώς ο υφομύκητας *Fusarium* έχει αγγειοτρόπες ιδιότητες με αποτέλεσμα να προκαλεί έμφρακτα στους ιστούς με επακόλουθη ιστική υποξία και αιμορραγική νέκρωση. Ως εκ τούτου, η αυξημένη δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του *Fusarium* σε συνθήκες υποξίας ίσως να είναι σημαντική καθώς τέτοιες συνθήκες υποξίας παρατηρούνται σε βλάβες διηθητικής φουσαρίωσης στην κλινική πράξη.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής αυτής εξετάσθηκε η *in vitro* αλληλεπίδραση της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β έναντι των δέκα κλινικών στελεχών *Fusarium*. Η χρήση συνδυαστικής αντιμυκητιασικής θεραπείας έναντι μυκητιασικών λοιμώξεων προκαλούμενες από υφομύκητες έχει προσελκύσει αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον τόσο εξαιτίας της μικρής δραστικότητας της χρήσης αντιμυκητιασικής μονοθεραπείας όσο και επειδή με την πρόσφατη ανακάλυψη πολλών νέων αντιμυκητιασικών φαρμάκων οι πιθανές επιλογές για χρήση σε συνδυαστική θεραπεία έχουν αυξηθεί κατακύρυφα. Ως εκ τούτου, με βάση δύο ανεξάρτητες μικροβιολογικές τεχνικές (μέθοδοι *checkerboard* και *disk diffusion susceptibility testing*) ο συνδυασμός της πενταμιδίνης με την αμφοτερικίνη Β ήταν συνεργικός ή αθροιστικός έναντι των περισσότερων στελεχών *Fusarium* που εξετάστηκαν. Επειδή τα δύο αυτά αντιβιοτικά έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης έναντι του υφομύκητα *Fusarium* η χρήση του συνδυασμού τους στην κλινική πράξη σε περιπτώσεις διηθητικής φουσαρίωσης που απέτυχαν να ανταποκριθούν σε μονοθεραπεία με αμφοτερικίνη Β αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Τέλος, στο τελευταίο τμήμα της παρούσας διατριβής, εξετάσθηκε η *in vivo* δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι ενός κλινικού στελέχους *Fusarium oxysporum* το οποίο απομονώθηκε από ένα ασθενή με οξεία λευχαιμία που πέθανε εξαιτίας διηθητικής πνευμονικής φουσαρίωσης. Για να μελετηθεί η δραστικότητα της πενταμιδίνης *in vivo* αρχικά δημιουργήθηκε ένα ουδετεροπενικό πειραματικό μοντέλο ποντικού *Balb-c* με οξεία διηθητική πνευμονική φουσαρίωση χρησιμοποιώντας την ενδορινική/αναπνευστική οδό για τον ενοφθαλμισμό των κονιδίων του υφομύκητα *Fusarium*. Τα πειραματικά μοντέλα φουσαρίωσης τα οποία έχουν περιγραφεί και χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την διερεύνηση της δραστικότητας αντιμυκητιασικών φαρμάκων έναντι της διηθητικής φουσαρίωσης χρησιμοποιούσαν ενδοφλέβια έγχυση κονιδίων *Fusarium* η οποία οδηγούσε σε εγκατάσταση διασπαρμένης λοίμωξης. Η εγκατάσταση του νέου αυτού πειραματικού μοντέλου πνευμονικής φουσαρίωσης το οποίο μιμείται την παθογένεση της νόσου στους ασθενείς στην κλινική πράξη (δηλαδή μετά από εισπνοή κονιδίων μέσω του αναπνευστικού συστήματος) αποτελεί ένα εναλλακτικό πειραματικό μοντέλο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον τόσο για την μελέτη της δραστικότητας διαφόρων αντιμυκητιασικών φαρμάκων έναντι του υφομύκητα *Fusarium* όσο και για τη διεξαγωγή

μελετών με μεταλλαγμένα στελέχη *Fusarium* (*mutants*) με ελαττωμένη λοιμογόνο ικανότητα για την διερεύνηση της παθογένεσης της διηθητικής φουσαρίωσης.

Μετά την εγκατάσταση του πειραματικού αυτού μοντέλου το οποίο μιμείται την παθογένεση της λοίμωξης στους ανθρώπους, δείχθηκε ότι η πενταμιδίνη χορηγούμενη ως προφύλαξη είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση των ποντικών και την ελάττωση του εύρους πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα (χρησιμοποιώντας δύο ανεξάρτητες μεθόδους, την ποσοτική αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης και την ιστοπαθολογική ανάλυση) σε σχέση με τα ποντίκια που έλαβαν προφύλαξη με αμφοτερικίνη Β ή ποντίκια-μάρτυρες που δεν έλαβαν καμιά αντιμυκητιασική αγωγή. Η δραστικότητα της πενταμιδίνης έναντι του στελέχους *Fusarium oxysporum* όταν χορηγήθηκε ως θεραπεία ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες που δεν έλαβαν καμιά αντιμυκητιασική θεραπεία, αλλά ήταν μικρότερη σε σχέση με την προστασία που η πενταμιδίνη παρείχε ως προφύλαξη. Επίσης, η θεραπεία με πενταμιδίνη δεν οδήγησε σε ελάττωση του εύρους πνευμονικής διήθησης από τον υφομύκητα σε σχέση με τα ποντίκια-μάρτυρες. Το εύρημα ότι η πενταμιδίνη είχε μεγαλύτερη *in vivo* δραστικότητα έναντι του *Fusarium* ως προφύλαξη σε σχέση με τη δραστικότητα της ως θεραπεία συμφωνεί απόλυτα με το αντίστοιχο *in vitro* εύρημα της μεγαλύτερης δραστικότητας της πενταμιδίνης έναντι των κονιδίων *Fusarium* σε σχέση με τη δραστικότητα της έναντι των υφών του υφομύκητα.

Η πενταμιδίνη έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς τα τελευταία χρόνια σε ασθενείς με το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (*AIDS*) και σε ασθενείς με αλλογενή μεταμόσχευση του μυελού των οστών ως προφύλαξη για την προστασία έναντι της ανάπτυξης πνευμονίας από *Pneumocystis jiroveci*. Μάλιστα, καθώς η πενταμιδίνη χρησιμοποιείται για περισσότερο από δύο δεκαετίες στην κλινική πράξη, οι φαρμακολογικές της ιδιότητες (πχ., φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική) και οι παρενέργειες της είναι καλά μελετημένες, ένα χαρακτηριστικό το οποίο αποτελεί πλεονέκτημα αφού τέτοιες μελέτες δεν είναι απαραίτητο να γίνουν όπως θα χρειαζόταν για κάθε καινούριο φάρμακο που εισάγεται για μελέτες στην κλινική πράξη.

Ως εκ τούτου, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι η χρήση της πενταμιδίνης ως προφύλαξη στους ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες και αποδέκτες μεταμόσχευσης μυελού των οστών ίσως να τους προστατεύει και έναντι της ανάπτυξης διηθητικής φουσαρίωσης. Για να

μελετηθεί η συγκεκριμένη ερευνητική υπόθεση όμως, ένας μεγάλος αριθμός ασθενών από πολλά τριτοβάθμια αντικαρκινικά κέντρα θα πρέπει να μελετηθεί σε βάθος χρόνου εξαιτίας της χαμηλής επίπτωσης της διηθητικής φουσαρίωσης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής τα οποία δείχνουν μια αξιοσημείωτη δραστικότητα της πενταμιδίνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έναντι του υφομύκητα *Fusarium* αποτελούν τα θεμέλια με βάση τα οποία θα πρέπει να εξεταστεί η δραστικότητα της πενταμιδίνης, τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με την αμφοτερικίνη Β ή τη βορικοναζόλη (ή την ποσακοναζόλη στο προσεχές μέλλον) σε ασθενείς με διηθητική φουσαρίωση. Εξαιτίας της χαμηλής επίπτωσης της φουσαρίωσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σημαντικός αριθμός ασθενών σε μια πολυκεντρική μελέτη (*multicenter study*) θα απαιτηθούν ώστε να εξεταστεί το συγκεκριμένο ερευνητικό ερώτημα. Τέλος, μελλοντικές μελέτες θα ήταν ενδιαφέρον να εστιάσουν στον πιθανό μηχανισμό δράσης της πενταμιδίνης έναντι του υφομύκητα *Fusarium*, καθώς το συγκεκριμένο αντιβιοτικό χρησιμοποιείται για πολλά χρόνια στην κλινική πρακτική αλλά δεν έχει διευκρινιστεί επακριβώς ο μηχανισμός δράσης του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. **Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A and Corey L.** Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* **2002;** 34, 909-917.
2. **Anaissie EJ, Bodey GP and Rinaldi MG.** Emerging fungal pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1989;** 8, 323-330.
3. **Anaissie E.** Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* **1992;** Suppl 1, S43-S53.
4. **Perfect JR and Schell WA.** The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* **1996;** Suppl 2, S112-S118.
5. **Kontoyiannis DP and Bodey GP.** Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2002;** 21, 161-172.
6. **Samonis G and Bafaloukos D**. Fungal infections in cancer patients: an escalating problem. *In Vivo*. **1992;** 6, 183-193.
7. **Groll AH and Walsh TJ.** Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* **2001;** Suppl 2, 8-24.
8. **Torres HA and Kontoyiannis DP.** Hyalohyphomycoses (other than Aspergillosis and Penicilliosis). *In*: Dismukes WE, Pappas PG and Sobel JD, eds. Oxford Textbook of Clinical Mycology. 1st ed. New York: Oxford University Press. **2003;** 252-270.
9. **Nelson PE, Dignani MC and Anaissie EJ.** Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* **1994;** 7, 479-504.
10. **Boutati EI and Anaissie EJ.** *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* **1997;** 90, 999-1008.
11. **Anaissie E, Kantarjian H, Ro J, Hopfer R, Rolston K, Fainstein V and Bodey G.** The emerging role of *Fusarium* infections in patients with cancer. *Medicine* **1988;** 67, 77-83.
12. **Girmenia C, Pagano L, Corvatta L, Mele L, del Favero A and Martino P.** The epidemiology of fusariosis in patients with haematological diseases. *Br J Haematol* **2000;** 111, 272-276.

13. **Dignani MC and Anaissie E**. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect* **2004;** 10 Suppl 1, 67-75.

14. **Martino P, Gastaldi R, Raccah R and Girmenia C.** Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *J Infect* **1994;** 28 Suppl 1, 7-15.

15. **Richardson SE, Bannatyne RM, Summerbell RC, Milliken J, Gold R and Weitzman SS.** Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host. *Rev Infect Dis* **1988;** 10, 1171-1181.

16. **Costa AR, Valente NY, Criado PR, Pires MC and Vasconcellos C.** Invasive hyalohyphomycosis due to *Fusarium solani* in a patient with acute lymphocytic leukemia. *Int J Dermatol* **2000;** 39, 717-718.

17. **Freidank H.** Hyalohyphomycoses due to *Fusarium* spp. - two case reports and review of the literature. *Mycoses* **1995;** 38, 69-74.

18. **Anaissie E**, **Kantarjian H**, **Jones P**, **Barlogie B**, **Luna M**, **Lopez-Berestein G and Bodey GP**. *Fusarium*. A newly recognized fungal pathogen in immunosuppressed patients. *Cancer* **1986;** 57, 2141-2145.

19. **Minor RL Jr, Pfaller MA, Gingrich RD and Burns LJ.** Disseminated *Fusarium* infections in patients following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **1989;** 4, 653-658.

20. **Guarro J and Gene J.** Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1995;** 14, 741-754.

21. **Musa MO, Al Eisa A, Halim M, Sahovic E, Gyger M, Chaudhri N, Al Mohareb F, Seth P, Aslam M and Aljurf M.** The spectrum of *Fusarium* infection in immunocompromised patients with haematological malignancies and in non-immunocompromised patients: a single institution experience over 10 years. *Br J Haematol* **2000;** 108, 544-548.

22. **Pontón J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, Aldebert D, Ambroise-Thomas P, Cano J, Carrillo-Munoz AJ, Gene J, Pinel C, Stevens DA and Sullivan DJ.** Emerging pathogens. *Med Mycol* **2000;** Suppl 1, 225-236.

23. **Walsh TJ and Groll AH.** Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis* **1999;** 1, 247-261.

24. **Rabodonirina M, Piens MA, Monier MF, Gueho E, Fiere D and Mojon M.** *Fusarium* infections in immunocompromised patients: case reports and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1994;** 13, 152-161.

25. **Kontoyiannis DP, Bodey GP, Hanna H, Hachem R, Boktour M, Girgaway E, Mardani M and Raad II.** Outcome determinants of fusariosis in a tertiary care cancer center: the impact of neutrophil recovery. *Leuk Lymphoma* **2004;** 45, 139-141.

26. **Nucci M, Anaissie E, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Solza C, Mangini C, Simoes BP, Colombo AL, Vaz J, Levy CE, Costa S, Moreira VA, Oliveira JS, Paraguay N, Duboc G, Voltarelli JC, Maiolino A, Pasquini R and Souza CA.** Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer* **2003;** 98, 315-319.

27. **Sands M, Kron MA and Brown RB.** Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis* **1985;** 7, 625-634.

28. **Mayayo E, Pujol I and Guarro J.** Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J Med Microbiol* **1999;** 48, 363-366.

29. **Cho CT, Vats TS, Lowman JT, Brandsberg JW and Tosh FE.** *Fusarium solani* infection during treatment for acute leukemia. *J Pediatr* **1973;** 83, 1028-1031.

30. **Ooka J and Kommedahl T.** Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology* **1977;** 67, 1023–1026.

31. **Raad II and Hachem R.** Treatment of central venous catheter-related fungemia due to *Fusarium oxysporum*. *Clin Infect Dis* **1995;** 20, 709-711.

32. **Kiehn TE, Nelson PE, Bernard EM, Edwards FF, Koziner B and Armstrong D.** Catheter-associated fungemia caused by *Fusarium chlamydosporum* in a patient with lymphocytic lymphoma. *J Clin Microbiol* **1985;** 21, 501-504.

33. **Kerr CM**, **Perfect JR**, **Craven PC**, **Jorgensen JH**, **Drutz DJ**, **Shelburne JD**, **Gallis HA and Gutman RA**. Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med* **1983;** 99, 334-336.

34. **Nagappan R**, **Collins JF and Lee WT**. Fungal peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis--the Auckland experience. *Am J Kidney Dis* **1992;** 20, 492-496.

35. **Wheeler MS, McGinnis MR, Schell WA and Walker DH.** *Fusarium* infection in burned patients. *Am J Clin Pathol* **1981;** 75, 304-311.

36. **Abramowsky CR, Quinn D, Bradford WD and Conant NF.** Systemic infection by *Fusarium* in a burned child. The emergence of a saprophytic strain. *J Pediatrics* **1974;** 84, 561–564.

37. **Latenser BA.** *Fusarium* infections in burn patients: a case report and review of the literature. *J Burn Care Rehabil* **2003;** 24, 285-288.

38. **Gupta AK, Baran R and Summerbell RC.** *Fusarium* infections of the skin. *Curr Opin Infect Dis* **2000;** 13, 121-128.

39. **Girmenia C, Arcese W, Micozzi A, Martino P, Bianco P and Morace G.** Onychomycosis as a possible origin of disseminated *Fusarium solani* infection in a patient with severe aplastic anemia. *Clin Infect Dis* **1992;** 14, 1167.

40. **Garcia-Martos P**, **Dominguez I**, **Marin P**, **Linares M**, **Mira J and Calap J**. Onychomycoses caused by non-dermatophytic filamentous fungi in Cadiz. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2000;** 18, 319-324.

41. **Bokhari MA**, **Hussain I**, **Jahangir M**, **Haroon TS**, **Aman S and Khurshid K**. Onychomycosis in Lahore, Pakistan. *Int J Dermatol* **1999;** 38, 591-595.

42. **Ng KP**, **Saw TL**, **Madasamy M and Soo Hoo T**. Onychomycosis in Malaysia. *Mycopathologia* **1999;** 147, 29-32.

43. **Tosti A**, **Piraccini BM and Lorenzi S**. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *J Am Acad Dermatol* **2000;** 42, 217-224.

44. **Cohen R**, **Roth FJ**, **Delgado E**, **Ahearn DG and Kalser MH**. Fungal flora of the normal human small and large intestine. *N Engl J Med* **1969;** 280, 638-641.

45. **Verma S and Tuft SJ.** *Fusarium solani* keratitis following LASIK for myopia. *Br J Ophthalmol* **2002;** 86, 1190-1191.

46. **Guss RB**, **Koenig S**, **De La Pena W**, **Marx M and Kaufman HE**. Endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* **1983;** 95, 651-658.

47. **Pflugfelder SC**, **Flynn HW Jr**, **Zwickey TA**, **Forster RK**, **Tsiligianni A**, **Culbertson WW and Mandelbaum S**. Exogenous fungal endophthalmitis. *Ophthalmology* **1988;** 95, 19-30.

48. **Page JC, Friedlander G and Dockery GL.** Postoperative *Fusarium* osteomyelitis. *J Foot Surg* **1982;** 21, 174–176.

49. **Nuovo MA, Simmonds JE, Chacho MS and McKitrick JC.** *Fusarium solani* osteomyelitis with probable nosocomial spread. *Am J Clin Pathol* **1988;** 90, 738-741.

50. **Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, Muller FM, Lozano-Chiu M, Summerbell RC, Dignani MC, Chanock SJ and Walsh TJ.** Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis* **2001;** 33, 1871-1878.

51. **Anaissie EJ**, **Stratton SL**, **Dignani MC**, **Lee CK**, **Summerbell RC**, **Rex JH and Monson TP and Walsh TJ**. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood* **2003;** 101, 2542-2546.

52. **Anaissie EJ**, **Stratton SL**, **Dignani MC**, **Summerbell RC**, **Rex JH**, **Monson TP**, **Spencer T**, **Kasai M**, **Francesconi A and Walsh TJ**. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. *Clin Infect Dis* **2002;** 34, 780-789.

53. **Anaissie EJ and Costa SF**. Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clin Infect Dis* **2001;** 33, 1546-1548.

54. **Raad I, Tarrand J, Hanna H, Albitar M, Janssen E, Boktour M, Bodey G, Mardani M, Hachem R, Kontoyiannis D, Whimbey E and Rolston K.** Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2002;** 23, 532-537.

55. **Clemons KV, Calich VL, Burger E, Filler SG, Grazziutti M, Murphy J, Roilides E, Campa A, Dias MR, Edwards JE Jr, Fu Y, Fernandes-Bordignon G, Ibrahim A, Katsifa H, Lamaignere CG, Meloni-Bruneri LH, Rex J, Savary CA and Xidieh C.** Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med Mycol* **2000;** 38, 99-111.

56. **Latge JP.** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **1999;** 12, 310-350.

57. **Rinehart JJ, Balcerzak SP, Sagone AL and LoBuglio AF.** Effects of corticosteroids on human monocyte function. *J Clin Invest* **1974;** 54, 1337-1343.

58. **Lionakis MS and Kontoyiannis DP.** Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet* **2003;** 362, 1828-1838.

59. **Almawi WY**, **Melemedjian OK and Rieder MJ**. An alternate mechanism of glucocorticoid anti-proliferative effect: promotion of a Th2 cytokine-secreting profile. *Clin Transplant* **1999;** 13, 365-374.

60. **Cenci E**, **Perito S**, **Enssle KH**, **Mosci P**, **Latge JP**, **Romani L and Bistoni F**. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun* **1997;** 65, 564-570.

61. **Girmenia C, Iori A P, Boecklin F, Torosantucci A, Chiani P, De Fabritiis P, Taglietti F, Cassone A and Martino P.** *Fusarium* infections in patients with severe aplastic anemia: review and implications for management. *Haematologica* **1999;** 84, 114-118.

62. **Mansoory D**, **Roozbahany NA**, **Mazinany H and Samimagam A**. Chronic *Fusarium* infection in an adult patient with undiagnosed chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* **2003;** 37, 107-108.

63. **Nir-Paz R**, **Strahilevitz J**, **Shapiro M**, **Keller N**, **Goldschmied-Reouven A**, **Yarden O**, **Block C and Polacheck I**. Clinical and epidemiological aspects of infections caused by *Fusarium* species: a collaborative study from Israel. *J Clin Microbiol* **2004;** 42, 3456-3461.

64. **Baddley JW**, **Stroud TP**, **Salzman D and Pappas PG**. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* **2001;** 32, 1319-1324.

65. **Nucci M**, **Marr KA**, **Queiroz-Telles F**, **Martins CA**, **Trabasso P**, **Costa S**, **Voltarelli JC**, **Colombo AL**, **Imhof A**, **Pasquini R**, **Maiolino A**, **Souza CA and Anaissie E**. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* **2004;** 38, 1237-1242.

66. **Jantunen E**, **Ruutu P**, **Niskanen L**, **Volin L**, **Parkkali T**, **Koukila-Kahkola P and Ruutu T**. Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogeneic BMT recipients. *Bone Marrow Transplant* **1997;** 19, 801-808.

67. **Marr KA and Bowden RA**. Fungal infections in patients undergoing blood and marrow transplantation. *Transpl Infect Dis* **1999;** 1, 237-246.

68. **Sampathkumar P and Paya CV.** *Fusarium* infection after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis* **2001;** 32, 1237-1240.

69. **Patel R and Paya CV.** Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* **1997;** 10, 86-124.

70. **Torres HA, Bodey GP, Rolston KVI, Kantarjian HM, Raad II and Kontoyiannis DP.** Infections in patients with aplastic anemia: experience at a tertiary care cancer center. *Cancer* **2003;** 98, 86-93.

71. **El-Ani AS.** Disseminated infection caused by *Fusarium solani* in a patient with aplastic anemia. *N Y State J Med* **1990;** 90, 609-610.

72. **Segal BH, Walsh TJ, Liu JM, Wilson JD and Kwon-Chung KJ.** Invasive infection with *Fusarium chlamydosporum* in a patient with aplastic anemia. *J Clin Microbiol* **1998;** 36, 1772-1776.

73. **Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root RK, Wilfert CM, Gutman L and Buckley RH.** Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. *Am J Med* **1981;** 71, 59-66.

74. **Guarro J, Nucci M, Akiti T and Gene J**. Mixed infection caused by two species of *Fusarium* in a human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* **2000;** 38, 3460-3462.

75. **Eljaschewitsch J**, **Sandfort J**, **Tintelnot K**, **Horbach I and Ruf B**. Port-a-cath-related *Fusarium oxysporum* infection in an HIV-infected patient: treatment with liposomal amphotericin B. *Mycoses* **1996;** 39, 115-1159.

76. **Etzel RA.** Mycotoxins. *JAMA* **2002;** 287, 425-427.

77. **Pitt JI.** Toxigenic fungi: which are important? *Med Mycol* **2000;** Suppl 1, 17-22.

78. **Tomee JF and Kauffman HF**. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Allergy* **2000;** 30, 476-484.

79. **Stanzani M**, **Orciuolo E**, **Lewis R**, **Kontoyiannis DP**, **Martins SL**, **St John LS and Komanduri KV**. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood* **2005;** 105, 2258-2265.

80. **Lewis RE**, **Wiederhold NP**, **Lionakis MS**, **Prince RA and Kontoyiannis DP**. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *J Clin Microbiol* **2005;** 43, 6120-6122.

81. **Lee SK**, **Kim SS**, **Nahm DH**, **Park HS**, **Oh YJ**, **Park KJ**, **Kim SO and Kim SJ**. Hypersensitivity pneumonitis caused by *Fusarium napiforme* in a home environment. *Allergy* **2000;** 55, 1190-1193.

82. **Saini SK**, **Boas SR**, **Jerath A**, **Roberts M and Greenberger PA**. Allergic bronchopulmonary mycosis to *Fusarium vasinfectum* in a child. *Ann Allergy Asthma Immunol* **1998;** 80, 377-380.

83. **Backman KS, Roberts M and Patterson R.** Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Fusarium vasinfectum*. *Am J Respir Crit Care Med* **1995;** 152, 1379-1381.

84. **Wickern GM**. *Fusarium* allergic fungal sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* **1993;** 92, 624-625.

85. **Morel-Chany E, Burtin P, Trincal G and Frayssinet C**. Cytostatic effects of T2 toxin on cultured human neoplastic cells of intestinal origin. *Bull Cancer* **1980;** 67, 149-154.

86. **Hsia CC**, **Wu ZY**, **Li YS**, **Zhang F and Sun ZT**. Nivalenol, a main *Fusarium* toxin in dietary foods from high-risk areas of cancer of esophagus and gastric cardia in China, induced benign and malignant tumors in mice. *Oncol Rep* **2004;** 12, 449-456.

87. **Myburg RB**, **Dutton MF and Chuturgoon AA**. Cytotoxicity of fumonisin B1, diethylnitrosamine, and catechol on the SNO esophageal cancer cell line. *Environ Health Perspect* **2002;** 110, 813-815.

88. **Gelderblom WC**, **Kriek NP**, **Marasas WF and Thiel PG**. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis* **1991;** 12 1247-1251.

89. **Schoental R**. Cancer of the digestive tract and mycotoxins of *Fusarium* species. *Lancet* **1980;** 2, 593.

90. **Miller-Hjelle MA**, **Hjelle JT**, **Jones M**, **Mayberry WR**, **Dombrink-Kurtzman MA**, **Peterson SW**, **Nowak DM and Darras FS**. Polycystic kidney disease: an unrecognized emerging infectious disease? *Emerg Infect Dis* **1997;** 3, 113-127.

91. **Sheehan DM**, **Branham WS**, **Medlock KL and Shanmugasundaram ER**. Estrogenic activity of zearalenone and zearalanol in the neonatal rat uterus. *Teratology* **1984;** 29, 383-392.

92. **Visconti A, Minervini F, Lucivero G and Gambatesa V**. Cytotoxic and immunotoxic effects of *Fusarium* mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia* **1991;** 113, 181-186.

93. **Gerberick GF**, **Sorenson WG and Lewis DM**. The effects of T-2 toxin on alveolar macrophage function *in vitro*. *Environ Res* **1984;** 33, 246-260.

94. **Vidal D and Mavet S**. *In vitro* and *in vivo* toxicity of T-2 toxin, a *Fusarium* mycotoxin, to mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **1989;** 57, 2260-2264.

95. **Salazar S, Fromentin H and Mariat F**. Effects of diacetoxyscirpenol on experimental candidiasis of mice. *CR Seances Acad Sci D* **1980;** 31, 877-878.

96. **Fromentin H**, **Salazar-Mejicanos S and Mariat F**. Experimental cryptococcosis in mice treated with diacetoxyscirpenol, a mycotoxin of *Fusarium*. *Sabouraudia* **1981;** 19, 311-313.

97. **Friend SC, Babiuk LA and Schiefer HB**. The effects of dietary T-2 toxin on the immunological function and herpes simplex reactivation in *Swiss* mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **1983;** 30, 234-244.

98. **Yarom R, Sherman Y, More R, Ginsburg I, Borinski R and Yagen B**. T-2 toxin effect on bacterial infection and leukocyte functions. *Toxicol Appl Pharmacol* **1984;** 75, 60-68.

99. **Forsell JH, Witt MF, Tai JH, Jensen R and Pestka JJ**. Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem Toxicol* **1986;** 24, 213-219.

100. **Pestka JJ, Tai JH, Witt MF, Dixon DE and Forsell JH**. Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem Toxicol* **1987;** 25, 297-304.

101. **Qureshi MA and Hagler WM Jr**. Effect of fumonisin-B1 exposure on chicken macrophage functions *in vitro*. *Poult Sci* **1992;** 71, 104-112.

102. **Joffe AZ.** Environmental conditions conducive to *Fusarium* toxin formation causing serious outbreaks in animals and man. *Vet Res Commun* **1983;** 7, 187-193.

103. **Marasas WFO, Nelson PE and Toussoun TA.** Taxonomy of toxigenic *Fusaria*. In J Lacy (ed.) *Trichothecenes and other mycotoxins*, John Wiley and Sons, New York. **1985;** 3-14.

104. **Zhang H and Li JL**. Study on toxicological mechanism of moniliformin. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **1989;** 29, 93-100.

105. **Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WFO, Shephard GS, van Schalkwyk DJ and Koch KR.** Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J Agric Food Chem* **1990;** 38, 1900-1903.

106. **Perez-Comas A, Saenz de Rodriguez CA and Sanchez Lugo F**. Abnormalities of sexual development in Puerto Rico: status report. *Bol Asoc Med PR* **1991;** 83, 306-309.

107. **Bhat RV, Beedu SR, Ramakrishna Y and Munshi KL**. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet* **1989; 7,** 35-37.

108. **Mayer CF.** Endemic panmyelotoxicosis in the Russian grain belt. I. The clinical aspects of alimentary toxic aleukia (ATA); a comprehensive review. *Mil Surg* **1953;** 113, 173-189.

109. **Sokoloff L.** Kashin-Beck disease. *Rheum Dis Clin North Am* **1987;** 13, 101-104.

110. **Gutmann L**, **Chou SM and Pore RS**. Fusariosis, myasthenic syndrome, and aplastic anemia. *Neurology* **1975;** 25, 922-926.

111. **Sugiura Y, Barr J and Barr D.** Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. *Mycol Res* **1999;** 103, 1462-1468.

112. **Rodriguez MA**, **Cabrera G and Godeas A**. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Appl Microbiol* **2006;** 100, 575-586.

113. **Rosenstein Y, Kretschmer RR and Lafarge-Frayssinet C.** Effect of *Fusarium* toxins, T2-toxin and diacetoxyscirpenol on murine T-independent immune responses. *Immunology* **1981;** 44, 555-560.

114. **Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, De Groot CJ, Taylor RN, Chou TM, Yock PG and Chatterjee K.** Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation* **1994;** 90, 3018-3023.

115. **Kiryu H, Yoshida S, Suenaga Y and Asahi M.** Invasion and survival of *Fusarium solani* in the dexamethasone-treated cornea of rabbits. *J Med Vet Mycol* **1991;** 29, 395-406.

116. **Dong X**, **Shi W**, **Zeng Q and Xie L**. Roles of adherence and matrix metalloproteinases in growth patterns of fungal pathogens in cornea. *Curr Eye Res* **2005;** 30, 613-620.

117. **Gopinathan U**, **Ramakrishna T**, **Willcox M**, **Rao CM**, **Balasubramanian D**, **Kulkarni A**, **Vemuganti GK and Rao GN**. Enzymatic, clinical and histologic evaluation of corneal tissues in experimental fungal keratitis in rabbits. *Exp Eye Res* **2001;** 72, 433-442.

118. **Dudley MA and Chick EW.** Corneal lesions produced in rabbits by an extract of *Fusarium moniliforme*. *Arch Ophthalmol* **1964;** 72, 346-350.

119. **Ando N and Takatori K.** Fungal flora of the conjunctival sac. *Am J Ophthalmol* **1982;** 94, 67–74.

120. **Wilhelmus KR**, **Robinson NM**, **Font RA**, **Hamill MB and Jones DB**. Fungal keratitis in contact lens wearers. *Am J Ophthalmol* **1988;** 106, 708-714.

121. **Simmons RB, Buffington JR, Ward M, Wilson LA and Ahearn DG.** Morphology and ultrastructure of fungi in extended-wear soft contact lenses. *J Clin Microbiol* **1986;** 24, 21–25.

122. **Strelow SA, Kent HD, Eagle RC Jr and Cohen EJ.** A case of contact lens related *Fusarium solani* keratitis. *CLAO J* **1992;** 18, 125–127.

123. **Choi DM, Goldstein MH, Salierno A and Driebe WT.** Fungal keratitis in a daily disposable soft contact lens wearer. *CLAO J* **2001;** 27, 111–112.

124. **Thomas PA.** Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* **2003;** 16, 730-797.

125. **Wong TY, Au Eong KG, Chan WK and Tseng PS.** *Fusarium* keratitis following the use of topical antibiotic-corticosteroid therapy in traumatised eyes. *Ann Acad Med Singapore* **1996;** 25, 862-865.

126. **Xie L**, **Dong X and Shi W**. Treatment of fungal keratitis by penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* **2001;** 85, 1070-1074.

127. **Wu TG**, **Keasler VV**, **Mitchell BM and Wilhelmus KR**. Immunosuppression affects the severity of experimental *Fusarium solani* keratitis. *J Infect Dis* **2004;** 190, 192-198.

128. **Bibashi E, Kokolina E, Sigler L, Sofianou D, Tsakiris D, Visvardis G, Papadimitriou M and Memmos D.** Three cases of uncommon fungal peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis Int* **2002;** 22, 523–525.

129. **Giacchino F, Belardi P, Merlino C, Aimino M, Garneri G, Cuffini AM and Tullio V.** Treatment of *Fusarium* peritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Peritoneal Dialysis Int* **1997;** 17, 403–404.

130. **Flynn JT, Meislich D, Kaiser BA, Polinsky MS and Baluarte HJ.** *Fusarium* peritonitis in a child on peritoneal dialysis: case report and review of the literature. *Peritoneal Dialysis Int* **1996;** 16, 52–57.

131. **Chiaradia V, Schinella D, Pascoli L, Tesio F and Santini GF.** *Fusarium* peritonitis in peritoneal dialysis: report of two cases. *Microbiologica* **1990;** 13, 77–78.

132. **Velasco E**, **Martins CA and Nucci N**. Successful treatment of catheter-related fusarial infection in immunocompromised children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1995;** 14, 697-699.

133. **Ammari LK, Puck JM and McGowan KL.** Catheter-related *Fusarium solani* fungemia and pulmonary infection in a patient with leukemia in remission. *Clin Infect Dis* **1993;** 16, 148-150.

134. **Kovacicova G, Spanik S, Kunova A, Trupl J, Sabo A, Koren P, Sulcova M, Mateicka F, Novotny J, Pichnova E, Jurga L, Chmelik B, Obertik T, West D and Krcery V Jr.** Prospective study of fungaemia in a single cancer institution over a 10-y period: aetiology, risk factors, consumption of antifungals and outcome in 140 patients. *Scand J Infect Dis* **2001;** 33, 367-374.

135. **Head WC, Bauk DJ and Emerson RH Jr.** Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* **1995;** 311, 85-90.

136. **Bergman M.** Prosthetic material properties. *Swed Dent J Suppl* **1985;** 28, 37-39.

137. **Cudillo L, Girmenia C, Santilli S, Picardi A, Dentamaro T, Tendas A and de Fabritiis P.** Breakthrough fusariosis in a patient with acute lymphoblastic leukemia receiving voriconazole prophylaxis. *Clin Infect Dis* **2005;** 40, 1212-1213.

138. **Caillot D**, **Couaillier JF**, **Bernard A**, **Casasnovas O**, **Denning DW**, **Mannone L**, **Lopez J**, **Couillault G**, **Piard F**, **Vagner O and Guy H**. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol* **2001;** 19, 253-259.

139. **Drakos PE**, **Nagler A**, **Or R**, **Naparstek E**, **Kapelushnik J**, **Engelhard D**, **Rahav G**, **Ne'emean D and Slavin S**. Invasive fungal sinusitis in patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **1993;** 12, 203-208.

140. **Valenstein P and Schell WA.** Primary intranasal *Fusarium* infection. Potential for confusion with rhinocerebral zygomycosis. *Arch Pathol Lab Med* **1986;** 110, 751–754.

141. **Rombaux P**, **Eloy P**, **Bertrand B**, **Delos M and Doyen C**. Lethal disseminated *Fusarium* infection with sinus involvement in the immunocompromised host: case report and review of the literature. *Rhinology* **1996;** 34, 237-241.

142. **Dornbusch HJ**, **Buzina W**, **Summerbell RC**, **Lass-Florl C**, **Lackner H**, **Schwinger W**, **Sovinz P and Urban C**. *Fusarium verticillioides* abscess of the nasal septum in an immunosuppressed child: case report and identification of the morphologically atypical fungal strain. *J Clin Microbiol* **2005;** 43, 1998-2001.

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

144. **Kontoyiannis DP**, **Lionakis MS**, **Lewis RE**, **Chamilos G**, **Healy M**, **Perego C**, **Safdar A**, **Kantarjian H**, **Champlin R**, **Walsh TJ and Raad II**. Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of *Aspergillus*-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. *J Infect Dis* **2005;** 191, 1350-1360.

145. **Chamilos G**, **Marom EM**, **Lewis RE**, **Lionakis MS and Kontoyiannis DP**. Predictors of pulmonary zygomycosis versus invasive pulmonary aspergillosis in patients with cancer. *Clin Infect Dis* **2005;** 41, 60-66.

146. **Moriarty AP**, **Crawford GJ**, **McAllister IL and Constable IJ**. Fungal corneoscleritis complicating beta-irradiation-induced scleral necrosis following pterygium excision. *Eye* **1993;** 7, 525-528.

147. **Sierra-Hoffman M**, **Paltiyevich-Gibson S**, **Carpenter JL and Hurley DL**. *Fusarium* osteomyelitis: case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis* **2005;** 37, 237-240.

148. **Bourguignon RL, Walsh AF, Flynn JC, Baro C and Spinos E.** *Fusarium* species osteomyelitis. Case report. *Journal of Bone and Joint Surgery – American* **1976;** 58, 722–723.

149. **Gradon JD**, **Lerman A and Lutwick LI**. Septic arthritis due to *Fusarium moniliforme*. *Rev Infect Dis* **1990;** 12, 716-717.

150. **Jakle C, Leek JC, Olson DA and Robbins DL.** Septic arthritis due to *Fusarium solani*. *J Rheumatol* **1983;** 10, 151–153.

151. **Nakar C**, **Livny G**, **Levy I**, **Samra Z**, **Linder N**, **Ashkenazi S**, **Livne P and Sirota L**. Mycetoma of the renal pelvis caused by *Fusarium* species. *Pediatr Infect Dis J* **2001;** 20, 1182-1183.

152. **Rippon JW**, **Larson RA**, **Rosenthal DM and Clayman J**. Disseminated cutaneous and peritoneal hyalohyphomycosis caused by *Fusarium* species: three cases and review of the literature. *Mycopathologia* **1988;** 101, 105-111.

153. **Kombila M, Gomez de Diaz M, de Bievre C, Crepet G, Debrie JC, Belembaogo E and Richard-Lenoble D**. Fungal otitis in Libreville. Study of 83 cases. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **1989;** 82, 201-207.

154. **Anandi V, Vishwanathan P, Sasikala S, Rangarajan M, Subramaniyan CS and Chidambaram N**. *Fusarium solani* breast abscess. *Indian J Med Microbiol* **2005;** 23, 198-199.

155. **Steinberg GK, Britt RH, Enzmann DR, Finlay JL and Arvin AM**. *Fusarium* brain abscess. Case report. *J Neurosurg* **1983;** 58, 598-601.

156. **Gottfredsson M and Perfect JR**. Fungal meningitis. *Semin Neurol* **2000;** 20, 307-322.

157. **Agamanolis DP, Kalwinsky DK, Krill CE Jr, Dasu S, Halasa B and Galloway PG**. *Fusarium* meningoencephalitis in a child with acute leukemia. *Neuropediatrics* **1991;** 22, 110-112.

158. **Guzman-Cottrill JA, Zheng X and Chadwick EG**. *Fusarium solani* endocarditis successfully treated with liposomal amphotericin B and voriconazole. *Pediatr Infect Dis J* **2004;** 23, 1059-1061.

159. **Camin AM, Michelet C, Langanay T, de Place C, Chevrier S, Gueho E and Guiguen C**. Endocarditis due to *Fusarium dimerum* four years after coronary artery bypass grafting. *Clin Infect Dis* **1999;** 28, 150.

160. **Mohammedi I, Gachot B, Grossin M, Marche C, Wolff M and Vachon F**. Overwhelming myocarditis due to *Fusarium oxysporum* following bone marrow transplantation. *Scand J Infect Dis* **1995;** 27, 643-644.

161. **Honraet K, De Vos MM, Summerbell RC, van Kempen I, De Saeger S, Vermeersch H, Van Peteghem C and Nelis HJ**. Recurrent colonization of successively implanted tracheoesophageal vocal prostheses by a member of the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol* **2005;** 43, 770-777.

162. **Peltroche-Llacsahuanga H, Manegold E, Kroll G and Haase G**. Case report. Pathohistological findings in a clinical case of disseminated infection with *Fusarium oxysporum*. *Mycoses* **2000;** 43, 367-372.

163. **Myoken Y, Sugata T, Kyo T and Fujihara M.** Oral *Fusarium* infection in a granulocytopenic patient with acute myelogenous leukemia: a case report. *J Oral Pathol Med* **1995;** 24, 237-240.

164. **Raab SS, Thomas PA and Cohen MB.** Fine-needle aspiration biopsy of salivary gland mycoses. *Diagn Cytopathol* **1994;** 11, 286-290.

165. **Gupta S**, **Sodhani P and Jain S**. Macroconidia of *Fusarium* species. An unusual finding in cervical smears. *Acta Cytol* **2003;** 47, 41-44.

166. **Sander A, Beyer U and Amberg R.** Systemic *Fusarium oxysporum* infection in an immunocompetent patient with an adult respiratory distress syndrome (ARDS) and extracorporal membrane oxygenation (ECMO). *Mycoses* **1998;** 41, 109-111.

167. **Yera H, Bougnoux ME, Jeanrot C, Baixench MT, De Pinieux G and Dupouy-Camet J.** Mycetoma of the foot caused by *Fusarium solani*: identification of the etiologic agent by DNA sequencing. *J Clin Microbiol* **2003;** 41, 1805-1808.

168. **Guarro J and Gene J**. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. *Mycoses* **1992;** 35, 109-114.

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

170. **Jensen HE, Salonen J and Ekfors TO.** The use of immunohistochemistry to improve sensitivity and specificity in the diagnosis of systemic mycoses in patients with haematological malignancies. *J Pathol* **1997;** 181, 100-105.

171. **Kaufman L, Standard PG, Jalbert M and Kraft DE.** Immunohistologic identification of *Aspergillus* spp. and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. *J Clin Microbiol* **1997;** 35, 2206–2209.

172. **Hayden RT, Isotalo PA, Parrett T, Wolk DM, Qian X, Roberts GD and Lloyd RV.** *In situ* hybridization for the differentiation of *Aspergillus, Fusarium,* and *Pseudallescheria* species in tissue section. *Diagn Mol Pathol* **2003;** 12, 21-26.

173. **Alexander BD.** Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl Infect Dis* **2002;** 4 Suppl, 32-37.

174. **Yoshida M, Obayashi T, Iwama A, Ito M, Tsunoda S, Suzuki T, Muroi K, Ohta M, Sakamoto S and Miura Y.** Detection of plasma (1 --> 3)-beta-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias. *J Med Vet Mycol* **1997;** 35, 371-374.

175. **Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, Ketchum PA, Wingard J, Schiff R, Tamura H, Finkelman MA and Rex JH.** Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* **2005;** 41, 654-659.

176. **Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW and Bowden RA.** Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* **1998;** 36, 1169-1175.

177. **Hue FX, Huerre M, Rouffault MA and de Bievre C.** Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. *J Clin Microbiol* **1999;** 37, 2434-2438.

178. **Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M and Chanock SJ.** PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J Clin Microbiol* **1995;** 33, 3216-3220.

179. **Hennequin C, Abachin E, Symoens F, Lavarde V, Reboux G, Nolard N and Berche P.** Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* **1999;** 37, 3586-3589.

180. **Mishra PK**, **Fox RT and Culham A**. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiol Lett* **2003;** 218, 329-332.

181. **Jaeger EE**, **Carroll NM**, **Choudhury S**, **Dunlop AA**, **Towler HM**, **Matheson MM**, **Adamson P**, **Okhravi N and Lightman S**. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol* **2000;** 38, 2902-2908.

182. **Healy M**, **Reece K**, **Walton D**, **Huong J**, **Frye S**, **Raad II and Kontoyiannis DP**. Use of the Diversi Lab System for species and strain differentiation of *Fusarium* species isolates. *J Clin Microbiol* **2005;** 43, 5278-5280.

183. **Mitter N**, **Srivastava AC**, **Renu**, **Ahamad S**, **Sarbhoy AK and Agarwal DK**. Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* **2002;** 153, 187-193.

184. **Garcia ML**, **Herreras JM**, **Dios E**, **Argueso P and Almaraz A**. Evaluation of lectin staining in the diagnosis of fungal keratitis in an experimental rabbit model. *Mol Vis* **2002;** 8, 10-16.

185. **Farina C, Vailati F, Manisco A and Goglio A.** Fungaemia survey: a 10-year experience in Bergamo, Italy. *Mycoses* **1999;** 42, 543-548.

186. **Jensen TG**, **Gahrn-Hansen B**, **Arendrup M and Bruun B**. *Fusarium* fungaemia in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* **2004;** 10, 499-501.

187. **Krcmery V Jr, Jesenska Z, Spanik S, Gyarfas J, Nogova J, Botek R, Mardiak J, Sufliarsky J, Sisolakova J, Vanickova M, Kunova A, Studena M and Trupl J.** Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. *J Hosp Infect* **1997;** 36, 223–228.

188. **Trabasso P, Vigorito AC, De Souza CA and Moretti-Branchini ML.** Invasive fungal infection in hematopoietic stem cell transplant recipients at a Brazilian university hospital. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL: **2001;** Abstract K-1248.

189. **Hennequin C, Ranaivoarimalala C, Chouaki T, Tazerout M, Ancelle T, Cabaud JJ and Raccurt CP.** Comparison of aerobic standard medium with specific fungal medium for detecting *Fusarium* spp in blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2002;** 21, 748-750.

190. **Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J, Bodey GP, Storey R and Raad II.** Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study. *Clin Infect Dis* **2000;** 31, 188-189.

191. **Richardson SE**, **Bannatyne RM**, **Summerbell RC**, **Milliken J**, **Gold R and Weitzman SS**. Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host. *Rev Infect Dis* **1988;** 10, 1171-1181.

192. **Bodey GP**. Dermatologic manifestations of infections in neutropenic patients. *Infect Dis Clin North Am* **1994;** 8, 655-675.

193. **Virgili A**, **Zampino MR and Mantovani L**. Fungal skin infections in organ transplant recipients. *Am J Clin Dermatol* **2002;** 3, 19-35.

194. **Bodey GP, Boktour M, Mays S, Duvic M, Kontoyiannis D, Hachem R and Raad I.** Skin lesions associated with *Fusarium* infection. *J Am Acad Dermatol* **2002;** 47, 659-666.

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

196. **Mowbray DN**, **Paller AS**, **Nelson PE and Kaplan RL**. Disseminated *Fusarium solani* infection with cutaneous nodules in a bone marrow transplant patient. *Int J Dermatol* **1988;** 27, 698-701.

197. **Pereiro M Jr**, **Abalde MT**, **Zulaica A**, **Caeiro JL**, **Florez A**, **Peteiro C and Toribio J**. Chronic infection due to *Fusarium oxysporum* mimicking lupus vulgaris: case report and review of cutaneous involvement in fusariosis. *Acta Derm Venereol* **2001;** 81, 51-53.

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

199. **Bhavanishankar TN**, **Ramesh HP and Shantha T**. Dermal toxicity of *Fusarium* toxins in combinations. *Arch Toxicol* **1988;** 61, 241-244.

200. **Prins C, Chavaz P, Tamm K and Hauser C.** Ecthyma gangrenosum-like lesions: a sign of disseminated *Fusarium* infection in the neutropenic patient. *Clin Exp Dermatol* **1995;** 20, 428-430.

201. **Hiemenz JW, Kennedy B and Kwon-Chung KJ.** Invasive fusariosis associated with an injury by a stingray barb. *J Med Vet Mycol* **1990;** 28, 209-213.

202. **Assaf C**, **Goerdt S**, **Seibold M and Orfanos C**. Clinical picture. Cutaneous hyalohyphomycosis. *Lancet* **2000;** 356: 1185.

203. **Kontoyiannis DP and Lewis RE.** Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* **2002;** 359, 1135-1144.

204. **Rex JH**, **Pfaller MA**, **Walsh TJ**, **Chaturvedi V**, **Espinel-Ingroff A**, **Ghannoum MA**, **Gosey LL**, **Odds FC**, **Rinaldi MG**, **Sheehan DJ and Warnock DW**. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* **2001;** 14, 643-658.

205. **Lionakis MS**, **Lewis RE**, **Chamilos G and Kontoyiannis DP**. *Aspergillus* susceptibility testing in patients with cancer and invasive aspergillosis: difficulties in establishing correlation between *in vitro* susceptibility data and the outcome of initial amphotericin B therapy. *Pharmacotherapy* **2005;** 25, 1174-1180.

206. **Lass-Florl C, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Kreczy A, Dierich MP and Niederwieser D**. *In vitro* testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* **1998;** 42, 497-502.

207. **Johnson EM, Oakley KL, Radford SA, Moore CB, Warn P, Warnock DW and Denning DW**. Lack of correlation of *in vitro* amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. *J Antimicrob Chemother* **2000;** 45, 85-93.

208. **Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, Field-Ridley A, Sutton D, Ghannoum M, Sein T, Schaufele R, Peter J, Bacher J, Casler H, Armstrong D, Espinel-Ingroff A, Rinaldi MG and Lyman CA**. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis* **2003;** 188, 305-319.

209. **Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM and Warnock DW**. Correlation between *in vitro* susceptibility testing to itraconazole and *in vivo* outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* **1997;** 40, 401-414.

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

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

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

213. **Rotowa NA, Shadomy HJ and Shadomy S.** *In vitro* activities of polyene and imidazole antifungal agents against unusual opportunistic fungal pathogens. *Mycoses* **1990;** 33, 203–211.

214. **Koizumi T, Kubo K, Kaneki T, Hanaoka M, Hayano T, Miyahara T, Okada K, Fujimoto K, Yamamoto H, Kobayashi T and Sekiguchi M.** Pharmacokinetic evaluation of amphotericin B in lung tissue: lung lymph distribution after intravenous injection and airspace distribution after aerosolization and inhalation of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **1998;** 42, 1597-1600.

215. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I and Guarro J. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 2273-2275.

216. Anaissie EJ, Hachem R, Legrand C, Legenne P, Nelson P and Bodey GP. Lack of activity of amphotericin B in systemic murine fusarial infection. *J Infect Dis* **1992;** 165, 1155-1157.

217. Hiemenz JW and Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin Infect Dis* **1996;** Suppl 2, S133-144.

218. Anaissie E, **Paetznick V**, **Proffitt R**, **Adler-Moore J and Bodey GP**. Comparison of the *in vitro* antifungal activity of free and liposome-encapsulated amphotericin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1991;** 10, 665-668.

219. Viviani MA, Cofrancesco E, Boschetti C, Tortorano AM and Cortellaro M. Eradication of *Fusarium* infection in a leukopenic patient treated with liposomal amphotericin B. *Mycoses* **1991;** 34, 255–256.

220. Cofrancesco E, Boschetti C, Viviani MA, Bargiggia C, Tortorano AM, Cortellaro M and Zanussi C. Efficacy of liposomal amphotericin B (AmBisome) in the eradication of *Fusarium* infection in a leukaemic patient. *Haematologica* **1992;** 77, 280–283.

221. Letscher-Bru V, **Campos F**, **Waller J**, **Randriamahazaka R**, **Candolfi E and Herbrecht R**. Successful outcome of treatment of a disseminated infection due to *Fusarium dimerum* in a leukemia patient. *J Clin Microbiol* **2002;** 40, 1100-1102.

222. Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, Perfect JR, Horwith G, Lee L, Silber JL, DiNubile MJ, Reboli A, Bow E, Lister J and Anaissie EJ. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis* **1998;** 26, 1383-1396.

223. Perfect JR. Treatment of non-*Aspergillus* moulds in immunocompromised patients, with amphotericin B lipid complex. *Clin Infect Dis* **2005;** 40 Suppl 6, S401-408.

224. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN and Walsh TJ. Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 834-840.

225. **Lewis RE and Wiederhold NP.** The solubility ceiling: a possible rationale for continuous infusion amphotericin B therapy? *Clin Infect Dis* **2003;** 37, 871-872.

226. **Reuben A, Anaissie E, Nelson PE, Hashem R, Legrand C, Ho DH and Bodey GP.** Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* **1989;** 33, 1647-1649.

227. **Kalavathy CM**, **Parmar P**, **Kaliamurthy J**, **Philip VR**, **Ramalingam MD**, **Jesudasan CA and Thomas PA**. Comparison of topical itraconazole 1% with topical natamycin 5% for the treatment of filamentous fungal keratitis. *Cornea* **2005;** 24, 449-452.

228. **Jones D, Forster RK and Rebell G.** *Fusarium solani* keratitis treated with natamycin (pimaricin): 18 consecutive cases. *Arch Opthalmol* **1972;** 88, 147.

229. **Hirose H, Terasaki H, Awaya S and Yasuma T.** Treatment of fungal corneal ulcers with amphotericin B ointment. *Am J Ophthalmol* **1997;** 124, 836-838.

230. **Wood TO**, **Tuberville AW and Monnett R**. Keratomycosis and amphotericin B. *Trans Am Ophthalmol Soc* **1985;** 83, 397-409.

231. **Levinskas GJ**, **Ribelin WE and Shaffer CB**. Acute and chronic toxicity of pimaricin. *Toxicol Appl Pharmacol* **1966;** 8, 97-109.

232. **Rosa RH Jr**, **Miller D and Alfonso EC**. The changing spectrum of fungal keratitis in south Florida. *Ophthalmology* **1994**; 101, 1005-1013.

233. **Leck AK, Thomas PA, Hagan M, Kaliamurthy J, Ackuaku E, John M, Newman MJ, Codjoe FS, Opintan JA, Kalavathy CM, Essuman V, Jesudasan CA and Johnson GJ.** Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol* **2002;** 86, 1211–1215.

234. **Boonpasart S**, **Kasetsuwan N**, **Puangsricharern V**, **Pariyakanok L and Jittpoonkusol T**. Infectious keratitis at King Chulalongkorn Memorial Hospital: a 12-year retrospective study of 391 cases. *J Med Assoc Thai* **2002;** Suppl 1, S217-230.

235. **Mohan M**, **Panda A and Gupta SK**. Management of human keratomycosis with miconazole. *Aust N Z J Ophthalmol* **1989;** 17, 295-297.

236. **Mselle J**. Use of topical clotrimazole in human keratomycosis. *Ophthalmologica* **2001;** 215, 357-360.

237. Torres MA, **Mohamed J**, **Cavazos-Adame H and Martinez LA**. Topical ketoconazole for fungal keratitis. *Am J Ophthalmol* **1985;** 100, 293-298.

238. Rajasekaran J, **Thomas PA**, **Kalavathy CM**, **Joseph PC and Abraham DJ**. Itraconazole therapy for fungal keratitis. *Indian J Ophthalmol* **1987;** 35, 157-160.

239. Stern GA. *In vitro* antibiotic synergism against ocular fungal isolates. *Am J Ophthalmol* **1978;** 86, 359-367.

240. Rahman MR, **Minassian DC**, **Srinivasan M**, **Martin MJ and Johnson GJ**. Trial of chlorhexidine gluconate for fungal corneal ulcers. *Ophthalmic Epidemiol* **1997;** 4, 141-149.

241. Fiscella RG, **Moshifar M**, **Messick CR**, **Pendland SL**, **Chandler JW and Viana M**. Polyhexamethylene biguanide (PHMB) in the treatment of experimental *Fusarium* keratomycosis. *Cornea* **1997;** 16, 447-449.

242. Mohan M, **Gupta SK**, **Kalra VK**, **Vajpayee RB and Sachdev MS**. Topical silver sulphadiazine--a new drug for ocular keratomycosis. *Br J Ophthalmol* **1988;** 72, 192-195.

243. Goldblum D, **Frueh BE**, **Zimmerli S and Bohnke M**. Treatment of postkeratitis *Fusarium* endophthalmitis with amphotericin B lipid complex. *Cornea* **2000;** 19, 853-856.

244. Klont RR, **Eggink CA**, **Rijs AJ**, **Wesseling P and Verweij PE**. Successful treatment of *Fusarium* keratitis with cornea transplantation and topical and systemic voriconazole. *Clin Infect Dis* **2005;** 40, 110-112.

245. Polizzi A, **Siniscalchi C**, **Mastromarino A and Sacca SC**. Effect of voriconazole on a corneal abscess caused by *Fusarium*. *Acta Ophthalmol Scand* **2004;** 82, 762-764.

246. Reis A, **Sundmacher R**, **Tintelnot K**, **Agostini H**, **Jensen HE and Althaus C**. Successful treatment of ocular invasive mould infection (fusariosis) with the new antifungal agent voriconazole. *Br J Ophthalmol* **2000;** 84, 932-933.

247. Durand ML, **Kim IK**, **D'Amico DJ**, **Loewenstein JI**, **Tobin EH**, **Kieval SJ**, **Martin SS**, **Azar DT**, **Miller FS 3rd**, **Lujan BJ and Miller JW**. Successful treatment of *Fusarium* endophthalmitis with voriconazole and *Aspergillus* endophthalmitis with voriconazole plus caspofungin. *Am J Ophthalmol* **2005;** 140, 552-554.

248. Hariprasad SM, **Mieler WF**, **Holz ER**, **Gao H**, **Kim JE**, **Chi J and Prince RA**. Determination of vitreous, aqueous, and plasma concentration of orally administered voriconazole in humans. *Arch Ophthalmol* **2004;** 122, 42-47.

249. Sponsel WE, **Graybill JR**, **Nevarez HL and Dang D**. Ocular and systemic posaconazole (SCH-56592) treatment of invasive *Fusarium solani* keratitis and endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* **2002;** 86, 829-830.

250. Rowsey JJ, **Acers TE**, **Smith DL**, **Mohr JA**, **Newsom DL and Rodriguez J**. *Fusarium oxysporum* endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* **1979;** 97, 103-105.

251. Tseng SH, **Tang KY**, **Chao SC and Hsu MM**. Therapeutic lamellar keratectomy in the management of experimental keratomycosis. *J Formos Med Assoc* **1994;** 93, 300-306.

252. Peponis V, **Herz JB and Kaufman HE**. The role of corticosteroids in fungal keratitis: a different view. *Br J Ophthalmol* **2004;** 88, 1227.

253. Barret JP, Ramzy PI, Heggers JP, Villareal C, Herndon DN and Desai MH. Topical nystatin powder in severe burns: a new treatment for angioinvasive fungal infections refractory to other topical and systemic agents. *Burns* **1999;** 25, 505-508.

254. Ng AW, **Wasan KM and Lopez-Berestein G**. Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. *J Pharm Pharm Sci* **2003;** 6, 67-83.

255. Offner F, **Krcmery V**, **Boogaerts M**, **Doyen C**, **Engelhard D**, **Ribaud P**, **Cordonnier C**, **de Pauw B**, **Durrant S**, **Marie JP**, **Moreau P**, **Guiot H**, **Samonis G**, **Sylvester R**, **Herbrecht R and EORTC Invasive Fungal Infections Group**. Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **2004;** 48, 4808-4812.

256. Charvalo E, **Tsatsakis A**, **Tzatzarakis M**, **Dolapsakis G and Stiakakis J**. New nystatin polymeric complexes and their *in vitro* antifungal evaluation in a model study with *Fusarium oxysporum*. *Mycopathologia* **2002;** 153, 15-19.

257. Tzatzarakis MN, **Tsatsakis AM**, **Charvalos E and Vakalounakis D**. Comparison of *in vitro* activities of amphotericin, clotrimazole, econazole, miconazole, and nystatin against *Fusarium oxysporum*. *J Environ Sci Health B* **2001;** 36, 331-340.

258. Shadomy S, **Dixon DM and May R**. A comparison of bifonazole (BAY H 4502) with clotrimazole *in vitro*. *Sabouraudia* **1982;** 20, 313-323.

259. Kang Z, **Huang L**, **Krieg U**, **Mauler-Machnik A and Buchenauer H**. Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum in vitro*. *Pest Manag Sci* **2001;** 57, 491-500.

260. Tseng SS, Longley BJ, Scher RK and Treiber RK. *Fusarium* fingernail infection responsive to fluconazole intermittent therapy. *Cutis* **2000;** 65, 352-354.

261. Restrepo A. Treatment of tropical mycoses. *J Am Acad Dermatol* **1994;** 31, S91-102.

262. Resnik BI and Burdick AE. Improvement of eumycetoma with itraconazole. *J Am Acad Dermatol* **1995;** 33, 917-919.

263. Johnson EM, Szekely A and Warnock DW. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* **1998;** 42, 741-745.

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

265. Espinel-Ingroff A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol* **1998;** 36, 2950-2956.

266. Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E and Rex JH. *In vitro* activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 3298-3300.

267. Fothergill AW, Rinaldi MG, Schwocho LR and Ohya S. Comparison of the investigational azole CS-758 (R-120758) to amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against 250 mould fungi. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL: **2001;** Abstract J-822.

268. Huczko E, Minassian B, Washo T, Bonner D and Fung-Tomc J. *In vitro* activity of ravuconazole against *Zygomycetes, Scedosporium* and *Fusarium* isolates. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL. **2001;** Abstract J-810.

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

270. **Marco F, Pfaller MA, Messer SA and Jones RN.** *In vitro* activity of a new triazole antifungal agent, SCH 56592, against clinical isolates of filamentous fungi. *Mycopathologia* **1998;** 141, 73-77.

271. **Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN and the SENTRY Participants Group.** Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B tested against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 1032-1037.

272. **Reyes GH, Long L, Hossain M and Ghannoum MA.** Evaluation of voriconazole efficacy in the treatment of murine fusariosis. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL. **2001;** Abstract J-1604.

273. **Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, Greenberg RN, DuPont B, de la Torre-Cisneros J, Just-Nubling G, Schlamm HT, Lutsar I, Espinel-Ingroff A and Johnson E.** Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis* **2003;** 36, 1122-1131.

274. **Consigny S, Dhedin N, Datry A, Choquet S, Leblond V and Chosidow O.** Successful voriconazole treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis* **2003;** 37, 311-313.

275. **Herbrecht R**, **Kessler R**, **Kravanja C**, **Meyer MH**, **Waller J and Letscher-Bru V**. Successful treatment of *Fusarium proliferatum* pneumonia with posaconazole in a lung transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* **2004;** 23, 1451-1454.

276. **Hachem R, Raad II and Afif C.** An open, non-comparative multicenter study to evaluate efficacy and safety of posaconazole (SCH 56592) in the treatment of invasive fungal infections refractory to or intolerant of standard therapy. Abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto, Ontario, Canada. **2000;** Abstract J-1109.

277. **Johnson EM, Szekely A and Warnock DW.** *In vitro* activity of Syn-2869, a novel triazole agent, against emerging and less common mold pathogens *Antimicrob Agents Chemother* **1999;** 43, 1260-1263.

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

279. **Fung-Tomc JC**, **Huczko E**, **Minassian B and Bonner DP**. *In vitro* activity of a new oral triazole, BMS-207147 (ER-30346) *Antimicrob Agents Chemother* **1998;** 42, 313-318.

280. **Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V and Rex JH.** *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2001;** 45, 327-330.

281. **Del Poeta M, Schell WA and Perfect JR.** *In vitro* antifungal activity of pneumocandin L-743, 872 against a variety of clinically important molds. *Antimicrob Agents Chemother* **1997;** 41, 1835-1836.

282. **Pfaller MA, Marco F, Messer SA and Jones RN.** *In vitro* activity of two echinocandin derivatives, LY303366 and MK-0991 (L-743,792), against clinical isolates of *Aspergillus, Fusarium, Rhizopus,* and other filamentous fungi. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1998;** 30, 251-255.

283. **Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F and Kuwahara S.** *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* **2000;** 44, 57-62.

284. **Hector RF**. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* **1993;** 6, 1-21.

285. **Apostolidis J, Bouzani M, Platsouka E, Belasiotou H, Stamouli M, Harhalakis N, Boutati EI, Paniara O and Nikiforakis E.** Resolution of fungemia due to *Fusarium* species in a patient with acute leukemia treated with caspofungin. *Clin Infect Dis* **2003;** 36, 1349-1350.

286. **Li RK and Rinaldi MG.** *In vitro* antifungal activity of nikkomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **1999;** 43, 1401-1405.

287. **Garcia-Effron G**, **Gomez-Lopez A**, **Mellado E**, **Monzon A**, **Rodriguez-Tudela JL and Cuenca-Estrella M**. *In vitro* activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* **2004;** 53, 1086-1089.

288. **Jessup CJ**, **Ryder NS and Ghannoum MA**. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. *Med Mycol* **2000;** 38, 155-159.

289. **Herreros E**, **Almela MJ**, **Lozano S**, **Gomez de las Heras F and Gargallo-Viola D**. Antifungal activities and cytotoxicity studies of six new azasordarins. *Antimicrob Agents Chemother* **2001;** 45, 3132-3139.

290. **Dash C**, **Ahmad A**, **Nath D and Rao M**. Novel bifunctional inhibitor of xylanase and aspartic protease: implications for inhibition of fungal growth. *Antimicrob Agents Chemother* **2001;** 45, 2008-2017.

291. **Ng TB**, **Lam SK and Fong WP**. A homodimeric sporamin-type trypsin inhibitor with antiproliferative, HIV reverse transcriptase-inhibitory and antifungal activities from wampee (*Clausena lansium*) seeds. *Biol Chem* **2003;** 384, 289-293.

292. **De Lucca AJ**, **Walsh TJ and Daigle DJ**. N-acetylcysteine inhibits germination of conidia and growth of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **1996;** 40, 1274-1276.

293. **DeLucca AJ**, **Bland JM**, **Jacks TJ**, **Grimm C**, **Cleveland TE and Walsh TJ**. Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother* **1997;** 41, 481-483.

294. **De Lucca AJ**, **Jacks TJ**, **Takemoto J**, **Vinyard B**, **Peter J**, **Navarro E and Walsh TJ**. Fungal lethality, binding, and cytotoxicity of syringomycin-E. *Antimicrob Agents Chemother* **1999;** 43, 371-373.

295. **Ngai PH and Ng TB**. Coccinin, an antifungal peptide with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from large scarlet runner beans. *Peptides* **2004;** 25, 2063-2068.

296. **Del Poeta M, Schell WA, Dykstra CC, Jones SK, Tidwell RR, Kumar A, Boykin DW and Perfect JR.** *In vitro* antifungal activities of a series of dication-substituted carbazoles, furans, and benzimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother* **1998;** 42, 2503-2510.

297. **Del Poeta M**, **Schell WA**, **Dykstra CC**, **Jones S**, **Tidwell RR**, **Czarny A**, **Bajic M**, **Kumar A**, **Boykin D and Perfect JR**. Structure *in vitro* activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents. Antimicrob *Agents Chemother* **1998;** 42, 2495-2502.

298. **Rai MK**, **Qureshi S and Pandey AK**. *In vitro* susceptibility of opportunistic *Fusarium* spp. to essential oils. *Mycoses* **1999;** 42, 97-101.

299. **Priya BS**, **Basappa**, **Swamy SN and Rangappa KS**. Synthesis and characterization of novel 6-fluoro-4-piperidinyl-1,2-benzisoxazole amides and 6-fluoro-chroman-2-carboxamides: antimicrobial studies. *Bioorg Med Chem* **2005;** 13, 2623-2628.

300. **Luo DQ**, **Shao HJ**, **Zhu HJ and Liu JK**. Activity *in vitro* and *in vivo* against plant pathogenic fungi of grifolin isolated from the basidiomycete *Albatrellus dispansus*. *Z Naturforsch* **2005;** 60, 50-56.

301. **Fung-Tomc JC**, **Minassian B**, **Huczko E**, **Kolek B**, **Bonner DP and Kessler RE**. *In vitro* antifungal and fungicidal spectra of a new pradimicin derivative, BMS-181184. *Antimicrob Agents Chemother* **1995;** 39, 295-300.

302. **Merz WG, Karp JE, Hoagland M, Jett-Goheen M, Junkins JM and Hood AF.** Diagnosis and successful treatment of fusariosis in the compromised host. *J Infect Dis* **1988;** 158, 1046-1055.

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

304. **Philip A**, **Odabasi Z**, **Rodriguez J**, **Paetznick VL**, **Chen E**, **Rex JH and Ostrosky-Zeichner L**. *In vitro* synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **2005;** 49, 3572-3574.

305. **Rothe A**, **Seibold M**, **Hoppe T**, **Seifert H**, **Engert A**, **Caspar C**, **Karthaus M**, **Fatkenheuer G**, **Bethe U**, **Tintelnot K and Cornely OA**. Combination therapy of disseminated *Fusarium oxysporum* infection with terbinafine and amphotericin B. *Ann Hematol* **2004;** 83, 394-397.

306. **Clancy CJ, Yu YC, Lewin A and Nguyen MH.** Inhibition of RNA synthesis as a therapeutic strategy against *Aspergillus* and *Fusarium*: demonstration of *in vitro* synergy between rifabutin and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **1998;** 42, 509-513.

307. **Barrios NJ**, **Kirkpatrick DV**, **Murciano A**, **Stine K**, **Van Dyke RB and Humbert JR**. Successful treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised child. *Am J Pediatr Hematol Oncol* **1990;** 12, 319-324.

308. **Clancy CJ and Nguyen MH.** The combination of amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. *J Antimicrob Chemother* **1998;** 41, 127-130.

309. **Ortoneda M**, **Capilla J**, **Javier Pastor F**, **Pujol I and Guarro J**. *In vitro* interactions of licensed and novel antifungal drugs against *Fusarium* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2004;** 48, 69-71.

310. **Durand-Joly I**, **Alfandari S**, **Benchikh Z**, **Rodrigue M**, **Espinel-Ingroff A**, **Catteau B**, **Cordevant C**, **Camus D**, **Dei-Cas E, Bauters F, Delhaes L and De Botton S**. Successful outcome of disseminated *Fusarium* infection with skin localization treated with voriconazole and amphotericin B-lipid complex in a patient with acute leukemia. *J Clin Microbiol* **2003;** 41, 4898-4900.

311. **Farmaki E and Roilides E.** Immunotherapy in patients with systemic mycoses: a promising adjunct. *BioDrugs* **2001;** 15, 207-214.

312. **Rodriguez-Adrian LJ, Grazziutti ML, Rex JH and Anaissie EJ.** The potential role of cytokine therapy for fungal infections in patients with cancer: is recovery from neutropenia all that is needed? *Clin Infect Dis* **1998;** 26, 1270-1278.

313. **Hennequin C**, **Benkerrou M**, **Gaillard JL**, **Blanche S and Fraitag S**. Role of granulocyte colony-stimulating factor in the management of infection with *Fusarium oxysporum* in a neutropenic child. *Clin Infect Dis* **1994;** 18, 490-491.

314. **Winn RM, Maloukou A, Gil-Lamaignere C, Panteliadis C, Roilides E and The Eurofung Network.** Interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhance hyphal damage of *Aspergillus* and *Fusarium* spp by human neutrophils. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL. **2001;** Abstract J-134.

315. **Gaviria JM**, **van Burik JA**, **Dale DC**, **Root RK and Liles WC**. Comparison of interferon-gamma, granulocyte colony-stimulating factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for priming leukocyte-mediated hyphal damage of opportunistic fungal pathogens. *J Infect Dis* **1999;** 179, 1038-1041.

316. **Spielberger RT**, **Falleroni MJ**, **Coene AJ and Larson RA**. Concomitant amphotericin B therapy, granulocyte transfusions, and GM-CSF administration for disseminated infection with *Fusarium* in a granulocytopenic patient. *Clin Infect Dis* **1993;** 16, 528-530.

317. **Dignani MC, Anaissie EJ, Hester JP, O'Brien S, Vartivarian SE, Rex JH, Kantarjian H, Jendiroba DB, Lichtiger B, Andersson BS and Freireich EJ.** Treatment of neutropenia-related fungal infections with granulocyte colony-stimulating factor-elicited white blood cell transfusions: a pilot study. *Leukemia* **1997;** 11, 1621–1630.

318. **Winn RM**, **Gil-Lamaignere C**, **Roilides E**, **Simitsopoulou M**, **Lyman CA**, **Maloukou A and Walsh TJ**. Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp. *Cytokine* **2005;** 31, 1-8.

319. **Stevens DA**. Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. *Clin Infect Dis* **2004;** 38, 1131-1136.

320. **Bozza S**, **Perruccio K**, **Montagnoli C**, **Gaziano R**, **Bellocchio S**, **Burchielli E**, **Nkwanyuo G**, **Pitzurra L**, **Velardi A and Romani L**. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood* **2003;** 102, 3807-3814.

321. **Cenci E**, **Mencacci A**, **Bacci A**, **Bistoni F**, **Kurup VP and Romani L**. T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol* **2000;** 165, 381-388.

322. **Heinz T, Perfect J, Schell W, Ritter E, Ruff G and Serafin D.** Soft-tissue fungal infections: surgical management of 12 immunocompromised patients. *Plast Reconstr Surg* **1996;** 97, 1391-1399.

323. **Stammberger H.** Endoscopic surgery for mycotic and chronic recurring sinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* **1985;** 119, 1-11.

324. **Moreau P**, **Zahar JR**, **Milpied N**, **Baron O**, **Mahe B**, **Wu D**, **Germaud P**, **Despins P**, **Delajartre AY and Harousseau JL**. Localized invasive pulmonary aspergillosis in patients with neutropenia. Effectiveness of surgical resection. *Cancer* **1993;** 72, 3223-3226.

325. **Reichenberger F**, **Habicht J**, **Kaim A**, **Dalquen P**, **Bernet F**, **Schlapfer R**, **Stulz P**, **Perruchoud AP**, **Tichelli A**, **Gratwohl A and Tamm M**. Lung resection for invasive

pulmonary aspergillosis in neutropenic patients with hematologic diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **1998;** 158, 885-890.

326. **Lupinetti FM**, **Giller RH and Trigg ME**. Operative treatment of *Fusarium* fungal infection of the lung. *Ann Thorac Surg* **1990;** 49, 991-992.

327. **Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee CK, Mahfouz TH, Rex JH, Summerbell RC and Walsh TJ.** Cleaning patient shower facilities: a novel approach to reducing patient exposure to aerosolized *Aspergillus* species and other opportunistic molds. *Clin Infect Dis* **2002;** 35, E86–88.

328. **Stringer JR, Beard CB**, **Miller RF and Wakefield AE**. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* **2002;** 8, 891-896.

329. **Thomas CF Jr and Limper AH**. *Pneumocystis* pneumonia. *N Engl J Med* **2004;** 350, 2487-2498.

330. **Baron DN**. Which salt of pentamidine? The case for dosage in substance units. *Lancet* **1988;** 2, 106.

331. **Goa KL and Campoli-Richards DM**. Pentamidine isethionate. A review of its antiprotozoal activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Drugs* **1987;** 33, 242-258.

332. **Navin TR and Fontaine RE**. Intravenous versus intramuscular administration of pentamidine. *N Engl J Med* **1984;** 311, 1701-1702.

333. **Conte JE Jr and Golden JA**. Concentrations of aerosolized pentamidine in bronchoalveolar lavage, systemic absorption, and excretion. *Antimicrob Agents Chemother* **1988;** 32, 1490-1493.

334. **Briceland LL and Bailie GR**. Pentamidine-associated nephrotoxicity and hyperkalemia in patients with AIDS. *DICP* **1991;** 25, 1171-1174.

335. **Seltzer HS**. Drug-induced hypoglycemia. A review of 1418 cases. *Endocrinol Metab Clin North Am* **1989;** 18, 163-183.

336. **Shen M**, **Orwoll ES**, **Conte JE Jr and Prince MJ**. Pentamidine-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Am J Med* **1989;** 86, 726-728.

337. **Zuger A**, **Wolf BZ**, **el-Sadr W**, **Simberkoff MS and Rahal JJ**. Pentamidine-associated fatal acute pancreatitis. *JAMA* **1986;** 256, 2383-2385.

338. **Centers for Disease Control (CDC)**. Severe neutropenia during pentamidine treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome--New York City. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **1984;** 33, 65-67.

339. **Levy MA**, **Senior RM and Sneider RE**. Severe thrombocytopenic purpura complicating pentamidine therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Cancer* **1974;** 34, 441-443.

340. **Helmick CG and Green JK**. Pentamidine-associated hypotension and route of administration. *Ann Intern Med* **1985;** 103, 480.

341. **Glover J**, **Dibble S**, **Miaskowski C and Geibert R**. Changes in taste associated with intravenous administration of pentamidine. *J Assoc Nurses AIDS Care* **1995;** 6, 41-46.

342. **Shah GM**, **Alvarado P and Kirschenbaum MA**. Symptomatic hypocalcemia and hypomagnesemia with renal magnesium wasting associated with pentamidine therapy in a patient with AIDS. *Am J Med* **1990;** 89, 380-382.

343. **Wharton JM**, **Demopulos PA and Goldschlager N**. *Torsade de pointes* during administration of pentamidine isethionate. *Am J Med* **1987;** 83, 571-576.

344. **Olliaro PL**, **Guerin PJ**, **Gerstl S**, **Haaskjold AA**, **Rottingen JA and Sundar S**. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis* **2005;** 5, 763-774.

345. **Bouteille B**, **Oukem O**, **Bisser S and Dumas M**. Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam Clin Pharmacol* **2003;** 17, 171-181.

346. **Miletti KE and Leibowitz MJ.** Pentamidine inhibition of group I intron splicing in *Candida albicans* correlates with growth inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* **2000;** 44, 958-966.

347. **Ludewig G**, **Williams JM**, **Li Y and Staben C**. Effects of pentamidine isethionate on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **1994;** 38, 1123-1128.

348. **Barchiesi F, Del Poeta M, Morbiducci V, Ancarani F and Scalise G.** Effect of pentamidine on the growth of *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother* **1994;** 33, 1229-1232.

349. **Afeltra J, Dannaoui E, Meis JF, Rodriguez-Tudela JL and Verweij PE.** *In vitro* synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 3323-3326.

350. **Afeltra J, Meis JF, Vitale RG, Mouton JW, Verweij PE and the Eurofung Network.** *In vitro* activities of pentamidine, pyrimethamine, trimethoprim, and sulfonamides against *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 2029-2031.

351. **O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC.** Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998;** 95, 2044-2049.

352. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. **1998**.

353. **Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG and Walsh TJ.** Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* **2002;** 40, 3204-3208.

354. **Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Donnelly JP, Verweij PE and the Eurofung Network.** Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* **2001;** 39, 3402-3408.

355. **Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA and Douglas CM.** The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 3001-3012.

356. **Bolton FJ**, **Wareing DR and Sails AD**. Comparison of a novel microaerobic system with three other gas-generating systems for the recovery of *Campylobacter* species from human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1997;** 16, 839-842.

357. **Heizmann WR and Werner H**. GasPak Plus versus Anaerocult A--two carbon dioxide/hydrogen systems for cultivation of anaerobes. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* **1989;** 270, 511-516.

358. **Arikan S**, **Paetznick V and Rex JH**. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 3084-3087.

359. **Gaddis GM and Gaddis ML**. Introduction to biostatistics: Part 5, Statistical inference techniques for hypothesis testing with nonparametric data. *Ann Emerg Med* **1990;** 19, 1054-1059.

360. **Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW and Verweij PE.** Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *J Clin Microbiol* **2001;** 39, 478-484.

361. **Liao RS, Rennie RP and Talbot JA.** Assessment of the effect of amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999;** 43, 1034-1041.

362. **Bernard EM, Donnelly HJ, Maher MP and Armstrong D.** Use of a new bioassay to study pentamidine pharmacokinetics. *J Infect Dis* **1985;** 152, 750-754.

363. **Conte JE Jr**, **Upton RA**, **Phelps RT**, **Wofsy CB**, **Zurlinden E and Lin ET**. Use of a specific and sensitive assay to determine pentamidine pharmacokinetics in patients with AIDS. *J Infect Dis* **1986;** 154, 923-929.

364. **Donnelly H**, **Bernard EM**, **Rothkotter H**, **Gold JW and Armstrong D**. Distribution of pentamidine in patients with AIDS. *J Infect Dis* **1988;** 157, 985-989.

365. **Guarro J, Llop C, Aguilar C and Pujol I.** Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* **1997;** 41, 2760-2762.

366. **Koenig H and Kremer M.** A propos des discordances observees dans les resultants des CMI faites sur spores ou filaments d'*Aspergillus*. *Bull Soc Fr Mycol Med* **1979;** 8, 237-242.

367. **Teixeira AB, Moretti ML, Trabasso P, von Nowakonski A, Aoki FH, Vigorito AC, Miyaji M, Nishimura K, Taguchi H and Schreiber AZ.** Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case. *Mycopathologia* **2005;** 160, 291-296.

368. **Edwards DI.** Mechanism of antimicrobial action of metronidazole. *J Antimicrob Chemother* **1979;** 5, 499-502.

369. **Kontoyiannis DP and Lewis RE**. Toward more effective antifungal therapy: the prospects of combination therapy. *Br J Haematol* **2004;** 126, 165-175.

370. **Lewis RE and Kontoyiannis DP**. Rationale for combination antifungal therapy. *Pharmacotherapy* **2001;** 21, 149S-164S.

371. **Heyn K**, **Tredup A**, **Salvenmoser S and Muller FM**. Effect of voriconazole combined with micafungin against *Candida, Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005;** 49, 5157-5159.

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

373. **Shallom JM and Golin J**. The unusual inheritance of multidrug-resistance factors in *Saccharomyces*. *Curr Genet* **1996;** 30, 212-217.

374. **Schimpff S**, **Satterlee W**, **Young VM and Serpick A**. Empiric therapy with carbenicillin and gentamicin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. *N Engl J Med* **1971;** 284, 1061-1065.

375. **Bennett JE**, **Dismukes WE**, **Duma RJ**, **Medoff G**, **Sande MA**, **Gallis H**, **Leonard J**, **Fields BT**, **Bradshaw M**, **Haywood H**, **McGee ZA**, **Cate TR**, **Cobbs CG**, **Warner JF and Alling DW**. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptoccal meningitis. *N Engl J Med* **1979;** 301, 126-131.

376. **Polak A.** Combination therapy of experimental candidiasis, cryptococcosis, aspergillosis and wangiellosis in mice. *Chemotherapy* **1987;** 33, 381-395.

377. **Schaffner A and Frick PG**. The effect of ketoconazole on amphotericin B in a model of disseminated aspergillosis. *J Infect Dis* **1985;** 151, 902-910.

378. **Schmitt HJ**, **Bernard EM**, **Edwards FF and Armstrong D**. Combination therapy in a model of pulmonary aspergillosis. *Mycoses* **1991;** 34, 281-285.

379. **Sugar AM and Liu XP**. Interactions of itraconazole with amphotericin B in the treatment of murine invasive candidiasis. *J Infect Dis* **1998;** 177, 1660-1663.

380. **Barchiesi F**, **Schimizzi AM**, **Caselli F**, **Novelli A**, **Fallani S**, **Giannini D**, **Arzeni D**, **Di Cesare S**, **Di Francesco LF**, **Fortuna M**, **Giacometti A**, **Carle F**, **Mazzei T and Scalise G**. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **2000;** 44, 2435-2441.

381. **George D**, **Kordick D**, **Miniter P**, **Patterson TF and Andriole VT**. Combination therapy in experimental invasive aspergillosis. *J Infect Dis* **1993;** 168, 692-698.

382. **Sugar AM**, **Hitchcock CA**, **Troke PF and Picard M**. Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **1995;** 39, 598-601.

383. **O'Reilly T, Cleeland R and Squires EL.** Evaluation of antimicrobials in experimental animal models. In: Animal Model of Infection. Williams and Wilkins, Baltimore. **1996.**

384. **Diamond DM**, **Bauer M**, **Daniel BE**, **Leal MA**, **Johnson D**, **Williams BK**, **Thomas AM**, **Ding JC**, **Najvar L**, **Graybill JR and Larsen RA**. Amphotericin B colloidal dispersion combined with flucytosine with or without fluconazole for treatment of murine cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* **1998;** 42, 528-533.

385. **Louie A**, **Banerjee P**, **Drusano GL**, **Shayegani M and Miller MH**. Interaction between fluconazole and amphotericin B in mice with systemic infection due to fluconazole-susceptible or -resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999;** 43, 2841-2847.

386. **Najvar LK**, **Cacciapuoti A**, **Hernandez S**, **Halpern J**, **Bocanegra R**, **Gurnani M**, **Menzel F**, **Loebenberg D and Graybill JR**. Activity of posaconazole combined with amphotericin B against *Aspergillus flavus* infection in mice: comparative studies in two laboratories. *Antimicrob Agents Chemother* **2004;** 48, 758-764.

387. **Kirkpatrick WR**, **Vallor AC**, **McAtee RK**, **Ryder NS**, **Fothergill AW**, **Rinaldi MG and Patterson TF**. Combination therapy with terbinafine and amphotericin B in a rabbit model of experimental invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2005;** 49, 4751-4753.

388. **Hughes CE**, **Peterson LR**, **Beggs WH and Gerding DN**. Ketoconazole and flucytosine alone and in combination against *Candida* spp. in a neutropenic site in rabbits. *J Antimicrob Chemother* **1986;** 18, 65-72.

389. **Kartalija M**, **Kaye K**, **Tureen JH**, **Liu Q**, **Tauber MG**, **Elliott BR and Sande MA**. Treatment of experimental cryptococcal meningitis with fluconazole: impact of dose and addition of flucytosine on mycologic and pathophysiologic outcome. *J Infect Dis* **1996;** 173, 1216-1221.

390. **Ding JC**, **Bauer M**, **Diamond DM**, **Leal MA**, **Johnson D**, **Williams BK**, **Thomas AM**, **Najvar L**, **Graybill JR and Larsen RA** Effect of severity of meningitis on fungicidal

activity of flucytosine combined with fluconazole in a murine model of cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* **1997;** 41, 1589-1593.

391. Kirkpatrick WR, **Perea S**, **Coco BJ and Patterson TF**. Efficacy of caspofungin alone and in combination with voriconazole in a Guinea pig model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 2564-2568.

392. Graybill JR, **Bocanegra R**, **Najvar LK**, **Hernandez S and Larsen RA**. Addition of caspofungin to fluconazole does not improve outcome in murine candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **2003;** 47, 2373-2375.

393. Graybill JR, **Bocanegra R**, **Gonzalez GM and Najvar LK**. Combination antifungal therapy of murine aspergillosis: liposomal amphotericin B and micafungin. *J Antimicrob Chemother* **2003;** 52, 656-662.

394. Petraitis V, **Petraitiene R**, **Sarafandi AA**, **Kelaher AM**, **Lyman CA**, **Casler HE**, **Sein T**, **Groll AH**, **Bacher J**, **Avila NA and Walsh TJ**. Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: synergistic interaction between an antifungal triazole and an echinocandin. *J Infect Dis* **2003;** 187, 1834-1843.

395. Murray HW, **Hariprashad J and Fichtl RE**. Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T-cell-deficient host: response to amphotericin B and pentamidine. *Antimicrob Agents Chemother* **1993;** 37, 1504-1505.

396. Mbongo N, **Loiseau PM**, **Craciunescu DG and Robert-Gero M**. Synergistic effect of Ir-(COT)-pentamidine alizarin red and pentamidine, amphotericin B, and paromomycin on *Leishmania donovani*. *Acta Trop* **1998;** 70, 239-245.

397. Kontoyiannis DP and Lewis RE. Combination chemotherapy for invasive fungal infections: what laboratory and clinical studies tell us so far. *Drug Resist Updat* **2003;** 6, 257-269.

398. Lewis RE and Kontoyiannis DP. Micafungin in combination with voriconazole in *Aspergillus* species: a pharmacodynamic approach for detection of combined antifungal activity *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* **2005;** 56, 887-892.

399. Lionakis MS, **Lewis RE**, **May GS**, **Wiederhold NP**, **Albert ND**, **Halder G and Kontoyiannis DP**. *Toll*-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the

study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *J Infect Dis* **2005;** 191, 1188-1195.

400. **Chamilos G**, **Lionakis MS**, **Lewis RE**, **Lopez-Ribot JL**, **Saville SP**, **Albert ND**, **Halder G and Kontoyiannis DP**. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. *J Infect Dis*. 2006; 193, 1014-1022.
401. **Chamilos G**, **Lewis RE and Kontoyiannis DP**. Lovastatin has significant activity against *Zygomycetes* and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **2006;** 50, 96-103.
402. **Mylonakis E and Aballay A**. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infect Immun* **2005;** 73, 3833-3841.
403. **Hughes CE**, **Harris C**, **Peterson LR and Gerding DN**. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp. by tetracycline analogs. *Antimicrob Agents Chemother* **1984;** 26, 837-840.
404. **Gudmundsson S and Erlenddottir H.** Murine thigh infection model, In O. Zak and M. A. Sande (ed.), Handbook of animal models of infection. Academic Press, London, U.K. **1999;** 137-144.
405. **Lewis RE, Prince RA, Chi J and Kontoyiannis DP.** Itraconazole preexposure attenuates the efficacy of subsequent amphotericin B therapy in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2002;** 46, 3208-3214.
406. **Waalkes TP and DeVita VT**. The determination of pentamidine (4,4'-diamidinophenoxypentane) in plasma, urine, and tissues. *J Lab Clin Med* **1970;** 75, 871-878.
407. **Waalkes TP**, **Denham C and DeVita VT**. Pentamidine: clinical pharmacologic correlations in man and mice. *Clin Pharmacol Ther* **1970;** 11, 505-512.
408. **Dixon DM**, **Polak A and Walsh TJ**. Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect Immun* **1989;** 57, 1452-1456.
409. **Bowman JC**, **Abruzzo GK**, **Anderson JW**, **Flattery AM**, **Gill CJ**, **Pikounis VB**, **Schmatz DM**, **Liberator PA and Douglas CM**. Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. *Antimicrob Agents Chemother* **2001;** 45, 3474-3481.

410. **Leoung GS**, **Feigal DW Jr**, **Montgomery AB**, **Corkery K**, **Wardlaw L**, **Adams M**, **Busch D**, **Gordon S**, **Jacobson MA and Volberding PA**. Aerosolized pentamidine for prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia. The San Francisco community prophylaxis trial. *N Engl J Med* **1990;** 323, 769-775.

411. **Hirschel B**, **Lazzarin A**, **Chopard P**, **Opravil M**, **Furrer HJ**, **Ruttimann S**, **Vernazza P**, **Chave JP**, **Ancarani F and Gabriel V**. A controlled study of inhaled pentamidine for primary prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *N Engl J Med* **1991;** 324, 1079-1083.

412. **Marras TK, Sanders K, Lipton JH, Messner HA, Conly J and Chan CK.** Aerosolized pentamidine prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia after allogeneic marrow transplantation. *Transpl Infect Dis* **2002;** 4, 66-74.

413. **Rodriguez M and Fishman JA**. Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* **2004;** 17, 770-782.

414. **Link H**, **Vohringer HF**, **Wingen F**, **Bragas B**, **Schwardt A and Ehninger G**. Pentamidine aerosol for prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia after BMT. *Bone Marrow Transplant* **1993;** 11, 403-406.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

18S ριβοσωμικό RNA 148
5-φλουκυτοσίνη 73, 82, 96, 97, 98, 103, 107, 116, 121, 126, 136

A

ABI PRISM 7000 148
Acremonium species 61, 67
AIDS 38, 90, 92, 160
Air-crescent sign 50, 53, 58
Alternaria species 51
Analysis of variance 105, 150
Aspergillus 40, 51, 57-59, 67, 71, 72, 94, 96, 120-122, 125, 132, 134, 139
Aspergillus fumigatus 121, 122, 132, 134
Aspergillus terreus 67, 94

B

Balb-c 46, 142, 148, 151-153, 158, 162

C

CampyPak Plus 103
Candida albicans 94, 121, 124
Candida tropicalis 95
CD_4 βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα 34
CFDA 100-102, 113-115, 120, 161
CFU 98, 145
Checkerboard 82, 127, 128, 130-133, 138, 162
Cladophialophora species 121, 159
Cladosporium species 121, 159
Cryptococcus neoformans 94, 136
CS-758 73, 80
Curvularia species 51
Cylindrocarpon species 61

D

DiBAC 100-102, 113-115, 120, 161
Disk diffusion susceptibility testing 103, 105, 108, 113, 116, 117, 119, 124, 128, 132-134, 138, 161, 162
Diversi Lab 64-66
DNA 64, 124, 148, 154

E

EC_{50} 106, 111, 113, 123
EC_{90} 106, 111, 113, 123
ECmax 106
ECmin 106
ER 30346 73

F

Fruiting body 61
Fusarium anthophilum 30
Fusarium chlamidosporum 29
Fusarium dimerum 29
Fusarium ear rot 29
Fusarium equiseti 30, 62
Fusarium graminearum 41, 42
Fusarium lichenicola 30
Fusarium moniliforme 29, 30, 39, 41, 44, 61, 62
Fusarium napiforme 29
Fusarium nygamai 29
Fusarium oxysporum 29, 30, 43, 46, 62, 78, 82-84, 95, 96, 100-104, 110-115, 120, 121, 123, 134, 141, 142, 145, 146, 148, 151, 154, 155, 158, 159, 162, 163
Fusarium pallidoroseum 95
Fusarium poae 41, 42
Fusarium proliferatum 29, 30, 39, 62, 95, 96, 110, 111
Fusarium semitectum 29
Fusarium solani 29, 30, 43-46, 56, 61-63, 72, 74, 77, 79, 81-84, 95, 96, 100, 102, 103, 105, 107, 108, 110-121, 123, 127, 130-133, 138, 159, 161
Fusarium sporotrichioides 41, 42
Fusarium verticilloides 29, 30, 46, 63, 67, 75
Fusarium wilt 29

G

GasPak Plus 103, 104

G-CSF 84
GM-CSF 84
GMS 43, 150, 152, 155, 156
GraphPad Prism 3 105

H

Halo sign 50, 53, 58
Hill coefficient 106

I

In situ υβριδισμός 59
In vitro in vivo συσχέτιση 72
In vivo checkerboard method 139

K

Kaplan-Meier 150
Kruskal-Wallis 105

L

Leishmania donovani 94, 138
Log-rank test 150
L-γλουταμίνη 97

M

Mann-Whitney two-tailed *t test* 105
MIC-0 98, 100, 103, 105, 108-114, 116, 118, 127, 130-132
MIC-2 98, 100, 103, 105, 108-114, 116, 118, 127, 130-132
Microtitration plate 97-103
MOPS 97

N

NCCLS 96-100, 107-110, 113, 116, 118, 119, 124, 141, 161

P

Paecilomyces species 67, 121, 159
Petri 99, 103, 104, 128, 129, 138, 145
Pneumocystis carinii 90, 94
Pneumocystis jiroveci 90, 92, 94, 100, 163
Potato dextrose agar 97, 145
Pseudallescheria boydii 57, 59
Pseudomonas aeruginosa 29, 135

R

Revertants 132-134
RPMI 1640 medium 97, 100
RPMI-2 medium 97, 102, 103, 105, 108, 111-113, 119, 120, 122, 123

S

Sabouraud agar 67
Saccharomyces cerevisiae 94, 124
Scedosporium species 51, 67
Scedosporium prolificans 94, 120, 122, 138
Scopulariopsis species 121, 159
Standard deviation 108, 112, 117, 133

T

Th1 κυτταροκίνες 34
Th2 κυτταροκίνες 34
Time-kill assay 102, 104, 106
Torsades de pointes 93, 144
Trypanosoma brucei gambiense 94
Trypanosoma brucei rhodesiense 94
Trypanosoma cruzi 94
Tukey's Test 129
Tumor necrosis factor α (TNF-α) 34

U

UR-9825 73, 80

V

Verticillium species 61

X

XTT 99, 102, 104, 106, 111-113

Y

YNB medium 97, 99, 101, 103, 105, 108, 109, 111-113, 119-123

Z

Zygomycetes species 51, 52, 58, 59, 65, 67, 96, 120

Α

Άγαρ 103, 128
Αγγειοτρόπες ιδιότητες 43, 125, 161
Αδιάφορη αλληλεπίδραση 128, 130, 132, 147
Αζασορδαρίνες 73, 81
Αζιθρομυκίνη 73, 83, 126, 139
Αθροιστική αλληλεπίδραση 82, 128, 132, 136, 162
Αιθανόλη 101, 147
Αίμα 58, 64, 65, 67, 68, 90, 96, 121, 143, 160
Αιματοεγκεφαλικός φραγμός 91
Αιματοκυτόμετρο 145
Αιματολογικές νεοπλασίες 34, 36, 49, 57, 80, 84, 85, 92, 103
Αιμόπτυση 51, 85
Αιμορραγική κυστίτιδα 54
Αιμορραγική νέκρωση 161
Αιμοφόρα αγγεία 43, 125
Ακέραιο ανοσοποιητικό σύστημα 34, 70
Ακτίνα 104, 108, 116, 117, 129, 133
Ακτινογραφία θώρακος 49, 50, 52
Αλλεργίες 40
Αλλογενής μεταμόσχευση του μυελού των οστών 37, 38, 51, 80, 123, 160, 163
Αμιδικές ουσίες 73, 81
Αμφοτερικίνη Β47, 48, 73-83, 86, 91, 94, 96-98, 101, 103, 105, 107, 110, 113, 114, 116, 117, 119, 120, 121, 123, 126, 127-141, 143, 147, 148, 150, 152-159, 162-164
Αμφοτερικίνη Β και αζιθρομυκίνη 73, 126, 139
Αμφοτερικίνη Β και βορικοναζόλη 73, 126
Αμφοτερικίνη Β και κασποφουγκίνη 73, 126
Αμφοτερικίνη Β και ριφαμπικίνη 73, 126
Αμφοτερικίνη Β και τερβιναφίνη 73, 126
Αναερόβιες συνθήκες 103-105, 116-118, 124
Αναιμία 42, 93
Αναπνευστική οδός 31, 32, 51, 88, 146, 158, 162
Αναπτυξιακή μορφή 95, 111, 112, 119
Αναστολείς θρυψίνης 73, 81
Ανθεκτικότητα 48, 58, 67, 72, 81, 82, 119, 120, 122, 133, 134, 136, 138, 159, 161
Ανιδουλαφουγκίνη 73, 81, 82, 126
Ανοσοϊστοχημεία 59
Ανταγωνισμός 128, 130, 132, 133, 136-138
Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης 64, 148, 163
Αντίδραση του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή 37, 38, 51
Αντιμυκητιασικά φάρμακα/αγωγή 35, 37, 46-48, 56, 58-60, 67, 70, 72-75, 77-83, 85, 86, 88, 89, 94, 96-99, 103, 105, 107, 111, 114, 116, 119-121, 124-130, 132, 134, 135-140, 143, 147, 148, 150, 152-154, 156, 158-163
Αξονική τομογραφία 49, 50-53, 86
Απεσταγμένο νερό 97, 99, 103, 128, 142, 143, 145
Απλαστική αναιμία 36, 38
Αποικίες 60, 99, 132, 134
Αποικισμός 49, 88, 123
Απορρόφηση 90, 91, 111-113
Αποστειρωμένο 88, 101, 103, 128, 136, 142
Απόστημα 49, 55, 75
Ασπεργιλλαιμία 67
Αυξητικοί παράγοντες 84, 89

Β

β-γλυκάνη 64
Βαριά μέταλλα 47
Βενζιμιδαζόλες 81
Βήχας 51, 93
Βιοψία 59, 86, 96, 141
Βλατίδες 69
Βλεννογονίτιδα 47
Βορικοναζόλη 48, 52, 73, 74, 77, 79, 80, 83, 86, 96-98, 103, 106-108, 116, 119, 120, 126, 137, 164

Βουτενολίδη 39, 68
Βρογχοκυψελιδικές εκπλύσεις 64
Βρογχόσπασμος 93

Γ

Γαγγραινώδες έκθυμα 69
Γαστρεντερικός σωλήνας 32, 54, 90
Γενταμυκίνη 77, 135
Γκιμπερελλίνη 65
Γκριφολίνη 73, 81
Γλιοτοξίνη 40
Γλυκονική χλωρεξιδίνη 77

Δ

Δείκτης κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης 127, 131
Δενδριτικά κύτταρα 84
Δεοξυνιβαλενόλη 39, 40
Δεοξυχολική αμφοτερικίνη Β 73, 75, 143
Δέρμα 31, 32, 48, 54
Δερματικές βλάβες 68-70
Δερματόφυτα 32
Δευτερογενής προφύλαξη 89
Δήγμα εντόμων 70
Διαβήτης 49
Διαβητική κετοξέωση 57
Διακετοξυσιρπενόλη 39
Διάρροια 41, 42, 93
Διασπαρμένη φουσαρίωση 31, 32, 36, 38, 48, 49, 54, 55, 58, 65, 67-69, 158, 159, 162
Διάστημα QT 93, 144
Διαταραχή της συνέχειας της επιδερμίδας 70, 88
Διατροφική τοξική αλευκία 41
Διαφορική διάγνωση 57, 59, 60
Διηθητική ασπεργίλλωση 30, 32, 37, 51-53, 57, 58, 60, 65, 67, 68, 70, 73, 78, 84, 85, 136, 146
Διμεθυλσουλφοξίδη 97
Δύσπνοια 51, 93

Ε

Εγκατάσταση της λοίμωξης68, 78, 88, 124, 141, 142, 145-147, 150-153, 158, 160-163
Έγκαυμα 31, 49, 78
Εγκεφαλικό απόστημα 55
Εγκεφαλικό έμφρακτο 55
Εισπνοή 32, 9-93, 158, 162
Εκατοστιαία ελάττωση 110
Εκοναζόλη 73, 79
Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση 73, 74, 98, 99, 103, 110, 127, 131, 132, 141, 159
Ελάχιστη μυκητοκτόνος συγκέντρωση 99, 101, 113, 141
Ελεύθερη αμφοτερικίνη Β 76
Εμβόλια 84
Εμπειρική θεραπεία 48, 78, 135
Έμφρακτα 49, 55, 125, 161
Ενδοθηλιακά κύτταρα 43
Ενδοκαρδίτιδα 55, 56, 83
Ενδοκοιλιακή νέκρωση 144, 160
Ενδοκρινικές διαταραχές 40
Ενδομυϊκή 90, 93
Ενδοπεριτοναϊκή 142-144
Ενδορινικός 49, 146, 151, 152, 158, 162
Ενδοφθαλμίτιδα 33, 45, 49, 54, 76-78
Ενδοφλέβια 75, 90, 93, 143, 144, 147, 158, 160, 162
Ενοφθαλμισμός 145, 146, 151, 152, 162
Επιγλωτίτιδα 55
Επιδημιολογία 29, 30
Επιπεφυκότας 45
Επιπολασμός 30
Επίπτωση 30, 36
Έρπητας 45
Ερυθηματώδεις πλάκες 70, 86
Εσχάρα 58, 69, 70, 85
Ευθανασία 147, 148, 150
Ευκάλυπτος 81
Εχινοκανδίνες 81, 137

Ζ

Ζεαραλενόνη 39, 40
Ζυμομύκητας 67, 94, 96, 124, 135

Ζώνη αναστολής 105, 108, 116, 117, 129, 132-134

Η

Ήπαρ 75, 91, 121
Ηπατοτοξικότητα 83, 93

Θ

Θετικές αιμοκαλλιέργειες 65-67, 135
Θνητότητα 34-36, 41, 56, 58, 76, 88, 126, 135, 151, 152, 158, 159, 161
Θρομβοπενία 93
Θωρακικός πόνος 51

Ι

Ιγμορίτιδα 49, 51, 53, 75
Ιμιδαζόλες 77
Ιντερλευκίνη 10 34
Ιντερλευκίνη 12 34
Ιντερλευκίνη 15 84
Ιντερλευκίνη 2 34
Ιντερλευκίνη 4 34
Ιντερλευκίνη 5 34
Ιντερφερόνη γ 34
Ιντρόνιο 124
Ισοφλουράνιο 146
Ιστοπαθολογία 57-59, 70, 86, 150, 152, 153, 155-157, 163
Ιτρακοναζόλη 48, 74, 77, 79, 96, 97, 98, 103, 107, 108, 116, 119, 120, 121, 123, 126, 137, 159

Κ

Καθετήρες συνεχούς περιτοναϊκής αιμοκάθαρσης 31, 44, 46
Κακοήθης εξωτερική ωτίτιδα 54
Καλλιέργεια 57, 60, 62, 64, 86, 97, 145
Καμπύλες δόσης–αποτελέσματος 111
Καντιντίαση 40, 136
Καρβαζόλες 81
Καρβενικιλλίνη 135
Καρκίνος συμπαγών οργάνων 49
Καρκίνος του οισοφάγου 40
Κασποφουγκίνη 73, 74, 81, 82, 96-98, 103, 107, 116, 119, 120, 126, 132, 134, 137
Καταστολή του μυελού των οστών 39, 82
Κεκροπίνη Α 73, 81
Κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες 31, 44, 46, 75
Κερατεκτομή 78
Κερατίτιδα 44-46, 49, 54, 76-79
Κερατοειδής χιτώνας 44-46, 78
Κερατοπλαστική 45, 78
Κετοκοναζόλη 73, 77, 79, 121, 137
Κηλίδες 68, 69
Κλασματική ανασταλτική συγκέντρωση 127
Κλινικές εκδηλώσεις 48, 49, 54, 58
Κλοτριμαζόλη 73, 77, 79
Κολλαγενάσες 44
Κονιδιακά ανάλογα 148, 154
Κονιδιοφόρα 63
Κοξιδίνη 73, 81
Κορτικοστεροειδή 34, 36, 37, 45, 75, 78, 85, 158
Κρυπτοκοκκική μηνιγγίτιδα 136
Κρυπτοκόκκωση 40, 136
Κρυσταλλική δομή 91
Κυκλοπιρόξη 85
Κυκλοσπορίνη 43, 67
Κυκλοφωσφαμίδη 46, 142, 143
Κυτταρικό τοίχωμα 81, 138, 139
Κυτταροκίνες 34

Λ

Λαρυγγίτιδα 55
Λεκτίνη 65
Λεμφώματα 36
Λευκοπενία 39, 42, 93
Λιποσωμική αμφοτερικίνη Β 74, 75, 83
Λιποσωμική νυστατίνη 78
Λιπόφιλη 76, 138
Λοβεκτομή 85
Λογισμικό πρόγραμμα 101, 148
Λοιμώξεις των μαλακών μορίων 31, 48, 49, 85

Λοίμωξη της στοματικής κοιλότητας 32, 55
Λοιμογόνος ικανότητα 30, 38, 163

Μ

Μακροκονίδια 60-63
Μακροφάγα 34, 35, 40, 123
Μάρτυρας 65, 95, 96, 101, 105, 147, 152-156, 159, 163
Μαστικό απόστημα 55
Μεναδιόνη 99
Μέση διακύμανση 108, 112, 117, 133
Μέσο καλλιέργειας 66, 67, 95, 97, 99, 101-103, 105, 107-109, 111-113, 118-122, 152
Μεταβολίτης 96, 124
Μεταγγίσεις ουδετερόφιλων 84, 89
Μεταλλική γεύση 93
Μεταμόσχευση μυελού των οστών 49-52, 71
Μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων 38, 49
Μετρονιδαζόλη 124
Μηνιγγίτιδα 55, 136
Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα 49, 55
Μηχανισμός δράσης 124, 138, 139, 164
Μικαφουγκίνη 73, 81, 126, 137
Μικοναζόλη 73, 77, 79, 121
Μικροαεροφιλικές συνθήκες 103-105, 116-118
Μικροκονίδια 60, 61
Μικροσκόπιο 101, 102
Μιτοχόνδριο 124
Μονιλιφορμίνη 39, 41
Μονοθεραπεία 78, 82, 126, 128, 162, 164
Μονοφιαλίδες 62
Μορφολογία καλλιέργειας *Fusarium* 61, 62
Μουκορμύκωση 51, 52, 57, 67
Μπιφοναζόλη 73, 79
Μυαλγίες 58, 70, 86
Μυκέτωμα 55, 56
Μυκήλιο 61
Μυκηταιμία 46, 47, 49, 58, 65, 67, 68, 75, 81
Μυκητοκτόνος 79, 99, 107, 108, 113, 119-121
Μυκητοστατικός 79, 108, 119
Μυοκαρδίτιδα 55
Μυοσίτιδα 54

Ν

Ν-ακετυλκυστεΐνη 73
Ναταμυκίνη 45, 73, 76-79
Νεκροψία 54, 67, 121, 144, 160
Νέκρωση 42-44, 57, 69, 70, 78, 93, 144, 160, 161
Νεκρωτική παγκρεατίτιδα 92, 144, 160
Νεφρά 91, 121
Νεφρική ανεπάρκεια 31, 91-93, 139
Νεφρίτιδα 54
Νεφροτοξικότητα 75, 92, 93, 139
Νιβαλενόλη 39, 41
Νικκομυκίνη Ζ 73, 81
Νοσηρότητα 161
Νόσος Akakabi-byo 41, 42
Νόσος Kashin-Beck 41, 42
Νόσος Keshan 41
Νόσος του Chagas 94
Νυστατίνη 73, 78

Ο

Όζοι 51, 58, 69, 69
Οζώδεις πυκνώσεις 49, 50
Ονυχομύκωση 31-33, 49, 75, 79, 85
Οξεία λεμφογενής λευχαιμία 36, 83, 96
Οξεία λευχαιμία 30, 33, 36, 44, 49, 69, 80, 81, 83, 162
Οξεία μυελογενής λευχαιμία 36, 51, 83, 141
Οπτική πυκνότητα 99, 100, 110, 131, 132
Οσμωτική λύση 139
Οστεομυελίτιδα 33, 48, 49, 54
Ουδετεροπενία 31, 35, 36, 39, 42, 46-48, 51, 68, 80, 85, 86, 88, 92, 93, 124,

125, 135, 141, 143, 151, 153, 158, 159, 162
Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα 35, 36, 40, 44, 51, 70, 72, 74-76, 84, 143
Ούρα 68, 91
Οφθαλμός 45, 77

Π

Παγκρεατίτιδα 92, 93, 133
Παθογένεση 38, 44, 68, 123, 162, 163
Παραρρίνιοι κόλποι 32, 48, 51, 52, 54, 57, 58, 85, 86
Παρενέργειες 90, 92, 93, 144, 163
Παρωνυχία 31, 33, 85
Πείραμα 95-99, 102, 105, 107, 109, 112, 113, 119, 120, 125, 127-130, 136-154
Πειραματικό μοντέλο 30, 44, 75, 79, 80, 82, 124, 125, 140-154
Πενταμιδίνη 90-157
Περίοδος επώασης 32, 58
Περιτονίτιδα 47, 54
Πλευριτική συλλογή 52
Πλευριτικό φύσημα 51
Πνευμονία 44, 48, 49, 51, 52, 57, 58, 90, 92, 94, 139, 151, 160, 163
Πνευμονικές κοιλότητες 49, 50, 85
Πνευμονικό απόστημα 49
Πολυενικό 78, 96
Πολυεξαμεθυλενική διγουανίδη 77
Πολυκλωνικά αντισώματα 59
Πολυκυστική νόσος των νεφρών 40
Πολυμερή νυστατίνης 78
Πολυφιαλίδες 62
Πορφύρα 68
Ποσακοναζόλη 73, 74, 77-80, 83, 137, 164
Πόσιμο νερό 88
Ποσοτική αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης 163
Πραδιμικίνη 73, 81
Πρόγνωση 34-36, 38, 41, 45-48, 58, 67, 72, 74, 76, 84
Προγνωστικός παράγοντας 84, 158
Πρόληψη 37, 84, 88
Προσκολλητικές ιδιότητες 44, 47
Προτεάσες 44
Προφυλακτική θεραπεία 48, 52, 74, 80, 88, 94, 124, 141, 147, 148, 150, 152-156, 158-160, 163
Πρωτεΐνες 76, 91
Πρωτεϊνοσύνθεση 40, 81, 124, 139
Πρωτόζωα 90, 94, 138
Πύλη εισόδου 32, 88
Πυρετός αγνώστου αιτιολογίας 48, 49

Ρ

Ραβουκοναζόλη 73, 79, 83, 126, 127
Ριφαμπικίνη 73, 77, 83, 126, 139
Ριφαμπουτίνη 83, 126

Σ

Σηπτική αρθρίτιδα 54
Σήψη 135
Σιαλογονίτιδα 55
Σκεδοσπορίωση 51
Σκληρίτιδα 54
Σουλφαδιαζίνη 77
Σουραμίνη 94
Σπεκτροφωτομετρική μέθοδος 97, 99, 110
Σπεκτροφωτόμετρο 99, 101
Σπλήνας 54, 75, 91, 121
Στατιστική ανάλυση 105, 129, 133, 150
Συνδυασμός 73-75, 77-79, 82-84, 89, 126-140, 162, 164
Συνέργεια 82, 83, 126, 128, 130-132, 136-139, 140, 162
Συριγκομυκίνη Ε 73, 81
Σύστημα ύδρευσης 33

Τ

Τ-2 τοξίνη 39, 40
Ταυτοποίηση 61, 62, 64-66, 74, 95
Ταχυκαρδία 41, 93
Τεβουκοναζόλη 73, 79
Τερβιναφίνη 73, 81, 83, 126, 137
Τετραζολικό άλας 99
Τετρακυκλίνες 139
Τ-λεμφοκύτταρα 34, 43, 84

Τοξικότητα 76, 78, 135, 136, 140, 144, 147, 159
Τοξίνες 38-43, 58, 67, 68
Τραύμα 48, 49, 70
Τραχειοβρογχίτιδα 55
Τραχηλίτιδα 55
Τριαζόλες 79, 80, 83, 120
Τρυπανοσώματα 90, 94

Υ

Υαλοειδές σώμα 78
Υπεργλυκαιμία 92
Υπερκαλιαιμία 92, 93
Υπεροξείδιο του οξυγόνου 101, 114
Υποασβεστιαιμία 93, 144
Υπογλυκαιμία 92, 93
Υποδερματικοί όζοι 68, 69
Υπομαγνησιαιμία 93, 144
Υποξία 103, 116, 124, 161
Υπόταση 93

Φ

Φαγοκυττάρωση 34, 40, 124
Φακοί επαφής 44, 45
Φαρμακοδυναμικές μελέτες 76, 139
Φαρμακοδυναμική ανάλυση 111, 112
Φαρμακοκινητικές μελέτες 77, 143, 144, 160
Φαρμακολογία 90
Φαρυγγοοισοφαγίτιδα 55
Φάσμα 94, 136
Φθορίζουσες χρώσεις 100, 120, 161
Φιαλίδες 63
Φίλτρο 101, 145
Φλεγμονή 41, 46, 70, 78
Φλουκοναζόλη 48, 79, 96-98, 103, 107, 116, 119, 121, 126, 137
Φλύκταινες 69
Φορμαζάνη 99, 100, 102
Φουμονισίνη Β1 39, 40
Φουράνες 81
Φουσαρενόνη 39, 68
Φυσαλίδες 69
Φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου 104, 116, 117
Φυτικά έλαια από *Eucalyptus* 73, 81

Χ

Χαμηλή τάση οξυγόνου 103, 116, 124
Χειρουργική θεραπεία 49, 56, 76, 85
Χημειοθεραπεία 39, 80, 88
Χιτίνη 81
Χλαμυδοσπόρια 61-63
Χρόνια ηπατίτιδα 55
Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος 36, 38
Χρόνια λεμφογενής λευχαιμία 36
Χρόνια μυελογενής λευχαιμία 36
Χρωματομετρική μέθοδος 99, 100, 102, 111, 121, 161
Χρώση 43, 86, 100-102, 113-116, 120, 150, 152, 155-157

Ψ

Ψηφιακή κάμερα 101

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. **Lionakis MS, Lewis RE, Samonis G and Kontoyiannis DP**. Pentamidine is active *in vitro* against *Fusarium* species. *Antimicrob Agents Chemother* **2003;** 47, 3252-3259.
2. **Lionakis MS and Kontoyiannis DP**. *Fusarium* infections in critically ill patients. *Semin Respir Crit Care Med* **2004;** 25, 159-169.
3. **Lionakis MS**, **Chamilos G**, **Lewis RE**, **Wiederhold NP**, **Raad II**, **Samonis G and Kontoyiannis DP**. Pentamidine is active in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2006;** 50, 294-297.

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 2003, p. 3252–3259 Vol. 47, No. 10
0066-4804/03/$08.00+0 DOI: 10.1128/AAC.47.10.3252–3259.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Pentamidine Is Active In Vitro against *Fusarium* Species

Michail S. Lionakis,[1,2] Russell E. Lewis,[1,3] George Samonis,[2] and Dimitrios P. Kontoyiannis[1,3]*

Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center,[1] and College of Pharmacy, University of Houston,[3] Houston, Texas, and Medical School of the University of Crete, Heraklion, Greece[2]

Received 10 April 2003/Returned for modification 22 May 2003/Accepted 11 June 2003

Fusariosis is an emerging opportunistic mycosis against which currently used antifungals have limited activity. Here, we investigated the in vitro activities of pentamidine (PNT) against 10 clinical isolates of *Fusarium* species (five *Fusarium solani* isolates and five non-*F. solani* isolates) by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards microdilution method in three different media (RPMI, RPMI-2, and a yeast nitrogen base medium), disk diffusion testing, and viability dye staining. PNT had significant activities against all 10 *Fusarium* isolates. Non-*F. solani* isolates were more susceptible than *F. solani* isolates ($P < 0.05$). Additionally, PNT was fungicidal against all non-*F. solani* isolates, whereas it had fungistatic effects against four of the five *F. solani* isolates. PNT also exhibited greater activity against conidial than against hyphal development of the fungus. This fungicidal activity against non-*F. solani Fusarium* isolates was confirmed microscopically after staining of PNT-treated *Fusarium oxysporum* hyphae with the fluorescent viability dyes 5,(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC). The MICs at which 50% of the isolates were inhibited (2 μg/ml for non-*F. solani* isolates and 4 μg/ml for *F. solani* isolates) and the minimum fungicidal concentration at which 50% of the isolates were killed (8 μg/ml for non-*F. solani* isolates) were much lower than the PNT tissue concentrations previously reported in humans using conventional daily intravenous PNT dosing. Finally, PNT was more active against *Fusarium* isolates in a hypoxic environment of in vitro growth ($P < 0.05$). This finding may be clinically significant, because *Fusarium*, an angiotropic mold, causes tissue infarcts with resultant low tissue perfusion. Our findings suggest that PNT may have a role in the management of *Fusarium* infections. Future in vivo studies are needed to verify these in vitro findings.

Invasive fusariosis is a severe opportunistic fungal infection that is primarily encountered in patients with leukemia (7, 27, 28). Nevertheless, other profoundly immunocompromised patients, such as allogeneic bone marrow and solid-organ transplant recipients, may experience this infection (7, 27, 28). This devastating mycosis has emerged in recent years as the second most common opportunistic invasive mold infection, behind only invasive aspergillosis, in some tertiary-care cancer centers (7, 27, 28). The most common clinical presentation of fusariosis is pneumonia, which is followed by disseminated disease (27). Among the *Fusarium* species, *Fusarium solani* accounts for nearly half of the cases of invasive fusariosis in humans and is the most virulent strain according to tests in animal models (27). *Fusarium oxysporum* is the second most commonly encountered species, followed by *Fusarium moniliforme*, *Fusarium verticilloides*, and *Fusarium proliferatum* (7, 17, 27, 28).

Several studies have demonstrated the limited activities of antifungal agents against *Fusarium* spp. both in vitro and in animal models (3, 4, 13, 25). The only somewhat active agents in vitro are amphotericin B (AMB) and the newer broad-spectrum triazoles voriconazole (VRC) and posaconazole (24, 25); nevertheless, their in vivo activity in animal models is mediocre, which is in agreement with the exceedingly high mortality rate associated with this infection in clinical practice (>80%, even with treatment) (7, 27). Irrespective of treatment, the major prognostic determinant in fusariosis cases is neutrophil recovery (D. P. Kontoyiannis, H. Hanna, R. Hachem, M. Boktour, E. Girgawy, M. Mardani, G. P. Bodey, and I. Raad, Abstr. 40th Ann. Meet. Infect. Dis. Soc. Am., abstr. 366, 2002). Thus, the introduction of new, more effective therapeutic approaches is essential to improving the prognosis of fusariosis.

Pentamidine (PNT) is an antimicrobial agent that is active against a broad spectrum of microbes, including fungi (26). Administration of PNT is a well-established approach used for prophylaxis and treatment of pneumonia caused by *Pneumocystis carinii*, a microorganism that was recently classified taxonomically to be a fungus (21). PNT has also been shown to have in vitro activities against a variety of fungal pathogens, such as *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Scedosporium prolificans*, and *Aspergillus terreus* (1, 2, 5, 20). Therefore, in this study, we evaluated the in vitro activities of PNT against 10 clinical isolates of *Fusarium* spp. in different culture media and various oxygen conditions and against the two developmental programs of these opportunistic mold species.

MATERIALS AND METHODS

***Fusarium* isolates.** We obtained 10 clinical isolates of *Fusarium* spp. from the Mycology Laboratory at The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center for testing: five isolates of the *F. solani* complex and five non-*F. solani* isolates (*F.*

* Corresponding author. Mailing address: Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, Unit 402, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd., Houston, TX 77030. Phone: (713) 792-6237. Fax: (713) 745-6839. E-mail: dkontoyi@mdanderson.org.

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

TABLE 1. Susceptibilities of 10 clinical isolates of *Fusarium* spp. to antifungal agents in RPMI medium (NCCLS microdilution method M-38P)

Agent	*F. solani* isolates (n = 5)				Non-*F. solani* isolates (n = 5)			
	MIC_{50}	MIC_{90}	MFC_{50}	MFC_{90}	MIC_{50}	MIC_{90}	MFC_{50}	MFC_{90}
AMB	2[a]	4	2	4	2	4	2	4
5FC	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
FLC	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
ITC	>16	>16	>16	>16	8	8	>16	>16
VRC	4[b]	8	>16[c]	>16	1[b]	1	8[c]	8
CAS	32	>32	>32	>32	32	>32	>32	>32

[a] Units are micrograms per milliliter throughout.
[b] $P = 0.09$ (not significant) for VRC MICs against *F. solani* isolates versus those for non-*F. solani Fusarium* isolates.
[c] $P < 0.05$ for VRC MFCs against *F. solani* isolates versus those for non-*solani Fusarium* isolates.

oxysporum, *F. proliferatum*, and *F. pallidoroseum*). Molecular identification of all of the isolates tested was conducted using amplification and sequencing of translation elongation factor 1 alpha sequences (23). *Candida tropicalis* strain ATCC 2697 was used for quality control purposes in all of the experiments.

Susceptibility testing. We evaluated the in vitro activities of PNT and a variety of antifungal agents against the 10 *Fusarium* isolates by performing a broth microdilution method according to NCCLS guidelines (M38-P) (22). In addition to PNT, the drugs used were AMB, 5-flucytosine (5FC), fluconazole (FLC), itraconazole (ITZ), VRC, and caspofungin (CAS). FLC and VRC were obtained from Pfizer Inc. (New York, N.Y.), while ITZ was obtained from Janssen Pharmaceutica (Titusville, N.J.). All of the antifungal agents were obtained in assay powder form. Drug dilutions were prepared in 100% dimethyl sulfoxide (for AMB and ITZ) or distilled water (for all other agents) followed by further dilutions (1:50) in the NCCLS standard RPMI 1640 medium to yield twice the final strength required for testing. The RPMI 1640 medium was prepared according to the manufacturer's (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) instructions. RPMI medium with L-glutamine but without bicarbonate was buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid. To test the in vitro activity of PNT, the NCCLS method was performed using two other media in addition to RPMI medium: RPMI medium plus 2% glucose (RPMI-2) and a yeast nitrogen base (YNB) medium (Difco, Detroit, Mich.). The final concentrations of the tested drugs ranged from 0.03 to 16.00 μg/ml for AMB, ITZ, and VRC; 0.125 to 64.00 μg/ml for 5FC and FLC; 0.06 to 32.00 μg/ml for CAS; and 0.125 to 128.00 μg/ml for PNT. The tests were performed in 96-well flat-bottom microtitration plates (Corning Inc., Corning, N.Y.) that were kept frozen at −70°C until the day of the experiment.

Stock inoculum suspensions were prepared from 7-day-old cultures grown on potato dextrose agar slants as described in the NCCLS M38-P document and adjusted spectrophotometrically to optical densities (ODs) ranging from 0.09 to 0.30 (60 to 82% transmittance). On the day of the experiment, each microdilution well containing 100 μl of the twice-diluted drug concentrations was inoculated with 100 μl of the twice-diluted conidial suspensions, producing a final volume in each well of 200 μl. The concentrations of final inocula ranged from 0.4×10^4 to 5.0×10^4 CFU/ml.

Following agitation, microtitration plates were incubated at 35°C for 48 h, and the MICs of the antifungal agents were estimated. The MIC was defined as the lowest drug concentration at which there was complete absence (for AMB) or prominent reduction of growth (corresponding to approximately 50% growth reduction for the azoles, 5FC, and CAS). Because the MIC endpoints of PNT have not yet been established in fungi, we evaluated both the MIC-2 and MIC-0 endpoints. The former was defined as the lowest drug concentration that caused visually prominent inhibition of growth (approximately >50%), whereas the latter was defined as the lowest drug concentration that caused complete visual growth inhibition (>95%). All of the isolates were tested in triplicate on three different days. When discordant MICs were found, the higher values were reported.

The minimum fungicidal concentration (MFC) of each agent was determined using a recently proposed methodology (11). Briefly, 20 μl of the suspensions from each well that showed complete inhibition of growth was streaked on YNB plates with 2% glucose and 2% agar prepared according to the manufacturer's instructions. The YNB plates were then incubated at 35°C for 48 to 72 h. The MFC was defined as the lowest drug concentration at which fewer than three colonies were observed, which corresponds to a killing activity of approximately 99.0 to 99.5%.

XTT colorimetric assay. NCCLS microtitration plates were prepared as described above and incubated for 48 h at 35°C. The 2,3-bis{2-methoxy-4-*n*-5-[(sulfenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide} (XTT) solution was prepared as described elsewhere (19). Incubation was continued at 35°C for 2 h in the dark to allow for conversion of XTT to its formazan derivatives. After shaking, the ODs at 492 and 690 nm were measured by using a microplate spectrophotometer (Powerwave X; Bio-Tek Instruments, Winooski, Vt.). The color was then assessed spectrophotometrically based on the relative OD at 492 and 690 nm, the latter of which is a reference wavelength subtracted from 492 nm.

Staining of *Fusarium* isolates with CFDA and DiBAC. Staining with the fluorescent dyes CFDA [5,(6)-carboxyfluorescein diacetate] and DiBAC [bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol] was performed as described previously by Bowman et al. (8). Briefly, conidia from two representative *Fusarium* isolates—one each from the *F. solani* and the *F. oxysporum* complexes—were suspended in RPMI medium to obtain twice the desired final concentration of 0.4×10^4 to 5.0×10^4 conidia/ml. Aliquots of 100 μl each were inoculated in NCCLS microtitration plates and incubated at 35°C for 48 h to allow for conversion of the conidia to hyphae. At 48 h, 100-μl aliquots of the hyphae were mixed with 100-μl aliquots of PNT at various concentrations corresponding to the MIC-0 and eight times the MIC-0 of PNT for the tested *F. solani* isolate (32 and 256 μg/ml, respectively) and to the MFC and four times the MFC of PNT for the tested *F. oxysporum* isolate (8 and 32 μg/ml, respectively). After incubation at 35°C for 10 h, hyphae exposed to different PNT concentrations were mixed with the CFDA or DiBAC solution (8). As controls, *Fusarium* hyphae of the same isolates were also incubated for 10 h with AMB (4 μg/ml; equal to the MFC for the tested isolates) and 1.5% H_2O_2. Photomicrographs of the hyphae were taken using a triple-band fluorescent microscope (BX-51; Olympus, Melville, N.Y.) as described previously (8).

XTT-based time-kill assay. Special 96-well flat-bottom microtitration plates were prepared by inoculating PNT into all of their rows (final concentration

TABLE 2. MIC-2s, MIC-0s, and MFCs of PNT against 10 clinical isolates of *Fusarium* spp. in RPMI and YNB media (NCCLS microdilution method M-38P)

Fusarium sp. (no. of isolates)	RPMI medium			YNB medium		
	MIC_{50} (range, GM[a])		MFC_{50} (range, GM)	MIC_{50} (range, GM)		MFC_{50} (range, GM)
	MIC-2[b]	MIC-0[c]		MIC-2[b]	MIC-0[c]	
F. solani (5)	4[g] (2–4, 3.6)[d]	32 (8–32, 24)[e]	>128 (8–>128, 206.4)[e]	1 (1–2, 1.4)	8 (4–16, 10.4)	>128 (8–>128, 206.4)
Non-*F. solani* (5)	2 (1–2, 1.8)[d]	8 (4–8, 6.4)[e]	8 (4–16, 8.8)[f]	0.5 (0.5–1.0, 0.6)	1 (1–2, 1.2)	8 (4–8, 6.4)

[a] GM, geometric mean.
[b] $P < 0.001$ for MIC-2s of PNT against *Fusarium* spp. in RPMI medium versus those in YNB medium.
[c] $P < 0.05$ for MIC-0s of PNT against *Fusarium* spp. in RPMI medium versus those in YNB medium.
[d] $P < 0.05$ for MIC-2s of PNT against *F. solani* isolates versus those for non-*F. solani Fusarium* isolates.
[e] $P < 0.05$ for MIC-0s of PNT against *F. solani* isolates versus those for non-*F. solani Fusarium* isolates.
[f] $P < 0.001$ for MFCs of PNT against *F. solani* isolates versus those for non-*F. solani Fusarium* isolates.
[g] Units are micrograms per milliliter throughout.

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

TABLE 3. XTT-based pharmacodynamic analysis of PNT activities against two *Fusarium* spp. and two developmental programs in two culture media[a]

Medium	Species	Developmental program	PNT conc (μg/ml)	
			EC_{50}	EC_{90}
RPMI-2	*F. solani*	Conidial	3.9	29.7
		Hyphal	53.1	>128
	F. oxysporum	Conidial	1.6	5.8
		Hyphal	30.3	>128
YNB	*F. solani*	Conidial	1.4	8.6
		Hyphal	50.5	>128
	F. oxysporum	Conidial	0.5	1.57
		Hyphal	17.8	>128

[a] The pharmacodynamic analysis of PNT against conidia was based on three isolates each of *F. solani* and *F. oxysporum*, whereas that of PNT against hyphae was based on two isolates each of *F. solani* and *F. oxysporum.*

range, 0.125 to 128.00 μg/ml). We prepared conidial suspensions from three *F. solani* and three *F. oxysporum* isolates in RPMI-2 medium as described above (final concentration, 0.4×10^4 to 5.0×10^4/ml). At the beginning of each incubation, 100-μl aliquots of the conidial suspensions were added to each well of the plates, which were then incubated at 35°C. Subsequently, at regular time points following the addition of the conidial suspensions (in particular, at 4, 12, 24, 36, and 48 h), 50-μl aliquots of XTT solution that were prepared as described previously (19) were added to each well of single rows corresponding to each time point. The ODs at 492 and 690 nm were then measured in each individual row in which the XTT solution was added following a 2-h incubation in the dark. The color was assessed as described above. Using this method, we assessed the time-dependent conversion of *Fusarium* conidia to hyphae and the effects of PNT on the growth of *Fusarium* isolates. An analogous experiment was performed using YNB medium instead of RPMI-2. In a similar manner, we evaluated the inhibitory effect of PNT when introduced to already formed hyphae of two *F. solani* and two *F. oxysporum* isolates.

Activity of PNT against *Fusarium* isolates in a hypoxic chamber of in vitro growth. Microtitration plates were prepared as described above and placed in chambers along with BBL gas generator envelopes (CampyPak Plus and GasPak Plus for microaerophilic and anaerobic conditions, respectively; Becton Dickinson and Co., Sparks, Md.). We then estimated the MIC-2s, MIC-0s, and MFCs of PNT for the 10 *Fusarium* isolates under both microaerophilic and anaerobic conditions. We also determined the MICs and MFCs of AMB, 5FC, FLC, ITZ, VRC, and CAS against *Fusarium* under these hypoxic conditions.

Disk diffusion susceptibility testing. We prepared a stock solution of PNT (60 mg/ml in distilled water) and stored it at −70°C until use. Disk diffusion testing was performed on RPMI agar plates previously prepared using standardized methods. Two hundred microliters of a standardized suspension of *Fusarium* conidia (10^6 conidia/ml) of each isolate was plated. After the plates were allowed to dry, a sterile 1/4-inch-thick paper disk (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.) was placed on the agar surface and inoculated with 8.3 μl of PNT, producing a final PNT concentration in each plate of 20 μg/ml. Next, plates were placed in chambers containing envelopes that produced microaerophilic or anaerobic conditions as described above or were incubated in room air for 48 h at 35°C. The radius of the zone of inhibition was measured using a micrometer after 48 h. AMB was used as a control. Fifty microliters of a stock solution of AMB (5 mg/ml in dimethyl sulfoxide) was inoculated onto the paper disk, resulting in a final AMB concentration in each plate of 10 μg/ml. Three independent experiments were performed at different time points.

Statistical analysis. The MIC-2s and MIC-0s of PNT for the 10 *Fusarium* isolates in RPMI medium were compared with those in YNB medium. Additionally, the MIC-2s, MIC-0s, and MFCs of PNT and the MICs and MFCs of VRC for *F. solani* isolates were compared with those for non-*F. solani Fusarium* isolates. The Mann-Whitney two-tailed *t* test was used to assess significant differences in the corresponding MIC-2s, MIC-0s, and MFCs. In addition, the MIC-2s and MIC-0s (as well as the radius of the zone of growth inhibition) of PNT for the 10 *Fusarium* isolates under aerobic conditions were compared with those under microaerophilic and anaerobic conditions. Analysis of variance was used to assess differences in the corresponding MICs, and Kruskal-Wallis one-way analysis of variance with Dunn's test was used with the GraphPad Prism 3 software program to assess statistically significant differences (GraphPad Software, Inc., San Diego, Calif.).

The 50% (EC_{50}) and 90% (EC_{90}) effective concentrations of PNT were determined by fitting XTT time-kill data to a sigmoidal dose-response model by using the following four-parameter logistic equation:

$$y = EC_{min} + \frac{EC_{max} - EC_{min}}{1 + 10 \log^{(EC_{50} - x)Hill}}$$

where EC_{min} represents the lowest PNT concentration producing inhibitory

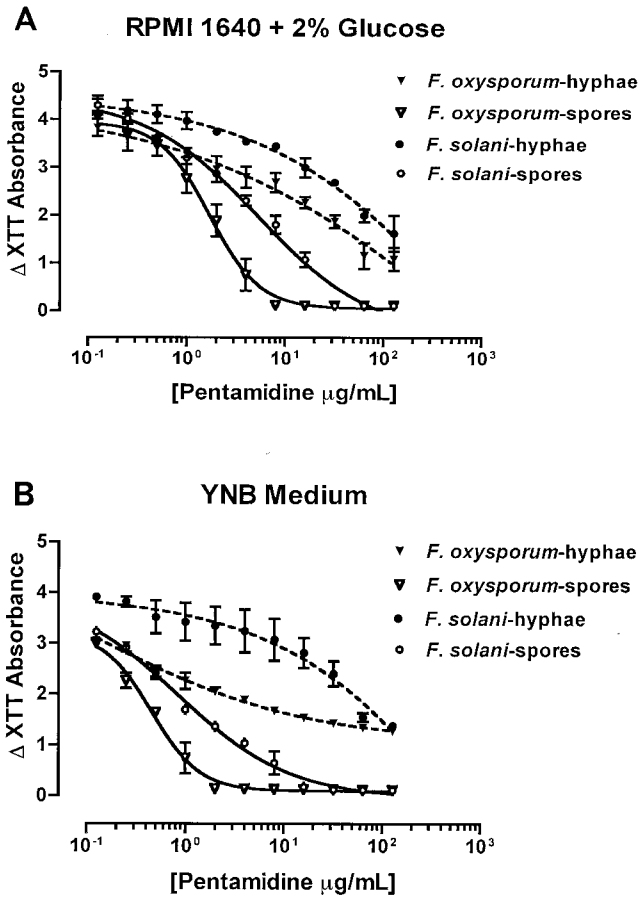


FIG. 1. XTT-based pharmacodynamic analysis of PNT activities against isolates of *F. solani* and *F. oxysporum*, the two developmental programs of growth of the fungi (conidia and hyphae), and two culture media (RPMI-2 and YNB). Graphs show reductions in XTT absorbance caused by PNT against *F. solani* and *F. oxysporum* conidia (three isolates each) and hyphae (two isolates each) in RPMI-2 medium (A) and YNB medium (B). Error bars show standard deviations, dashed lines represent fitted hyphal curves, and solid lines represent fitted conidial curves. The EC_{50}s and EC_{90}s were calculated using the four-parameter logistic equation. When starting with conidial inocula, PNT abrogated the conversion of conidia to hyphae in a dose-dependent fashion. Specifically, the germination of conidia to hyphal elements was completely inhibited at a concentration equal to the MIC-0 for the tested isolates. At a concentration approaching the MIC-2 for the tested isolates, PNT caused a nearly 50% reduction in XTT absorbance compared with the drug-free measured absorbance. When starting with hyphal inocula, PNT attenuated the increase in XTT absorbance compared with the drug-free absorbance in a dose-dependent fashion but it did not result in complete inhibition of hyphal growth in any of the isolates tested.

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

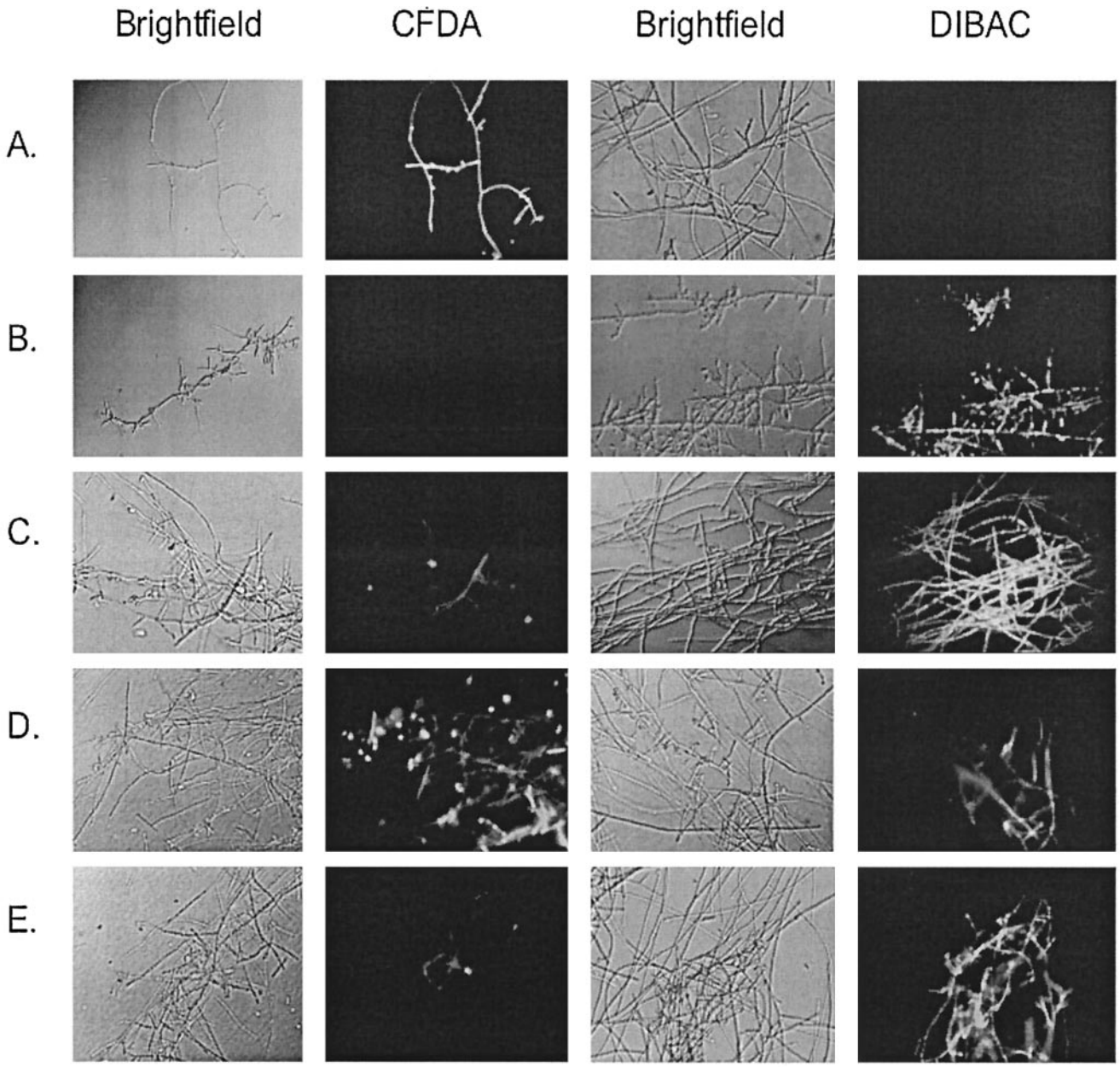


FIG. 2. CFDA and DiBAC staining of *F. oxysporum* hyphae (isolate no. 2) exposed to H_2O_2, AMB, and PNT. Shown are untreated hyphae (A), H_2O_2-treated hyphae (1.5%) (B), AMB-treated hyphae (MFC, 4 μg/ml) (C), PNT-treated hyphae (MFC, 8 μg/ml) (D), and PNT-treated hyphae (four times the MFC, 32 μg/ml) (E).

activity, EC_{max} represents the maximal PNT concentration that achieves maximal inhibitory activity, and Hill is the variable slope factor, or Hill coefficient of the dose-response curve.

RESULTS

Susceptibility of *Fusarium* spp. to antifungal agents and PNT. We found that AMB, VRC, and PNT were the only active agents against the *Fusarium* isolates, whereas 5FC, FLC, ITZ, and CAS had no activity. The MICs and MFCs of AMB, 5FC, FLC, ITZ, VRC, and CAS are listed in Table 1. Specifically, AMB had comparable fungicidal activities against the *solani* and non-*F. solani Fusarium* isolates. Also, VRC was fungicidal against the non-*F. solani Fusarium* isolates, whereas it was fungistatic against the *F. solani* isolates. In comparison, ITZ had very limited fungistatic activity against the non-*solani Fusarium* isolates. The MIC-2s, MIC-0s, and MFCs of PNT against *Fusarium* isolates in RPMI and YNB media are shown in Table 2. PNT showed activity against all 10 of the *Fusarium* isolates tested. However, the MICs of PNT against non-*F. solani Fusarium* isolates were lower than those against *F. solani* isolates ($P < 0.05$). In addition, based on the MFC/MIC ratios, PNT was fungicidal against all five non-*F. solani Fusarium* isolates and one *F. solani* isolate and was fungistatic against the remaining four *F. solani* isolates. The PNT MICs were identi-

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

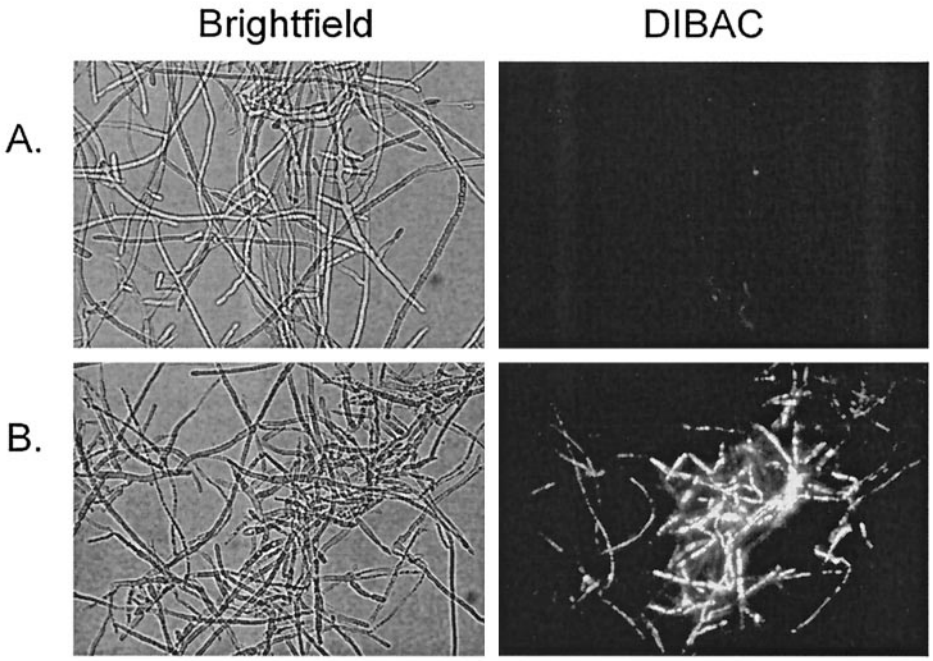


FIG. 3. DiBAC staining of *F. solani* hyphae (isolate no. 2) exposed to PNT. Shown are PNT-treated hyphae (MIC-0, 32 μg/ml) (A) and PNT-treated hyphae (eight times the MIC-0, 256 μg/ml) (B).

cal in the RPMI and RPMI-2 media (data for RPMI-2 medium not shown), whereas they were significantly lower in the YNB medium ($P < 0.001$). In contrast, the MFCs of PNT in the RPMI and YNB media did not differ significantly.

In agreement with the NCCLS results, use of the disk diffusion method showed that the radii of the zones of growth inhibition of *F. solani* isolates caused by PNT were smaller than those of non-*F. solani Fusarium* isolates. The mean radii for the *F. solani* and non-*F. solani* isolates were 5.867 mm (standard deviation [SD], ±2.694 mm) and 14.660 mm (SD, ±1.65 mm), respectively ($P < 0.05$).

Comparison of the visual and spectrophotometric readings of the NCCLS method for *Fusarium* spp. The MIC-2 and MIC-0 endpoints of PNT as measured spectrophotometrically using the XTT colorimetric assay were comparable to the respective MICs estimated visually using the NCCLS method. More specifically, by using the MIC-2 endpoint, in 8 of the 10 *Fusarium* isolates the visual and spectrophotometric MIC-2s were identical, while in 2 isolates the values differed for one drug dilution. By using the MIC-0 endpoint, 9 of the 10 isolates had identical visual and spectrophotometric MIC-0s, whereas in 1 isolate those values differed for one drug dilution. Furthermore, in 9 of the 10 isolates tested, the MICs of AMB were identical when assessed both visually and spectrophotometrically.

XTT-based pharmacodynamic analysis of PNT activity. We generated dose-response curves of PNT and calculated the effective PNT concentrations that caused 50% (EC_{50}) and 90% (EC_{90}) reductions in XTT absorbance compared with drug-free XTT absorbance at 48 h after the addition of PNT. The EC_{50}s and EC_{90}s of PNT against the two developmental programs of growth of *F. solani* and *F. oxysporum* in two culture media are summarized in Table 3. Again, PNT showed preferential activity against the conidial development program of *Fusarium* spp. compared with the hyphal development program (Fig. 1). Also, in agreement with the MIC and MFC

TABLE 4. MIC-2s and MIC-0s of PNT against 10 clinical isolates of *Fusarium* spp. under different oxygen conditions in RPMI medium (NCCLS microdilution method M-38P)

Fusarium sp. (no. of isolates)	MIC_{50}[e] (range, GM[a])					
	Aerobic conditions		Microaerophilic conditions		Anaerobic conditions	
	MIC-2[b,c]	MIC-0[d]	MIC-2[b]	MIC-0	MIC-2[c]	MIC-0[d]
F. solani (5)	4 (2–4, 3.6)	32 (8–32, 24)	2 (1–2, 1.8)	16 (8–16, 12.8)	1 (1–2, 1.2)	8 (4–16, 8.8)
Non-*F. solani* (5)	2 (1–2, 1.8)	8 (4–8, 6.4)	0.5 (0.5–1, 0.6)	2 (1–2, 1.6)	0.250 (0.125–0.500, 0.220)	1.0 (0.5–1.0, 0.9)

[a] GM, geometric mean.
[b] $P < 0.05$ for MIC-2s of PNT against *Fusarium* spp. under aerobic conditions versus those under microaerophilic conditions.
[c] $P < 0.001$ for MIC-2s of PNT against *Fusarium* spp. under aerobic conditions versus those under anaerobic conditions.
[d] $P < 0.05$ for MIC-0s of PNT against *Fusarium* spp. under aerobic conditions versus those under anaerobic conditions.
[e] Units are micrograms per milliliter throughout.

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

TABLE 5. Disk diffusion susceptibility testing of PNT activities against *Fusarium* spp. under different oxygen conditions

Fusarium sp. (no. of isolates)	GM[a] ± SD of the radii (mm) of the zones of inhibition caused by PNT[b]		
	Aerobic conditions	Microaerophilic conditions	Anaerobic conditions
All *Fusarium* spp. (10)	10.267 ± 3.829[c]	17.283 ± 3.695	20.783 ± 5.168[c]
F. solani (5)	5.867 ± 2.694[d,e]	13.2 ± 3.532	16.6 ± 3.227[e]
Non-*F. solani* (5)	14.66 ± 1.65[d,f]	21.367 ± 2.162	24.967 ± 2.434[f]

[a] GM, geometric mean.
[b] Each disk contained 8.3 μl of PNT (from a stock solution of 60 mg/ml).
[c] $P < 0.05$ for the radii of the zones of growth inhibition caused by PNT against all *Fusarium* spp. tested under aerobic conditions versus those under anaerobic conditions.
[d] $P < 0.05$ for the radii of the zones of growth inhibition caused by PNT against *F. solani* isolates versus non-*F. solani Fusarium* isolates in room air.
[e] $P < 0.05$ for the radii of the zones of growth inhibition caused by PNT against *F. solani* isolates under aerobic conditions versus those under anaerobic conditions.
[f] $P < 0.05$ for the radii of the zones of growth inhibition caused by PNT against non-*F. solani Fusarium* isolates under aerobic conditions versus those under anaerobic conditions.

results, the EC_{50}s and EC_{90}s of PNT were lower against *F. oxysporum* than against *F. solani* and were lower in YNB medium than in RPMI-2 medium.

CFDA and DiBAC staining. After staining with CFDA and DiBAC, we found that PNT killed apical and subapical compartments of viable *F. oxysporum* hyphae at a concentration equal to the MFC against the *F. oxysporum* isolate used. This fungicidal activity was more pronounced when hyphae were exposed to higher PNT concentrations. Figure 2D and E show the CFDA and DiBAC staining in a *F. oxysporum* isolate after challenge with PNT (at a concentration equal to the MFC and four times the MFC, respectively). Interestingly, AMB did not kill all of the hyphal elements at a concentration equal to the MFC (Fig. 2C). In the *F. solani* isolate tested, PNT had no fungicidal effects when added at the MIC-0; however, at a much higher concentration (equal to eight times the MIC-0 against that isolate), compartments of dead hyphae were seen (Fig. 3).

Activity of PNT under hypoxic conditions. The MIC-2s and MIC-0s of PNT were lower under microaerophilic and anaerobic conditions than under normal oxygen concentrations (Table 4). The MFCs of PNT against all of the *Fusarium* isolates did not differ from those estimated under normal oxygen conditions. In contrast, the low-oxygen environment did not affect the MICs and MFCs of AMB, FLC, 5FC, ITZ, VRC, and CAS. By using the disk diffusion method, we found that the radius of the zone of growth inhibition caused by PNT was larger under microaerophilic and anaerobic conditions than under normal oxygen levels ($P < 0.05$) (Table 5) (Fig. 4). In contrast, the zone of growth inhibition caused by AMB was not affected by the different oxygen conditions, as the geometric means of the radii of the zones in a normal oxygen environment and under microaerophilic and anaerobic conditions were 1.83, 1.73, and 1.92 mm, respectively (*P* value was not significant).

DISCUSSION

We investigated the in vitro activities of PNT against 10 clinical isolates of *Fusarium* spp. and against the different developmental programs of the fungus by using independent susceptibility methods, different media, and various environmental conditions. The susceptibilities of *Fusarium* isolates to the other antifungals tested were in agreement with those reported in previous studies (4, 13, 25). Specifically, AMB and VRC were the only other active agents. However, the MIC_{50}s and MFC_{50}s of AMB were higher than the previously reported tissue concentration of AMB in the lungs (0.5 μg/ml) when conventional intravenous AMB doses (1.0 to 1.5 mg/kg of body weight/day) were used (15). Furthermore, the activity of VRC was variable and depended on the *Fusarium* species tested. Although VRC was fungicidal against the non-*F. solani Fusarium* isolates, it had moderate fungistatic effects against the *F. solani* isolates. As previously reported, CAS, FLC, and ITZ had no activity against the *Fusarium* isolates that were tested (4, 13, 25).

Here, we demonstrate that PNT has notable in vitro activity against *Fusarium* spp. PNT had higher activity and was fungicidal against the non-*F. solani Fusarium* isolates, while it had fungistatic effects against the majority of the *F. solani* isolates. Several studies have shown that *F. solani* is, in general, more resistant to antifungals than are non-*F. solani Fusarium* spp. (4, 13, 25, 27). In our study, this higher resistance of *F. solani* isolates versus non-*F. solani* isolates against PNT was also observed with the newer triazoles ITZ and VRC.

In addition, the activity of PNT was not medium dependent, as it was seen in all culture media tested. Nevertheless, PNT had significantly enhanced activities against all of the isolates in YNB medium. A similar discrepancy in the efficacies of several drugs (including PNT) in the rich YNB medium was described previously (2). It has been postulated that the YNB medium facilitates fungal growth, with resultant higher levels of metabolic activity and better drug penetration into the intracellular site of action (18). In fact, Meletiadis et al. (18) showed poorer growth of *Aspergillus* and *Zygomycetes* isolates in RPMI and RPMI-2 media than in YNB medium. Nonetheless, we were not able to account for the enhanced activity of PNT against *Fusarium* spp. in YNB medium based on the aforementioned hypothesis. We found that *Fusarium* growth was poorer in YNB medium (data not shown), an observation previously described for *S. prolificans* (18).

The fungicidal activities of PNT against the non-*F. solani Fusarium* isolates were further confirmed microscopically via staining of a PNT-treated *F. oxysporum* isolate with the fluorescent dyes CFDA and DiBAC, which have been successfully used to evaluate the fungicidal effects of AMB and CAS against *C. albicans* and *Aspergillus fumigatus* (8, 16). In the present study, we found microscopically that administration of PNT appeared to result in the death of parts of viable *F. oxysporum* hyphae at a PNT concentration equal to the MFC

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

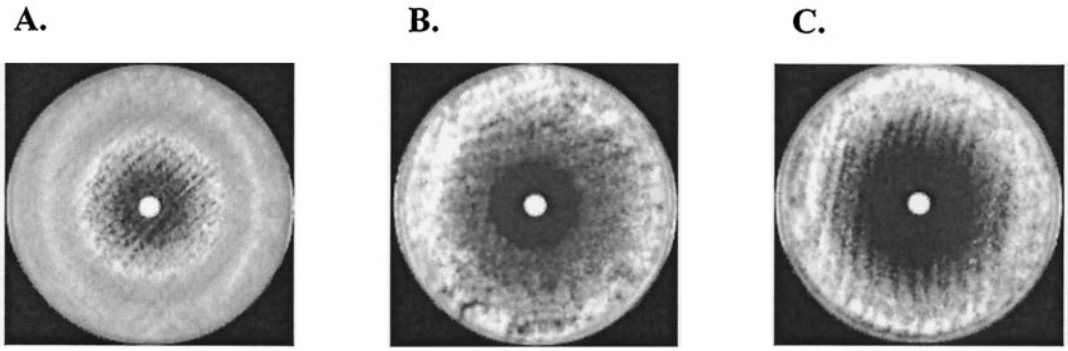


FIG. 4. Effects of PNT against an *F. solani* isolate (isolate no. 2) under different oxygen conditions, i.e., natural oxygen conditions (A), microaerophilic conditions (B), and anaerobic conditions (C), as seen in disk diffusion susceptibility testing (each disk contained 8.3 μl of PNT from a 60-mg/ml stock solution).

of the isolate used. Interestingly, PNT had similar effects against *F. solani*, although at much higher concentrations.

The limited number of pharmacokinetic studies using tissue samples obtained from PNT-treated humans upon autopsy have shown high concentrations of PNT in tissues when the drug is administered at a conventional therapeutic dose (4 mg/kg/day intravenously) (6). Blood PNT concentrations have been reported to range from 0.5 to 3.2 μg/ml (6). However, much higher levels are typically seen in tissues, with concentrations of up to 56 μg/g in the lungs, 123 μg/g in the kidneys, 300 μg/g in the liver, and 368 μg/g in the spleen (6). When compared with these reported tissue concentrations of PNT, the MIC_{50}s, MIC_{90}s, and MFC_{50}s of PNT in our study are much lower.

By using XTT colorimetric assay, we demonstrated preferentially increased activity of PNT against the conidial versus the hyphal developmental state of the fungus. This observation is consistent with the results of several studies showing that the hyphal forms of filamentous fungi are inherently more resistant to antifungal agents than are the conidial forms (12, 14). Guarro et al. (12) showed that the MICs and MFCs of AMB, 5FC, FLC, miconazole, ketoconazole, and ITZ against *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, and *Cladophialophora* species were significantly (2- to 512-fold) higher when these antifungals were tested against already formed hyphae than when the antifungals were tested against the conidial forms of these molds. Similar results have been observed for *Aspergillus* species (14).

We found that the EC_{50}s and EC_{90}s of PNT against the conidial forms of *Fusarium* spp. were significantly lower than the PNT concentrations that can be achieved in tissues (6). The respective PNT values against the hyphal forms of the *Fusarium* spp. were appreciably higher, yet the EC_{50}s were again lower than the achievable PNT concentrations. Conidial colonization is the first step in the pathogenesis of invasive fusariosis. In immunocompetent hosts, conidia are inhaled into the lungs in large numbers and are efficiently phagocytosed there by the resident macrophages (9). However, in immunocompromised patients with defects in macrophage function, some conidia escape phagocytosis, germinate to hyphae, and establish an invasive infection in the setting of prolonged neutropenia (9). Thus, our findings imply that PNT could be more promising for prophylaxis against *Fusarium* infections.

Even though PNT has been used clinically for more than 2 decades, the mechanisms of its action have not been definitively established. Several mechanisms have been proposed, such as inhibition of DNA, RNA, phospholipid, and protein synthesis (26). Interestingly, we found that PNT was more effective against *Fusarium* spp. under low-oxygen conditions, as shown using two independent methods: the NCCLS microdilution method and disk diffusion susceptibility testing. Even though this difference may reflect less vigorous growth of the fungus in an environment of low-oxygen tension, these data may indicate that PNT actually has preferentially greater efficacy against *Fusarium* spp. under such oxygen conditions, as the hypoxic environment did not alter the activities of the other antifungals tested. Whether this observation reflects the conversion of PNT to an active prodrug in the setting of low-oxygen tension in a mechanism reminiscent of the activity of metronidazole against bacteria (10) remains to be determined. However, these results have promise for further in vivo testing of PNT against fusariosis. Like *Aspergillus*, *Fusarium* is an angiotropic mold that invades vessels, resulting in tissue infarcts, low tissue perfusion, and suboptimal efficacy of antifungals (P. J. Patterson, E. M. Johnson, S. Ainscough, H. G. Prentice, M. Potter, and C. C. Kibbler, Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. M-1328, 2000). Given the establishment of a semianaerobic environment as a result of invasive fusariosis, this in vitro enhanced activity of PNT under hypoxic conditions may be of clinical importance.

In conclusion, this report is the first description of the in vitro activities of PNT against a variety of pathogenic *Fusarium* spp. Our findings suggest that the role of PNT in the treatment of *Fusarium* infections should be explored further. More studies using appropriate animal models and possibly clinical studies will be needed to elucidate the potential of this drug for prophylaxis or treatment of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. Such studies are currently under way in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Kerry O'Donnell (U.S. Department of Agriculture) for his help in the molecular identification of the *Fusarium* isolates tested in this study.

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

REFERENCES

1. **Afeltra, J., E. Dannaoui, J. F. Meis, J. L. Rodriguez-Tudela, and P. E. Verweij.** 2002. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**3323–3326.
2. **Afeltra, J., J. F. Meis, R. G. Vitale, J. W. Mouton, P. E. Verweij, and the Eurofung Network.** 2002. In vitro activities of pentamidine, pyrimethamine, trimethoprim, and sulfonamides against *Aspergillus* species. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**2029–2031.
3. **Anaissie, E. J., R. Hachem, C. Legrand, P. Legenne, P. Nelson, and G. P. Bodey.** 1992. Lack of activity of amphotericin B in systemic murine fusarial infection. J. Infect. Dis. **165:**1155–1157.
4. **Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, S. Nangia, and J. H. Rex.** 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. J. Clin. Microbiol. **37:**3946–3951.
5. **Barchiesi, F., M. Del Poeta, V. Morbiducci, F. Ancarani, and G. Scalise.** 1994. Effect of pentamidine on the growth of *Cryptococcus neoformans*. J. Antimicrob. Chemother. **33:**1229–1232.
6. **Bernard, E. M., H. J. Donnelly, M. P. Maher, and D. Armstrong.** 1985. Use of a new bioassay to study pentamidine pharmacokinetics. J. Infect. Dis. **152:**750–754.
7. **Boutati, E. I., and E. J. Anaissie.** 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. Blood **90:**999–1008.
8. **Bowman, J. C., P. S. Hicks, M. B. Kurtz, H. Rosen, D. M. Schmatz, P. A. Liberator, and C. M. Douglas.** 2002. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**3001–3012.
9. **Clemons, K. V., V. L. Calich, E. Burger, S. G. Filler, M. Grazziutti, J. Murphy, E. Roilides, A. Campa, M. R. Dias, J. E. Edwards, Jr., Y. Fu, G. Fernandes-Bordignon, A. Ibrahim, H. Katsifa, C. G. Lamaignere, L. H. Meloni-Bruneri, J. Rex, C. A. Savary, and C. Xidieh.** 2000. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. Med. Mycol. **38:**99–111.
10. **Edwards, D. I.** 1979. Mechanism of antimicrobial action of metronidazole. J. Antimicrob. Chemother. **5:**499–502.
11. **Espinel-Ingroff, A., A. Fothergill, J. Peter, M. G. Rinaldi, and T. J. Walsh.** 2002. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. J. Clin. Microbiol. **40:**3204–3208.
12. **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.
13. **Guarro, J., I. Pujol, and E. Mayayo.** 1999. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**1256–1257.
14. **Koenig, H., and M. Kremer.** 1979. A propos des discordances observees dans les resultants des CMI faites sur spores ou filaments d'*Aspergillus*. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. **8:**237–242.
15. **Koizumi, T., K. Kubo, T. Kaneki, M. Hanaoka, T. Hayano, T. Miyahara, K. Okada, K. Fujimoto, H. Yamamoto, T. Kobayashi, and M. Sekiguchi.** 1998. Pharmacokinetic evaluation of amphotericin B in lung tissue: lung lymph distribution after intravenous injection and airspace distribution after aerosolization and inhalation of amphotericin B. Antimicrob. Agents Chemother. **42:**1597–1600.
16. **Liao, R. S., R. P. Rennie, and J. A. Talbot.** 1999. Assessment of the effect of amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**1034–1041.
17. **Mayayo, E., I. Pujol, and J. Guarro.** 1999. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. J. Med. Microbiol. **48:**363–366.
18. **Meletiadis, J., J. F. Meis, J. W. Mouton, and P. E. Verweij.** 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. J. Clin. Microbiol. **39:**478–484.
19. **Meletiadis, J., J. W. Mouton, J. F. Meis, B. A. Bouman, J. P. Donnelly, P. E. Verweij, and the Eurofung Network.** 2001. Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. J. Clin. Microbiol. **39:**3402–3408.
20. **Miletti, K. E., and M. J. Leibowitz.** 2000. Pentamidine inhibition of group I intron splicing in *Candida albicans* correlates with growth inhibition. Antimicrob. Agents Chemother. **44:**958–966.
21. **Morris-Jones, S. D., and P. J. Easterbrook.** 1997. Current issues in the treatment and prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV infection. J. Antimicrob. Chemother. **40:**315–318.
22. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
23. **O'Donnell, K., H. C. Kistler, E. Cigelnik, and R. C. Ploetz.** 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95:**2044–2049.
24. **Paphitou, N. I., L. Ostrosky-Zeichner, V. L. Paetznick, J. R. Rodriguez, E. Chen, and J. H. Rex.** 2002. In vitro activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**3298–3300.
25. **Pujol, I., J. Guarro, J. Gene, and J. Sala.** 1997. In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. J. Antimicrob. Chemother. **39:**163–167.
26. **Sands, M., M. A. Kron, and R. B. Brown.** 1985. Pentamidine: a review. Rev. Infect. Dis. **7:**625–634.
27. **Torres, H. A., and D. P. Kontoyiannis.** 2003. Hyalohyphomycoses, p. 252–270. *In* W. E. Dismukes, P. G. Pappas, and J. D. Sobel (ed.), Oxford textbook of clinical mycology. Oxford University Press, New York, N.Y.
28. **Walsh, T. J., and A. H. Groll.** 1999. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infect. Dis. **1:**247–261.

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

Fusarium Infections in Critically Ill Patients

Michail S. Lionakis, M.D.[1] and Dimitrios P. Kontoyiannis, M.D., Sc.D., F.A.C.P.[1]

ABSTRACT

Invasive mold infections (IMIs) are significant causes of infectious mortality in immunocompromised patients, such as those with hematologic malignancies and allogeneic bone marrow transplant recipients. Of the IMIs, invasive aspergillosis is by far the most common. Nevertheless, over the past decade, other filamentous molds, such as *Fusarium* species, have been increasingly reported as the cause of severe IMIs in these patient populations. Herein we critically review the epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnostic methods, and therapeutic approaches for invasive fusariosis in immunocompromised hosts. We also present the key characteristics and differentiating features of invasive fusariosis and invasive aspergillosis. Current therapeutic approaches for fusariosis are suboptimal, resulting in exceedingly high mortality rates. At present, prompt diagnosis along with rapid initiation of appropriate treatment and, more importantly, reconstitution of the host immune responses are critical for a favorable outcome of this devastating opportunistic mycosis.

KEYWORDS: *Fusarium*, invasive fusariosis, pneumonia, immunocompromised host, leukemia

Objectives: Upon completion of this article, the reader should be able to: (1) summarize the major risk factors for, clinical manifestations of, and diagnostic tools and treatment modalities used for invasive fusariosis; and (2) describe the predominant differentiating features of invasive fusariosis and invasive aspergillosis.

Accreditation: The University of Michigan is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education to sponsor continuing medical education for physicians.

Credits: The University of Michigan designates this educational activity for a maximum of 1 category 1 credit toward the AMA Physician's Recognition Award.

Even though filamentous molds are ubiquitous in the environment, only over the past 2 decades have such saprophytic fungi emerged as a major threat in patients with compromised host defenses, such as those with hematologic malignancies and bone marrow transplant (BMT) recipients.[1–3] *Aspergillus* is by far the most common mold causing severe infections. However, other fungi, such as *Fusarium* species, have been increasingly recognized as lethal pathogens in these patients.[1,2,4–9] This shift is multifactorial yet not surprising because it reflects the use of new, highly immunosuppressive chemotherapeutic regimens and the broad use of antifungal agents as either or both prophylactic and empiric therapy, resulting in selection of more resistant fungi.[1–9] In this article, we critically review the epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic tools, and therapeutic options for invasive fusariosis with a focus on the major characteristics that differentiate between invasive fusariosis and invasive aspergillosis (IA).

Pulmonary Fungal Infections; Editor in Chief, Joseph P. Lynch, III, M.D.; Guest Editor, Carol A. Kauffman, M.D. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, volume 25, number 2, 2004. Address for correspondence and reprint requests: Dimitrios P. Kontoyiannis, M.D., Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, Unit 402, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd., Houston, TX 77030. E-mail: dkontoyi@mdanderson.org. [1]Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas. Copyright © 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel: +1(212) 584-4662. 1069-3424,p;2004,25,02,159,169,ftx,en;srm00287x.

EPIDEMIOLOGY

Fusarium spp. have long been recognized as soil saprophytes and plant and bacterial pathogens.[6,9–11] Among the 50 different species of the *Fusarium* genus, only a few have been reported to be pathogenic in humans: *Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Fusarium moniliforme, Fusarium verticilloides, Fusarium dimerum*, and *Fusarium proliferatum*.[5–8,10–12] Among these, *F. solani* causes half of the reported human invasive fusariosis cases. This is consistent with its higher virulence in a murine model of disseminated fusariosis.[13] The incidence of fusariosis in humans is not clear, however, because systematic reporting of this infection has not been performed. Since the description of the first case of disseminated fusariosis in a child with acute leukemia in 1973,[14] reports of this opportunistic mycosis have dramatically increased; in fact, invasive fusariosis has emerged in many tertiary-care cancer centers as the second most common invasive mold infection (IMI) in profoundly immunocompromised patients behind IA.[1,2,4–8,10–12,15–22]

There seems to be a distinct seasonal peak and geographic distribution of invasive fusariosis.[7,8] Specifically, the majority of the cases occur during the rainy summer season, when the dispersion of fusarial conidia in the air is more pronounced.[4,7,8] Moreover, the vast majority of fusariosis cases have been reported in the United States.[7,8] It remains unclear, however, whether this reflects a unique ecological niche for these molds or a reporting bias. Even within the United States, the epidemiologic distribution of invasive fusariosis is heterogeneous because most cases have been reported in certain oncology centers, such as ours.[4] Outside the United States, most of the cases of invasive fusariosis have been reported in the Mediterranean region (i.e., Italy and France) and Brazil.[7,8,22]

The skin and respiratory tract are the primary portals of entry for *Fusarium* infection.[4,7–9,19–26] For instance, the use of central venous catheters (CVCs) and continuous ambulatory peritoneal dialysis catheters has been associated with invasive fusariosis.[23,24] Moreover, patients with extensive burns are susceptible to colonization by *Fusarium* spp. and may develop an invasive soft tissue infection leading to subsequent disseminated fusariosis.[25] Localized skin and nail infections have also been associated with subsequent dissemination of *Fusarium* spp. when the patient becomes neutropenic during the course of immunosuppressive treatment.[26,27] Besides through the skin, the preponderant entry of *Fusarium* infection is via inhalation of *Fusarium* conidia from the environment.[4–9,10–12,15–18] Less frequently, the paranasal sinuses and gastrointestinal tract have been presumed to be portals of entry for fusariosis.[4,9] In addition, documented nosocomial *Fusarium* infections have been reported, such as postoperative endophthalmitis and osteomyelitis.[9,28] Hospital water distribution systems have recently been implicated as sources of nosocomial fusariosis.[29] However, another epidemiologic analysis did not confirm this assertion.[30] Hence, more rigorous studies are required to elucidate this controversy.

PATHOGENESIS OF INVASIVE FUSARIOSIS: PATIENT POPULATIONS AT RISK

As with *Aspergillus* species, there are two developmental programs of growth of *Fusarium* spp., conidia, and hyphae. In immunocompetent hosts, there are two lines of defense against inhaled *Fusarium* conidia.[31] First, the resident lung macrophages are responsible for phagocytosis and, primarily, nonoxidative killing of conidia.[31,32] Despite the efficiency of phagocytosis, some conidia ultimately escape, germinate to hyphae, and establish an invasive infection. Use of glucocorticoids predisposes patients to fusariosis mainly via impairment of the anticonidial macrophage function.[33] A recent multicenter study showed that the mortality rate for fusariosis was 70% in hematologic cancer patients receiving glucocorticoids compared with 33% in patients not receiving glucocorticoids.[34] Once an infection is established, neutrophils are chemotactically attracted to the hyphae on which they attach. *Fusarium* hyphae are subsequently destroyed extracellularly by the oxidative cytotoxic mechanisms of neutrophils.[31,32] Neutrophils probably play the most critical role in the control of human *Fusarium* infections.[4–8,10–12,15–22,34,35] Several studies have demonstrated that the prognosis for patients with fusariosis is clearly associated with prompt recovery of neutrophil counts. In fact, the mortality rate for fusariosis in the setting of profound, prolonged neutropenia is essentially 100%, even with aggressive antifungal treatment, whereas it has been reported to be as low as 30% when neutrophil counts are or promptly return to normal. Relapses following subsequent episodes of neutropenia have also been reported.[4]

More than 90% of human invasive fusariosis cases occur in neutropenic patients with hematologic malignancies, especially those with acute leukemia, in whom over 50% of all cases have been reported.[4,7–9,10–12,16–20] Moreover, allogeneic BMT recipients are at risk for fusariosis, especially in the early posttransplant period when engraftment is delayed and later in the setting of iatrogenic hypercortisolism for the treatment of acute or chronic graft-versus-host disease.[4,10–12,21] It has been estimated that the incidence of fusariosis in allogeneic and autologous BMT recipients is 1.2% and 0.2%, respectively.[4] However, host-specific differences in the manifestation of *Fusarium* infections do exist. For example, *Fusarium* infections in solid-organ transplant recipients tend to remain localized, occur late in the posttransplant period (>9 months), and have a

better outcome when compared with infections in allogeneic BMT recipients with graft-versus-host disease, which are characteristically disseminated and frequently fatal.[36,37] Also, patients with aplastic anemia, chronic granulomatous disease, or acquired immunodeficiency syndrome have a distinctly low incidence of fusariosis.[38–40]

Except for defective host immune responses, the pathogenesis of fusariosis may also be related to several virulence characteristics of the individual *Fusarium* strains. For example, *Fusarium* spp. are capable of producing several mycotoxins.[41–43] Nelson et al[9] reported that such toxins may cause leukopenia, thus potentially prolonging chemotherapy-induced bone marrow suppression.[42] Nonetheless, the molecular events that control the production of such toxins have yet to be determined, and there have been no studies examining whether such mycotoxins are specifically expressed in the setting of invasive disease. In addition, *F. solani* has been reported to produce cyclosporine, which is known to suppress T lymphocyte activation and interleukin-2 production, thus inhibiting critical components of the cellular immune response.[44]

Furthermore, like *Aspergillus* and *Zygomycetes* species, *Fusarium* spp. are angiotropic and angioinvasive molds that lead to hemorrhagic infarction, low tissue perfusion, and resultant tissue necrosis.[6,9,11] Whether the ability of *Fusarium* spp. to invade human tissues is associated with the production of cyclosporine, which has been shown to cause toxic effects on the human vasculature by impairing endothelium-dependent relaxation, remains to be determined.[45] The potential adhesive properties of *Fusarium* spp. may also contribute to the pathogenesis of fusariosis.[9,46] These molds can adhere to silastic catheters, and infections of CVCs, continuous ambulatory peritoneal dialysis catheters, and contact lenses have been reported.[9] Most of the evidence of these adhesive properties has been derived from animal models of *Fusarium* keratitis.[46] Specifically, the ability of *Fusarium* spp. to secrete proteinases with elastinolytic properties seems to play an important role in corneal ulceration. Also, the formation of hyphae-to-hyphae structures with thickened cell walls has been postulated to protect *Fusarium* spp. from the neutrophil insult.

CLINICAL PRESENTATION OF *FUSARIUM* INFECTIONS IN CRITICALLY ILL PATIENTS

The clinical manifestations of invasive fusariosis are often nonspecific, and the host status plays a crucial role in determining the severity, type, and chronicity of the infection.[2,4,5] In contrast with *Fusarium* infections in normal hosts, which are typically localized (e.g., skin and eye infections and osteomyelitis) and frequently do not require systemic therapy, fusariosis in profoundly immunocompromised patients manifests in four major patterns: refractory fever of unknown origin, sinopulmonary infection or pneumonia, disseminated infection, and a variety of focal single-organ infections.[2,5,9,10–12,15–23]

The usual initial presentation of invasive fusariosis is a fever that persists despite broad-spectrum antimicrobial coverage in a profoundly neutropenic patient.[4,5] Because *Fusarium* spp. are often resistant to antifungal agents, breakthrough infections are not uncommon despite the use of prophylactic or empiric therapy with amphotericin B (AMB) or triazoles.[4,5,47,48] Also, pneumonia is frequently observed.[7,8] A study at the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center revealed that more than 80% of the patients with invasive fusariosis had pulmonary involvement.[4] In the vast majority of those cases (80%), nonspecific infiltrates were noted; less frequently, either or both nodular and cavitary lesions were seen. Most pulmonary infiltrates are bilateral.[4] Respiratory symptoms such as cough (typically dry) and dyspnea are common, and hemoptysis may also occur. Furthermore, the presence of friction rib is indicative of subpleural IMI. Sinus involvement is also frequent, observed in up to 80% of cases in some reports.[4–8] The maxillary sinus seems to be the site involved most frequently, with the ethmoid sinuses being the second most common site.[4] Sinopulmonary fusariosis is most often clinically and radiographically indistinguishable from the much more common IA and other IMIs (Table 1).[4–9,10–12]

Fusarium sinusitis and pneumonia can disseminate in the setting of continuous, profound immunosuppression. Other less common presentations of invasive fusariosis in compromised hosts include focal single-organ infections, such as osteomyelitis, septic arthritis, myositis, foot abscesses, myocarditis, external otitis, peritonitis, brain abscesses, cystitis, meningoencephalitis, and chronic hepatic infection.[4–8,16–22]

LABORATORY DIAGNOSIS: DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF OTHER INVASIVE MOLD MYCOSES

One of the diagnostic challenges in immunocompromised patients with fungal pneumonia is differentiating between IA, invasive fusariosis, and zygomycosis. Zygomycosis is another emerging IMI that, in patients with hematologic malignancies, typically presents as sinopulmonary infection as opposed to the rhinocerebral form of the disease, which is encountered in patients with decompensated diabetes and ketoacidosis.[49] As described previously, the clinical and radiographic features of these IMIs are similar and nonspecific (Table 1).[3–5] Hence, it is almost impossible to establish a diagnosis on clinical grounds, and recovery of *Fusarium* spp. from

Table 1 Similar Characteristics and Major Differentiating Features of Invasive Aspergillosis and Invasive Fusariosis

Common Characteristics of Invasive Aspergillosis and Invasive Fusariosis	Differentiating Features of Invasive Aspergillosis and Invasive Fusariosis
Similar clinical presentation (fever despite use of broad-spectrum antibiotics, sinopulmonary infection).	Skin lesions are more common in disseminated fusariosis (50–70%) than in disseminated invasive aspergillosis (IA) (<10%).
Similar histopathology (angioinvasion, acute branching septate hyphae).	Skin lesions are different in fusariosis and IA (*Aspergillus* skin lesions are fewer, less widespread, have a larger diameter, and present with a black eschar with a thinner erythematous halo).
Similar radiographic presentation (subpleural nodular opacities, cavitation).	Fungemia is more common in fusariosis (60–70%) than in IA (<5%). Fungemia also often occurs earlier in fusariosis than in IA (shortly before death or after death).
Aspergillus and *Fusarium* molds are ubiquitous in the environment.	*Fusarium* spp. are highly resistant to antifungal agents.
High mortality rate (>70%).	Myalgias are more common in fusariosis.

cultures of appropriate specimens is essential for a definite diagnosis.[5]

Biopsy analysis of *Fusarium* lesions usually reveals extensive necrosis surrounding the fungal elements consisting of acute branching septate hyphae.[5,8,9,11] The histopathologic picture is identical with that caused by *Aspergillus* and *Pseudallescheria* species and may lead to misidentification.[5] Even so, Liu et al[50] reported that there are subtle differences in the histopathologic features of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. that can allow for differentiation between the two species based on the histopathology itself. Specifically, the hyphae of *Fusarium* spp. often exhibit variation in their diameter and typically manifest both 45 and 90 degree branching.[30] In comparison, *Aspergillus* spp. tend to form hyphae of a more consistent diameter and exhibit 90 degree branching much less frequently.[30] In contrast, the hyphae of *Zygomycetes* spp. are widely branching and nonseptate and tend to have a larger diameter; thus they can be easily discernible from hyphae of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. In fact, the lack of septation of *Zygomycetes* broad hyphae leads to the absence of internal support and characteristically results in collapse and folding in a ribbonlike appearance.[30] Molecular methods show promise in differentiating *Fusarium* and *Aspergillus* species from histopathologic specimens. In a recent study, Hayden et al[51] demonstrated that in situ hybridization directed against ribosomal ribonucleic acid sequences can be used to rapidly and accurately distinguish *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Pseudallescheria* spp. in tissue sections. Because the aforementioned molds have different levels of susceptibility to modern antifungals, the ability to differentiate these molds before culture results are available using in situ hybridization could have significant implications on therapeutic decision making.

However, obtaining an appropriate culture of the infected tissue remains the gold standard for differentiation between *Fusarium* and *Aspergillus* spp. Microscopically, a *Fusarium* colony begins as a white patch that quickly develops a pink, purple, or yellow center with a lighter periphery.[5,9] There are three types of *Fusarium* conidia found in cultures: microconidia, macroconidia, and chlamydospores. The presence of canoe-shaped macroconidia is a key feature in characterizing the *Fusarium* genus.[5] When such macroconidia are absent, identification of *Fusarium* spp. is often difficult because confusion with other uncommon saprophytic molds, including *Acremonium*, *Cylindrocarpon*, and *Verticillium* species, may occur.[5,9,50] Other important morphological features of *Fusarium* spp. are the presence of microconidia and chlamydospores and the morphology of the conidiophores bearing the microconidia.[5,9] The colony color, length, and shape of the macroconidia and number, shape, and arrangement of the microconidia are also helpful in differentiating between the various *Fusarium* spp.[9] Nonetheless, this differentiation is not always easy based on culture analysis because of the propensity of *Fusarium* spp. to change morphology rapidly.[2,9,22,47,50] Thus, a reference laboratory is often required for identifying *Fusarium* spp.

In addition to conventional isolation methods, molecular methods such as polymerase chain reaction have been used to improve diagnosis of fusariosis from clinical specimens such as blood or bronchoalveolar lavage.[52–54] Nonetheless, although polymerase chain reaction techniques have been proposed to have the potential to detect *Fusarium* spp. earlier, further studies are needed to define the sensitivity and specificity of such assays in detecting these species.

Despite the clinical similarities of fusariosis and IA, there are some characteristics that favor the diagnosis of invasive fusariosis (see Table 1). First, *Fusarium* spp. are usually recovered from blood specimens in the setting of disseminated disease.[4,5,55–57] The reported

rate of positive blood cultures in disseminated fusariosis is 50 to 70%, and fungemia may be the only manifestation of the infection. In fact, *Fusarium* spp. were identified as the most common molds associated with true fungemia in BMT recipients.[56] This feature contrasts with disseminated IA and zygomycosis cases, in which these molds are rarely isolated from blood specimens.[58] Specifically, less than 5% of cases of disseminated IA have positive blood cultures, and aspergillemia typically reflects contamination of the culture medium rather than a true infection.[58] Recovery of *Aspergillus terreus* from the blood is the notable exception because it frequently represents true fungemia.[58] Also of note is that *Fusarium*-positive blood cultures often become positive relatively early in the course of the disseminated disease as opposed to true *Aspergillus* fungemia, which manifests either shortly before death or postmortem.[4,55–58] This high frequency of *Fusarium*-positive blood cultures is presumed to be caused by the production of a large number of adventitious propagules in tissues by *Fusarium* spp.[4,5,9] This feature is common in yeasts but not in most of the pathogenic molds.[5] Exceptions to this rule are *Acremonium*, *Paecilomyces*, and *Scedosporium* species.[5,50] Others have suggested that toxins secreted by *Fusarium* spp. may lead to disruption of the vasculature and easier access of *Fusarium* conidia to the bloodstream.[10,41–43]

Another distinctive feature of invasive fusariosis is the high incidence (50–70%) of skin lesions in the setting of disseminated disease.[59,60] This contrasts with the low incidence of skin lesions in disseminated aspergillosis (<10%).[3,5,59,60] In fact, skin lesions are frequently the sole diagnostic material for invasive fusariosis.[59,60] Several patterns of skin lesions can be seen: subcutaneous nodules, palpable and nonpalpable purpura, red or gray macules, red or gray papules, macules or papules with progressive central necrosis, flaccid pustules, vesicles, and hemorrhagic bullae. The most characteristic skin lesions encountered in disseminated fusariosis are the "ecthyma gangrenosum-like" lesions, which are red or gray macules with central ulceration or black eschar (see Fig. 1).[4,5,59,60] *Fusarium* skin lesions are often tender, especially subcutaneous nodules, and can involve any skin site, although they appear predominantly in the extremities (see Fig. 1).[59,60] Most patients have lesions at different stages of evolution, and the number of lesions is highly variable.[59,60] Accompanying myalgia is also common, reflecting concomitant muscle involvement.[4,5]

Fusarium skin lesions are different from those encountered in disseminated IA (see Fig. 1). Specifically, *Aspergillus* skin lesions tend to be fewer in number, larger (2–3 cm versus 1 cm in diameter), and less widespread, and they usually consist of a black eschar with a thinner erythematous halo (see Fig. 1).[60] *Fusarium* skin lesions encountered in immunosuppressed patients are also different from those seen in immunocompetent hosts, in whom they are fewer in number and localized, typically follow skin breakdown (i.e., after trauma, insect bites, or onychomycosis), and exhibit diverse histopathologic

Figure 1 (A, B) Typical *Fusarium* skin lesions: note the small diameter of lesions (typically 1 cm), the presence of lesions at different stages of evolution, and the large number of lesions. Also note the characteristic ''ecthyma gangrenosum-like'' lesion, which is a red or gray macule with central ulceration or black eschar. [Patient in (B) also has petechial rash due to thrombocytopenia, which is unrelated to the *Fusarium* lesions.] (C) Typical *Aspergillus* skin lesion: note the greater diameter of this necrotic lesion compared with the *Fusarium* lesions. Also, note that *Aspergillus* skin lesions are fewer in number (often a single lesion), less widespread, and present as a black eschar with a thinner (compared with *Fusarium* lesions) erythematous halo. Note: *Fusarium* and *Aspergillus* skin lesions do not always manifest these characteristic patterns, and atypical presentations frequently occur.

features (marked inflammation and neutrophil infiltration with scant hyphal elements compared with the marked necrosis and vascular invasion, abundant hyphae, and paucity of neutrophil infiltration and inflammation seen in skin lesions in immunocompromised hosts).[59,60]

ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY — TREATMENT

Fusarium is one of the most resistant fungi to the arsenal of modern antifungal agents.[2,4–8,61–64] In particular, *F. solani* is the most resistant species within the genus.[61–64] The molecular mechanisms responsible for this high resistance have not been studied thus far.[65] Given the inherent resistance of *Fusarium* spp. to the current armamentarium of antifungal agents and the profound net state of immunosuppression in patients who typically develop fusariosis, the current therapeutic strategies for invasive fusariosis in heavily immunocompromised patients are problematic.[2,4,5,7–12] Also, in view of the rarity of fusariosis, most of the experience with it is derived from uncontrolled case series, the majority of which have been confounded by several critical factors, such as recovery of neutrophil count.[4,5,48] Thus management of fusariosis is not well defined and is highly individualized.[5,48] Table 2 summarizes the current controversies in the management of fusariosis.

The mainstay in the treatment of fusariosis has traditionally been AMB. However, the in vitro susceptibility of *Fusarium* spp. to AMB is, at best, mediocre.[2,4,61–64] Most studies have reported that the minimal inhibitory concentration of AMB against *Fusarium* spp. is greater than 1 μg/mL. Hence, such minimal inhibitory concentration values are higher than the reported tissue concentration of AMB in the lungs (0.5 μg/mL) when using conventional intravenous AMB doses (1.0–1.5 mg/kg/d).[66] It is unclear, though, whether the in vitro susceptibility of *Fusarium* spp. alone can predict outcome because other factors, such as neutrophil recovery, are probably the most critical determinants of the prognosis for fusariosis.[5,9,67]

The activity of AMB in animal models of fusariosis is also limited.[62,63] In fact, only high doses of liposomal AMB have been shown to be active against *Fusarium* spp. in animal models using immunocompetent mice.[68] Specifically, administration of liposomal AMB at 10 to 20 mg/kg/d resulted in a significantly reduced fungal burden in the spleen and liver of mice infected with *Fusarium verticilloides*. In contrast, AMB deoxycholate was not efficacious in other models of fusariosis.[62,63] However, due to a lack of other therapeutic options, high doses of AMB are currently used in clinical practice.[4,5,7,8] Following the introduction of lipid formulations of AMB, the use of high AMB doses is now feasible with less toxicity when compared with AMB deoxycholate, and there have been reports of better outcome of fusariosis using high-dose AMB regimens. Specifically, Walsh et al[69] reported that the mortality rate in patients to whom they administered high doses of AMB lipid complex (>5 mg/kg/d) was significantly lower (<30%) than that observed in patients receiving conventional AMB doses (>75%). Confounding factors that were not addressed in this cohort of patients, such as recovery of neutrophils, do not allow for firm conclusions regarding the true efficacy of AMB lipid complex, however. Also of concern is that recent pharmacodynamic studies have suggested that due to the fact that AMB is highly lipophilic and binds excessively to proteins, the maximum achievable free-drug concentration of AMB in tissues does not exceed 0.7 μg/mL, even with very high AMB dosing.[70,71] Hence, it is unclear whether greatly increasing the AMB dose translates to a respective increase in the free-drug concentration that can be achieved in tissues.[70]

Natamycin is also active against *Fusarium* spp. both in vitro and in vivo.[2,7,72,73] In fact, natamycin, along with AMB, has been the mainstay of treatment for *Fusarium* keratitis.[72,73] However, its toxicity precludes systemic use of it in clinical practice. Furthermore, nystatin, another polyene antifungal, has shown to be effective in halting the progression of fusariosis in

Table 2 Controversies in the Management of Fusariosis

Is there a role for voriconazole in initial therapy?
What is the role and the optimal dose of lipid formulations of amphotericin B (AMB) in primary therapy for fusariosis?
What is the most cost-effective lipid formulation of AMB for the management of fusariosis?
Is the dose intensity more important than the cumulative dose of AMB?
Will the new investigational triazoles (e.g., posaconazole) live up to their promise?
What is the future of combination therapy for fusariosis (AMB plus voriconazole, AMB plus caspofungin)?
Does speciation of *Fusarium* spp. hold prognostic significance?
What is the role of susceptibility testing for *Fusarium* spp.?
What is the role of immunomodulators in the management of fusariosis?
Is there effective prophylaxis for fusariosis?
What is the role of adjunctive surgery in the management of fusariosis?

pediatric patients with severe burns when used topically in powder form at a high concentration (6×10^6 U/g).[74]

Ketoconazole, miconazole, fluconazole, and itraconazole have no in vitro activity against *Fusarium* spp.[61,63] However, the newer broad-spectrum triazoles voriconazole (VRC), posaconazole, and ravuconazole have variable in vitro activity against *Fusarium* spp. and show promise for the management of fusariosis.[75–83] Among these new-generation triazoles, VRC, which was recently approved by the U.S. Food and Drug Administration for the treatment of refractory fusariosis, is the most active in vitro against *Fusarium* spp. Nonetheless, its activity is species dependent. Specifically, VRC is more active and is fungicidal against non-*solani Fusarium* spp., whereas its activity is fungistatic and less pronounced against *F. solani*. Thus, when compared with AMB, VRC does not have superior in vitro activity, especially against *F. solani*.[61,63,75–83] Besides its in vitro activity, VRC is also efficacious in animal models of fusariosis.[83] Furthermore, Perfect et al[84] reported that VRC resulted in a favorable response in five (45%) of 11 patients with fusariosis refractory to or intolerant of standard therapy. The 90-day Kaplan-Meier estimate of proportional survival of 0.71 in that study is also noteworthy because in our experience at the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center the 90-day survival was 29% in patients with fusariosis treated with AMB-based regimens.[35] Another advantage of using VRC in that study was the low incidence of adverse effects.[84] In addition, VRC was recently reported to be effective in an AMB-breakthrough case of disseminated fusariosis that occurred in a patient with leukemia in the setting of neutropenia.[85] Following completion of VRC treatment, no relapses of fusariosis were noted despite the subsequent reinstitution of induction chemotherapy cycles.[85]

Posaconazole, an investigational broad-spectrum triazole, is also active against *Fusarium* species both in vitro and in animal models.[80,82] The preliminary experience with posaconazole in our institution indicates that ~50% of patients with fusariosis refractory to or intolerant of standard treatment modalities responded to this triazole.[86] Other investigational azoles, such as CS-758 and UR-9825, are also variably active in vitro against *Fusarium*.[87,88] *Fusarium* spp. are inherently resistant to the echinocandins caspofungin (CAS), micafungin, and anidulafungin.[89–92] Nonetheless, CAS was recently reported to result in resolution of AMB-breakthrough *Fusarium* fungemia in a patient with acute leukemia.[93] *Fusarium* spp. are also resistant to nikkomycin Z, an inhibitor of chitin synthesis in the fungal cell wall.[94] In contrast, other agents have shown in vitro activity against *Fusarium* spp. For example, we recently demonstrated that pentamidine is fungicidal in vitro against non-*solani Fusarium* spp., whereas it has in vitro fungistatic effects against *F. solani*.[95] Terbinafine has also shown in vitro activity against some non-*solani Fusarium* spp.[96] Finally, selected aromatic dicationic compounds have also shown in vitro activity against *F. solani*.[97] Hence, further in vivo studies and clinical data are required to investigate the potential of the aforementioned investigational agents in the management of fusariosis.

In view of the inherent resistance of *Fusarium* spp. to most antifungal agents, AMB-based combination regimens have also been suggested or used for fusariosis. For example, use of 5-flucytosine (5-FC) has been proposed to result in an additive interaction with AMB.[98] Therefore, the combination of AMB deoxycholate at a dose of 1.5 mg/kg/d with 5-FC at a dose of 25 mg/kg given every 6 hours (adjusted to achieve a maximum serum level of <60 μg/mL) has occasionally been used. However, no controlled studies have shown a true benefit of using AMB with 5-FC versus AMB alone; actually, this combination has shown no activity in a murine model of disseminated fusariosis.[63] Moreover, the myelosuppressive properties of 5-FC are of concern.[98] Arikan et al[99] showed a modest in vitro additive interaction of AMB with CAS; however, no in vivo data have supported this concept. Combinations of AMB with rifampin and azithromycin are also synergistic in vitro.[100,101] However, the former combination has been unsuccessful in the treatment of fusariosis in clinical practice, whereas further in vivo data are required to explore the potential of the latter. Given that AMB and VRC are the most active agents against *Fusarium* spp., a strategy combining a lipid formulation of AMB with VRC should be explored further.

Because the neutrophil count seems to be the most crucial prognostic determinant in fusariosis cases, a potentially beneficial adjuvant therapeutic strategy is the use of recombinant granulocyte colony–stimulating growth factor and granulocyte-macrophage colony–stimulating factor and/or granulocyte transfusion from granulocyte colony–stimulating growth factor–stimulated donors and granulocyte-macrophage colony–stimulating factor–stimulated donors.[102,103] It has been suggested that granulocyte transfusion results in more favorable response rates (33–50%) in profoundly neutropenic patients by shortening the duration of neutropenia.[4,11] However, the presence of confounding factors such as achieving remission of the underlying malignancy, bone marrow recovery, and the extent of infection (localized versus disseminated fusariosis) may have led to overestimation of the impact of this intervention. Of note, it was recently shown that interferon-γ and interleukin-15 enhance the ability of neutrophils to cause hyphal damage against *F. solani* and *F. oxysporum,* suggesting a potential adjunct role for these cytokines in the management of fusariosis.[104,105]

Finally, in patients with hematologic malignancies, *Fusarium* onychomycosis should be treated

aggressively, including nail removal and systemic antifungal therapy.[25] Overall, surgical resection of infected necrotic tissue, such as abscesses, sinusitis, and soft tissue infections, is a significant component of therapy for fusariosis.[4,25,26,106] When a CVC-related *Fusarium* infection is suspected, prompt removal of the catheter should also be attempted to prevent further dissemination.[23,24]

In conclusion, taking into consideration the suboptimal efficacy of modern antifungals against *Fusarium* spp., a high index of suspicion is required for prompt diagnosis of fusariosis. Thus invasive fusariosis should be considered in febrile patients with hematologic malignancies and neutropenia who have any of the following characteristics: (a) a paronychia with or without onychomycosis, (b) a digital ulcer or eschar, and (c) widespread erythematous tender skin lesions with associated myalgia. In such cases, a thorough work-up should be done, including blood culture analysis, radiographic evaluation of the sinuses and lungs (using computed tomography), and skin biopsy for cultures, histopathologic examination, and fungal staining. Following establishment of the diagnosis, early initiation of aggressive treatment with high doses of AMB (with or without VRC) along with vigorous efforts to shorten the duration of neutropenia and taper immunosuppressive regimens should be attempted.

REFERENCES

1. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2002; 34:909–917
2. Anaissie EJ, Bodey GP, Rinaldi MG. Emerging fungal pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989;8:323–330
3. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:161–172
4. Boutati EI, Anaissie EJ. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. Blood 1997;90:999–1008
5. Torres HA, Kontoyiannis DP. Hyalohyphomycoses (other than Aspergillosis and Penicilliosis). In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, eds. Oxford Textbook of Clinical Mycology. 1st ed. New York: Oxford University Press; 2003: 252–270
6. Anaissie E, Kantarjian H, Ro J, et al. The emerging role of *Fusarium* infections in patients with cancer. Medicine (Baltimore) 1988;67:77–83
7. Girmenia C, Pagano L, Corvatta L, Mele L, del Favero A, Martino P. The epidemiology of fusariosis in patients with haematological diseases. Gimema Infection Programme. Br J Haematol 2000;111:272–276
8. Martino P, Gastaldi R, Raccah R, Girmenia C. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. J Infect 1994;28(suppl 1):7–15
9. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clin Microbiol Rev 1994;7:479–504
10. Pontón J, Ruchel R, Clemons KV, et al. Emerging pathogens. Med Mycol 2000;38(suppl 1):S225–S236
11. Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl Infect Dis 1999;1:247–261
12. Rabodonirina M, Piens MA, Monier MF, Gueho E, Fiere D, Mojon M. *Fusarium* infections in immunocompromised patients: case reports and literature review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:152–161
13. Mayayo E, Pujol I, Guarro J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. J Med Microbiol 1999;48:363–366
14. Cho CT, Vats TS, Lowman JT, Brandsberg JW, Tosh FE. *Fusarium solani* infection during treatment for acute leukemia. J Pediatr 1973;83:1028–1031
15. Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. Clin Microbiol Infect 2001;7(suppl 2): S8–S24
16. Richardson SE, Bannatyne RM, Summerbell RC, Milliken J, Gold R, Weitzman SS. Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host. Rev Infect Dis 1988;10: 1171–1181
17. Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. Clin Infect Dis 1992;14(suppl 1):S43–S53
18. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. Clin Infect Dis 1996;22(suppl 2):S112–S118
19. Costa AR, Valente NY, Criado PR, Pires MC, Vasconcellos C. Invasive hyalohyphomycosis due to *Fusarium solani* in a patient with acute lymphocytic leukemia. Int J Dermatol 2000;39:717–718
20. Freidank H. Hyalohyphomycoses due to *Fusarium* spp.: two case reports and review of the literature. Mycoses 1995;38:69–74
21. Minor RL Jr, Pfaller MA, Gingrich RD, Burns LJ. Disseminated *Fusarium* infections in patients following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1989;4: 653–658
22. Guarro J, Gene J. Opportunistic fusarial infections in humans. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:741–754
23. Musa MO, Al Eisa A, Halim M, et al. The spectrum of *Fusarium* infection in immunocompromised patients with haematological malignancies and in non-immunocompromised patients: a single institution experience over 10 years. Br J Haematol 2000;108:544–548
24. Raad II, Hachem R. Treatment of central venous catheter–related fungemia due to *Fusarium oxysporum*. Clin Infect Dis 1995;20:709–711
25. Wheeler MS, McGinnis MR, Schell WA, Walker DH. *Fusarium* infection in burned patients. Am J Clin Pathol 1981;75:304–311
26. Girmenia C, Arcese W, Micozzi A, Martino P, Bianco P, Morace G. Onychomycosis as a possible origin of disseminated *Fusarium solani* infection in a patient with severe aplastic anemia. Clin Infect Dis 1992;14:1167
27. Gupta AK, Baran R, Summerbell RC. *Fusarium* infections of the skin. Curr Opin Infect Dis 2000;13:121–128
28. Nuovo MA, Simmonds JE, Chacho MS, McKitrick JC. *Fusarium solani* osteomyelitis with probable nosocomial spread. Am J Clin Pathol 1988;90:738–741

29. Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, et al. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. Clin Infect Dis 2001;33: 1871–1878
30. Raad I, Tarrand J, Hanna H, et al. Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. Infect Control Hosp Epidemiol 2002;23:532–537
31. Clemons KV, Calich VL, Burger E, et al. Pathogenesis, I: Interactions of host cells and fungi. Med Mycol 2000;38:99–111
32. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999;12:310–350
33. Rinehart JJ, Balcerzak SP, Sagone AL, LoBuglio AF. Effects of corticosteroids on human monocyte function. J Clin Invest 1974;54:1337–1343
34. Nucci M, Anaissie E, Queiroz-Telles F, et al. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. Cancer 2003;98:315–319
35. Kontoyiannis DP, Bodey GP, Hanna H, et al. Outcome determinants of fusariosis in a tertiary care cancer center: the impact of neutrophil recovery. Leuk Lymphoma 2004;45: 141–143
36. Sampathkumar P, Paya CV. *Fusarium* infection after solid-organ transplantation. Clin Infect Dis 2001;32:1237–1240
37. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. Clin Microbiol Rev 1997;10:86–124
38. Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, et al. Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. Am J Med 1981;71:59–66
39. Girmenia C, Iori AP, Boecklin F, et al. *Fusarium* infections in patients with severe aplastic anemia: review and implications for management. Haematologica 1999;84:114–118
40. Torres HA, Bodey GP, Rolston KVI, Kantarjian HM, Raad II, Kontoyiannis DP. Infections in patients with aplastic anemia: experience at a tertiary care cancer center. Cancer 2003;98:86–93
41. Etzel RA. Mycotoxins. JAMA 2002;287:425–427
42. Rosenstein Y, Kretschmer RR, Lafarge-Frayssinet C. Effect of *Fusarium* toxins, T2-toxin and diacetoxyscirpenol on murine T-independent immune responses. Immunology 1981;44:555–560
43. Pitt JI. Toxigenic fungi: which are important? Med Mycol 2000;38(suppl 1):S17–S22
44. Sugiura Y, Sugita-Kouishi Y, Kumagai S, Reiss E. Experimental murine hyalohyphomycosis with soil-derived isolates of *Fusarium solani*. Med Mycol 2003;41:241–247
45. Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, et al. Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. Circulation 1994; 90:3018–3023
46. Kiryu H, Yoshida S, Suenaga Y, Asahi M. Invasion and survival of *Fusarium solani* in the dexamethasone-treated cornea of rabbits. J Med Vet Mycol 1991;29:395–406
47. El-Ani AS. Disseminated infection caused by *Fusarium solani* in a patient with aplastic anemia. N Y State J Med 1990;90:609–610
48. Segal BH, Walsh TJ, Liu JM, Wilson JD, Kwon-Chung KJ. Invasive infection with *Fusarium chlamydosporum* in a patient with aplastic anemia. J Clin Microbiol 1998;36:1772–1776
49. Kontoyiannis DP, Wessel VC, Bodey GP, Rolston KV. Zygomycosis in the 1990s in a tertiary-care cancer center. Clin Infect Dis 2000;30:851–856
50. Liu K, Howell DN, Perfect JR, Schell WA. Morphologic criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* species by histopathology. Am J Clin Pathol 1998;109:45–54
51. Hayden RT, Isotalo PA, Parrett T, et al. *In situ* hybridization for the differentiation of *Aspergillus, Fusarium,* and *Pseudallescheria* species in tissue section. Diagn Mol Pathol 2003;12:21–26
52. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol 1998;36:1169–1175
53. Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chanock SJ. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. J Clin Microbiol 1995;33:3216–3220
54. Hennequin C, Abachin E, Symoens F, et al. Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol 1999;37:3586–3589
55. Kovacicova G, Spanik S, Kunova A, et al. Prospective study of fungaemia in a single cancer institution over a 10-y period: aetiology, risk factors, consumption of antifungals and outcome in 140 patients. Scand J Infect Dis 2001;33:367–374
56. Trabasso P, Vigorito AC, De Souza CA, Moretti-Branchini ML. Invasive fungal infection in hematopoietic stem cell transplant recipients at a Brazilian university hospital. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL: 2001: Abstract K-1248
57. Farina C, Vailati F, Manisco A, Goglio A. Fungaemia survey: a 10-year experience in Bergamo, Italy. Mycoses 1999;42:543–548
58. Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J, Bodey GP, Storey R, Raad II. Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study. Clin Infect Dis 2000;31:188–189
59. Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin Infect Dis 2002;35:909–920
60. Bodey GP, Boktour M, Mays S, et al. Skin lesions associated with *Fusarium* infection. J Am Acad Dermatol 2002;47:659–666
61. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex JH. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. J Clin Microbiol 1999;37:3946–3951
62. Anaissie EJ, Hachem R, Legrand C, Legenne P, Nelson P, Bodey GP. Lack of activity of amphotericin B in systemic murine fusarial infection. J Infect Dis 1992;165:1155–1157
63. Guarro J, Pujol I, Mayayo E. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1256–1257
64. Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. In vitro activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3298–3300

65. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Lancet 2002;359:1135–1144
66. Koizumi T, Kubo K, Kaneki T, et al. Pharmacokinetic evaluation of amphotericin B in lung tissue: lung lymph distribution after intravenous injection and airspace distribution after aerosolization and inhalation of amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:1597–1600
67. Mohammedi I, Gachot B, Grossin M, Marche C, Wolff M, Vachon F. Overwhelming myocarditis due to *Fusarium oxysporum* following bone marrow transplantation. Scand J Infect Dis 1995;27:643–644
68. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Guarro J. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2273–2275
69. Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, et al. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. Clin Infect Dis 1998;26:1383–1396
70. Lewis RE, Wiederhold NP. The solubility ceiling: a possible rationale for continuous infusion amphotericin B therapy? Clin Infect Dis 2003;37:871–872
71. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:834–840
72. Reuben A, Anaissie E, Nelson PE, et al. Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:1647–1649
73. Hirose H, Terasaki H, Awaya S, Yasuma T. Treatment of fungal corneal ulcers with amphotericin B ointment. Am J Ophthalmol 1997;124:836–838
74. Barret JP, Ramzy PI, Heggers JP, Villareal C, Herndon DN, Desai MH. Topical nystatin powder in severe burns: a new treatment for angioinvasive fungal infections refractory to other topical and systemic agents. Burns 1999;25:505–508
75. Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. J Antimicrob Chemother 1998;42:741–745
76. Espinel-Ingroff A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. J Clin Microbiol 1998;36:2950–2956
77. Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan DJ. In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. Mycopathologia 2001;150:101–115
78. Fothergill AW, Rinaldi MG, Schwocho LR, Ohya S. Comparison of the investigational azole CS-758 (R-120758) to amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against 250 mould fungi. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL: 2001: Abstract J-822
79. Huczko E, Minassian B, Washo T, Bonner D, Fung-Tomc J. In vitro activity of ravuconazole against *Zygomycetes, Scedosporium* and *Fusarium* isolates. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL: 2001: Abstract J-810
80. Lozano-Chiu M, Arikan S, Paetznick VL, Anaissie EJ, Loebenberg D, Rex JH. Treatment of murine fusariosis with SCH 56592. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:589–591
81. Marco F, Pfaller MA, Messer SA, Jones RN. In vitro activity of a new triazole antifungal agent, SCH 56592, against clinical isolates of filamentous fungi. Mycopathologia 1998;141:73–77
82. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, and the Sentry Participants Group Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B tested against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2000. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1032–1037
83. Reyes GH, Long L, Hossain M, Ghannoum MA. Evaluation of voriconazole efficacy in the treatment of murine fusariosis. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL: 2001: Abstract J-1604
84. Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. Clin Infect Dis 2003;36:1122–1131
85. Consigny S, Dhedin N, Datry A, Choquet S, Leblond V, Chosidow O. Successful voriconazole treatment of disseminated fusarium infection in an immunocompromised patient. Clin Infect Dis 2003;37:311–313
86. Hachem R, Raad II, Afif C, et al. An open, non-comparative multicenter study to evaluate efficacy and safety of posaconazole (SCH 56592) in the treatment of invasive fungal infections refractory to or intolerant of standard therapy. Abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto, Ontario, Canada: 2000: Abstract J-1109
87. Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. In vitro activity of Syn-2869, a novel triazole agent, against emerging and less common mold pathogens. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1260–1263
88. Capilla J, Ortoneda M, Pastor FJ, Guarro J. In vitro antifungal activities of the new triazole UR-9825 against clinically important filamentous fungi. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2635–2637
89. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:327–330
90. Del Poeta M, Schell WA, Perfect JR. In vitro antifungal activity of pneumocandin L-743, 872 against a variety of clinically important molds. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:1835–1836
91. Pfaller MA, Marco F, Messer SA, Jones RN. In vitro activity of two echinocandin derivatives, LY303366 and MK-0991 (L-743,792), against clinical isolates of *Aspergillus, Fusarium, Rhizopus*, and other filamentous fungi. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;30:251–255
92. Tawara S, Ikeda F, Maki K, et al. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:57–62
93. Apostolidis J, Bouzani M, Platsouka E, et al. Resolution of fungemia due to *Fusarium* species in a patient with acute leukemia treated with caspofungin. Clin Infect Dis 2003; 36:1349–1350

94. Li RK, Rinaldi MG. In vitro antifungal activity of nikkomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1401–1405
95. Lionakis MS, Lewis RE, Samonis G, Kontoyiannis DP. Pentamidine is active in vitro against *Fusarium* species. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3252–3259
96. Petranyi G, Meingassner JG, Mieth H. Activity of terbinafine in experimental fungal infections of laboratory animals. Antimicrob Agents Chemother 1987;31:1558–1561
97. Del Poeta M, Schell WA, Dykstra CC, et al. In vitro antifungal activities of a series of dication-substituted carbazoles, furans, and benzimidazoles. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2503–2510
98. Merz WG, Karp JE, Hoagland M, Jett-Goheen M, Junkins JM, Hood AF. Diagnosis and successful treatment of fusariosis in the compromised host. J Infect Dis 1988;158: 1046–1055
99. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:245–247
100. Clancy CJ, Nguyen MH. The combination of amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. J Antimicrob Chemother 1998;41:127–130
101. Stern GA. In vitro antibiotic synergism against ocular fungal isolates. Am J Ophthalmol 1978;86:359–367
102. Farmaki E, Roilides E. Immunotherapy in patients with systemic mycoses: a promising adjunct. BioDrugs 2001;15: 207–214
103. Rodriguez-Adrian LJ, Grazziutti ML, Rex JH, Anaissie EJ. The potential role of cytokine therapy for fungal infections in patients with cancer: is recovery from neutropenia all that is needed? Clin Infect Dis 1998;26:1270–1278
104. Roilides E, Maloukou A, Gil-Lamaignere C, Winn RM, Panteliadis C, Walsh TJ. Differential effects of interleukin 15 on hyphal damage of filamentous fungi induced by human neutrophils. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL: 2001: Abstract J-468
105. Winn RM, Maloukou A, Gil-Lamaignere C, Panteliadis C, Roilides E. The Eurofung Network. Interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhance hyphal damage of *Aspergillus* and *Fusarium* spp by human neutrophils. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL: 2001: Abstract J-134
106. Heinz T, Perfect J, Schell W, Ritter E, Ruff G, Serafin D. Soft-tissue fungal infections: surgical management of 12 immunocompromised patients. Plast Reconstr Surg 1996; 97:1391–1399

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Jan. 2006, p. 294–297 Vol. 50, No. 1
0066-4804/06/$08.00+0 doi:10.1128/AAC.50.1.294–297.2006
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Pentamidine Is Active in a Neutropenic Murine Model of Acute Invasive Pulmonary Fusariosis

Michail S. Lionakis,[1,2]† Georgios Chamilos,[1]† Russell E. Lewis,[1,3] Nathan P. Wiederhold,[3] Issam I. Raad,[1] George Samonis,[2] and Dimitrios P. Kontoyiannis[1,3]*

Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas,[1] Medical School of the University of Crete, Heraklion, Greece,[2] and College of Pharmacy, University of Houston, Houston, Texas[3]

Received 11 August 2005/Returned for modification 12 September 2005/Accepted 12 October 2005

We studied the efficacy of pentamidine (PNT) as prophylaxis or early treatment in acute pulmonary fusariosis in neutropenic mice. PNT-preexposed mice had significantly improved survival and reduced fungal burden compared to amphotericin B-preexposed and untreated mice. PNT-treated mice had increased survival but no difference in fungal burden versus untreated mice.

The mortality rate of invasive fusariosis is exceedingly high in immunocompromised hosts (8, 14). Current antifungal drugs have marginal efficacy and the major prognostic determinant in fusariosis is neutrophil recovery (8, 14). Introduction of new, more effective prophylactic and therapeutic approaches is essential for improving the prognosis of fusariosis. We previously showed that pentamidine (PNT), a broad-spectrum antimicrobial (13), has significant activity against a variety of pathogenic *Fusarium* species in vitro, with preferential activity against *Fusarium* conidia (10). As described herein, after establishing a reproducible murine model of acute invasive pulmonary fusariosis, we tested the in vivo efficacy of PNT in prophylaxis or early treatment (first 6 h after infection) of infection with *Fusarium oxysporum*.

MATERIALS AND METHODS

Organism and animals. We used *F. oxysporum* isolate F15, which was recovered from a patient with acute myelogenous leukemia who died of fusariosis. The MICs of amphotericin B (AMB) and PNT were 2 μg/ml and 4 μg/ml, respectively, as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A microdilution method (12). Conidia were collected and prepared as described previously (9). Female BALB/c mice (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, Ind.) weighting 20 to 25 g each were used. Animals were housed ($n = 5$ per cage) in presterilized, filter-topped cages and provided with sterile food, water, and bedding in the biohazardous isolation suite at The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center Animal Care Facilities. Animals had access to food and water ad libitum. All procedures were performed in accordance with the highest standards for humane handling, care, and treatment of research animals and were approved by The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center and University of Houston Institutional Animal Care and Use Committees.

Immunosuppression and infection. Cyclophosphamide (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) was administered by intraperitoneal (i.p.) injections (150 mg/kg; 200 to 250 μl of a 15-mg/ml sterile saline solution) 3 days prior to and 1 after infection, rendering the mice neutropenic, as described previously (6). Mice were infected by the sinopulmonary route as reported previously (9) by using 35 μl from different conidial inoculum solutions in independent experiments (range, 10^7 conidia/ml solution resulting in infection with $\sim 35 \times 10^4$ conidia/mouse to 10^9 conidia/ml solution resulting in infection with $\sim 35 \times 10^6$ conidia/mouse). The conidial viability was greater than 99%, as determined by quantitative plating of serial dilutions taken from the original inoculum.

All animals were observed for 4 days after infection and weighed daily to monitor for drug toxicity. Animals that appeared moribund before 4 days after infection were euthanized by CO_2 asphyxiation, and death was recorded as occurring 12 h later. On day 4 after infection, all of the remaining mice were euthanized.

Prophylaxis and treatment. Groups of 10 mice each were given (a) PNT prophylaxis (8.5 mg/kg/24 h in distilled water intravenously [i.v.], starting 24 h prior to infection), or (b) AMB prophylaxis (1.5 mg/kg/24 h in distilled water i.p. starting 24 h prior to infection) or (c) early treatment with PNT (8.5 mg/kg/24 h i.v., starting 6 h postinfection), or (d) i.v. saline (control). The experiment was performed in triplicate on different days.

Fungal burden quantification by real-time quantitative PCR (qPCR). In two of the three above experiments, lungs of AMB-preexposed, PNT-preexposed, PNT-treated, and control untreated animals were removed after euthanization and stored at −80°C until analysis of pulmonary fungal burden by qPCR. DNA was extracted from lung homogenates by using the DNeasy tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA.), and DNA samples were analyzed in duplicate by using the ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers and dual-labeled fluorescent hybridization probes specific for the *F. oxysporum* 18S rRNA were designed using the ABI PRISM SeqScape software program (version 2; Applied Biosystems). The primers and probe used were as follows: forward primer, 5′-TGGTGCATGGCCGTTCTTA-3′; reverse primer, 5′-GGTCTCGTTCGTTATCGCAATT-3′; probe, 5′-6-carboxyfluorescein-TTG GTGGAGTGATTTGTCTGCT-6-carboxytetramethylrhodamine-3′. The threshold cycle (C_t) of each sample was interpolated from a six-point standard curve of C_t values prepared by spiking uninfected mouse lungs with 10^2 to 10^7 *F. oxysporum* conidia. Results were reported as conidial equivalents of *F. oxysporum* DNA.

Histopathology. In other experiments, whole-lung tissue samples obtained from three AMB-preexposed, three PNT-preexposed, three PNT-treated, and three control untreated animals euthanized 48 h after infection were submitted to compare disease severity by histopathology and Grocott-Gomori methenamine-silver nitrate staining.

Statistical analysis. Survival curves were plotted by Kaplan-Meier analysis and differences in survival between the groups of mice were analyzed by the log-rank test. For all comparisons, P values of ≤ 0.05 were considered statistically significant. Analysis of variance was performed to assess differences in fungal burden among the different mouse groups.

RESULTS

Establishment of a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. Sinopulmonary inoculation of mice with *F. oxysporum* conidia led to the development of acute pneumonia with mortality rates that were reproducible and inoculum-dependent. Inoculation using a 10^7-conidia/ml solution resulted in mortality of 30% at day 4 after infection, whereas inoculation using a 10^9-conidia/ml solution resulted in

* Corresponding author. Mailing address: Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, Unit 402, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd., Houston, TX 77030. Phone: (713) 792-6237. Fax: (713) 745-6839. E-mail: dkontoyi@mdanderson.org.

† These authors contributed equally to this work.

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

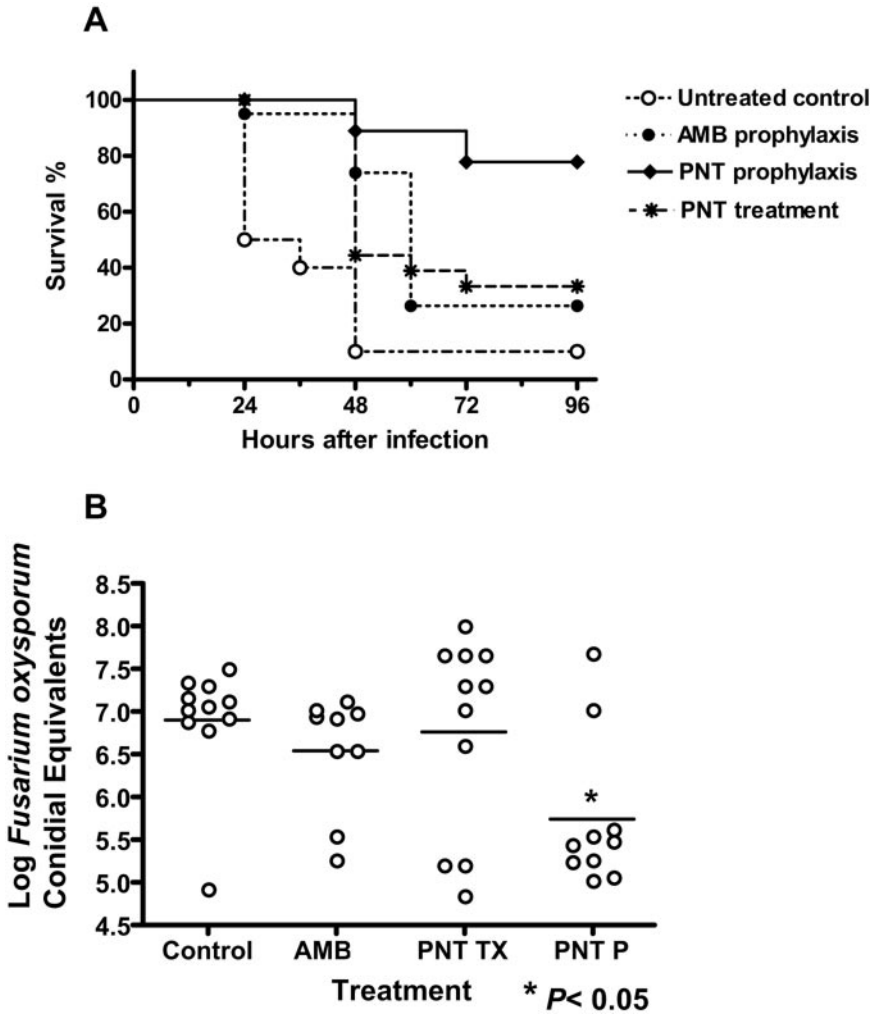


FIG. 1. (A) Survival of neutropenic *BALB/c* mice infected with *F. oxysporum* and administered PNT prophylaxis, AMB prophylaxis, early PNT treatment, or saline (untreated control). Survival was significantly improved in mice given PNT prophylaxis vs. control mice ($P = 0.0003$), mice given PNT versus AMB prophylaxis ($P = 0.01$), and mice given early PNT treatment (or AMB prophylaxis) vs. control mice ($P = 0.02$). Results are the means from three independent experiments. (B) Difference in lung fungal burden (conidial equivalents of *F. oxysporum* DNA) by real-time qPCR between control mice and mice given PNT or AMB prophylaxis or early PNT treatment. Fungal burden was significantly decreased in mice given PNT prophylaxis versus control mice and mice given PNT treatment or AMB prophylaxis ($P < 0.05$). Results are the means from two independent experiments. AMB, AMB prophylaxis; PNT TX, PNT treatment; PNT P, PNT prophylaxis.

hyperacute infection with mortality of 90% at day 1 after infection. For our drug protection experiments, we infected mice using a 2×10^8-conidia/ml solution that resulted in infection with $\sim 70 \times 10^5$-conidia/mouse (Fig. 1A). The possibility that the acute mortality observed 24 h postinfection (~50%) was due to a bacterial infection was excluded by performing plating of lung homogenates from representative mice that died 24 h post-*Fusarium* inoculation on routine culture media. No bacterial growth was appreciated. In addition, in other experiments, histopathology sections with GMS staining of lung tissue from mice that died 24 h postinfection demonstrated the presence of extensive hyphal invasion by *Fusarium* and hemorrhage consistent with fatal pulmonary fusariosis but no evidence of bacterial infection.

Prophylaxis with PNT. Infected mice preexposed to PNT had significantly improved survival at day 4 after infection when compared with untreated mice (77% and 10%, respectively; $P < 0.001$) (Fig. 1A). Also, PNT prophylaxis was more effective than AMB prophylaxis (survival at day 4 postinfection, 27%; $P = 0.01$). In addition to having better survival, PNT-preexposed mice also had substantially lower lung fungal burden than AMB-preexposed mice ($P < 0.05$) and control mice ($P < 0.05$) by both qPCR (Fig. 1B) and histopathology (Fig. 2). AMB preexposure improved survival when compared with no treatment ($P = 0.02$) (Fig. 1A) but did not markedly decrease the lung fungal burden according to qPCR (Fig. 1B) and histopathology (Fig. 2).

Treatment with PNT. PNT-treated mice had better survival (33%) when compared with control mice (10%; $P = 0.02$) (Fig. 1A) but had comparable lung fungal burden by qPCR (Fig. 1B) and histopathology (data not shown).

DISCUSSION

Fusariosis is an emerging opportunistic mycosis against which antifungals have mediocre activity, especially in the set-

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

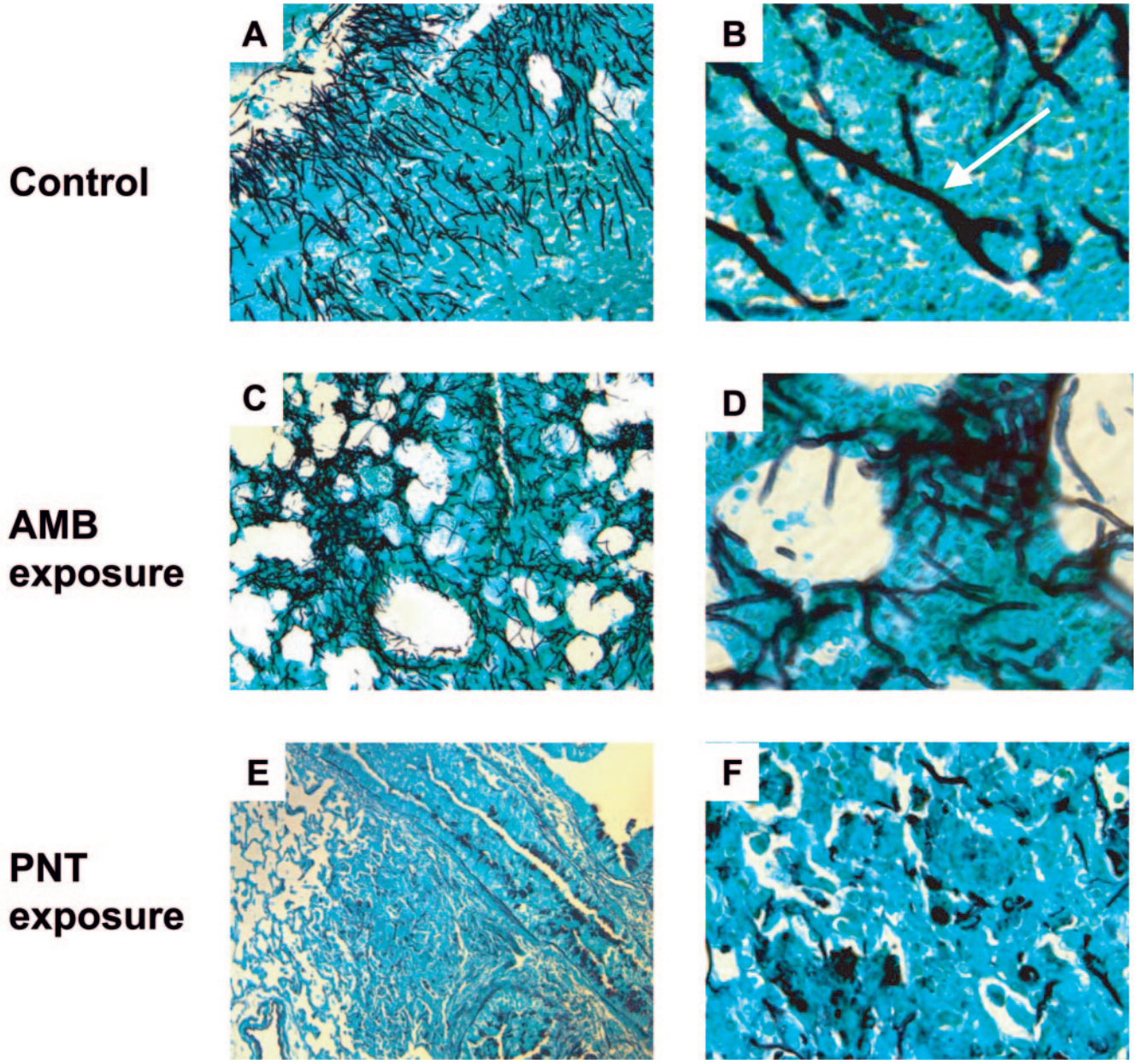


FIG. 2. Representative histopathological sections (stained with Grocott-Gomori methenamine-silver nitrate) of lung tissue recovered from control mice (A and B), mice given AMB prophylaxis (C and D), and mice given PNT prophylaxis (E and F). The arrows show *F. oxysporum* branching hyphae, which are seen as dark staining. Of note is the significant reduction in the lung fungal burden in PNT-preexposed mice when compared with that in control mice. Magnifications: panels A, C, and D, ×196; panels B, D, and E, ×980.

ting of neutropenia (8, 14). Current in vivo models used to study the activity of antifungals against fusariosis are established by intravenous inoculation of *Fusarium* conidia (1, 5). Herein, we developed a reproducible murine model of acute invasive pulmonary fusariosis that simulates the pathophysiology of the human infection (3, 14) through the introduction of *Fusarium* conidia via the sinopulmonary route.

We tested PNT to determine its efficacy in prophylaxis for and early treatment of *F. oxysporum* infection. PNT prophylaxis substantially improved survival and significantly reduced the lung fungal burden when compared with AMB prophylaxis and no prophylaxis. Although AMB prophylaxis improved survival, its effect was less pronounced than that of PNT prophylaxis, and it did not decrease the lung fungal burden. The marginal efficacy of AMB as prophylaxis is in part explained by, and in agreement with, the high AMB MIC of the tested *Fusarium* isolate. The poor in vivo efficacy of AMB in the setting of neutropenia has been well-established both in animal models (1) and in humans with fusariosis (8).

Similarly, early PNT treatment increased survival. However, it did not affect the lung fungal burden when compared with no treatment. The greater activity of PNT in prophylaxis than in treatment is in agreement with our previous work, in which we found that PNT had preferentially increased activity against

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007

Fusarium conidia versus hyphae in vitro (10). This relative resistance of hyphae versus conidia to antifungals (i.e., AMB, azoles) has been shown in several filamentous fungi (i.e., *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Cladophialophora* species) (4, 7).

Our initial plan was to demonstrate a dose-response effect of PNT against *Fusarium* and also to use different routes of PNT administration. Unfortunately, drug toxicity limited our efforts. Hence, when i.v. PNT was administered at 17 mg/kg/24 h, death of a substantial number of animals within few minutes after i.v. administration was seen (data not shown). This advent outcome was likely due to electrolytic disturbances and/or cardiac arrhythmias, which are known adverse effects of PNT use in humans (13). Moreover, in other experiments using i.p. PNT injections (dose, 8.5 or 17 mg/kg/24 h), significant toxicity was also observed resulting in intra-abdominal necrosis (as determined at necropsy) in a substantial proportion of animals (data not shown). We believe that the reason for this outcome is probably necrotizing pancreatitis, which can occasionally occur with PNT use in humans (13).

Our study has certain limitations. First, we used a PNT dosage that was shown to result in lung concentrations of PNT in mice similar to lung levels achieved in humans with conventional PNT dosages (2, 15). However, we did not confirm the lung or serum concentrations of PNT in pharmacokinetic studies. Additionally, the hyperacute nature of the murine model of fusariosis keeps it from entirely mimicking the course of fusariosis in humans, which tends to have a more subacute tempo of progression (14). Therefore, our model might not be suitable for demonstrating the therapeutic potential of PNT, as shown by our early infection survival data.

Despite these limitations, our study expands upon our previous findings showing that PNT has anti-*Fusarium* activity in vitro (10) and demonstrates that PNT, at pharmacologically relevant concentrations, has significant in vivo efficacy against fusariosis, particularly when administered as prophylaxis. The use of PNT, despite its toxicity, in prophylaxis against *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in recipients of allogeneic bone marrow transplants and patients with AIDS has been well studied (11). Thus, speculating that such patients may also benefit from protection against fusariosis while receiving prophylaxis with PNT is appealing. However, considering the low incidence of fusariosis, studying this hypothesis may be difficult.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by The University of Texas M. D. Anderson Faculty E. N. Cobb Scholar Award Research Endowment and the M. D. Anderson Cancer Center Core Grant (CA 16672) from The University of Texas (to D.P.K.). M.S.L. is supported in part by the Agricultural Bank of Greece Fellowship.

We thank Nathaniel D. Albert for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. **Anaissie, E. J., R. Hachem, C. Legrand, P. Legenne, P. Nelson, and G. P. Bodey.** 1992. Lack of activity of amphotericin B in systemic murine fusarial infection. J. Infect. Dis. **165:**1155–1157.
2. **Bernard, E. M., H. J. Donnelly, M. P. Maher, and D. Armstrong.** 1985. Use of a new bioassay to study pentamidine pharmacokinetics. J. Infect. Dis. **152:**750–754.
3. **Clemons, K. V., V. L. Calich, E. Burger, S. G. Filler, M. Grazziutti, J. Murphy, E. Roilides, A. Campa, M. R. Dias, J. E. Edwards, Jr., Y. Fu, G. Fernandes-Bordignon, A. Ibrahim, H. Katsifa, C. G. Lamaignere, L. H. Meloni-Bruneri, J. Rex, C. A. Savary, and C. Xidieh.** 2000. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. Med. Mycol. **38:**99–111.
4. **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.
5. **Guarro, J., I. Pujol, and E. Mayayo.** 1999. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**1256–1257.
6. **Gudmundsson, S., and H. Erlenddottir.** 1999. Murine thigh infection model, p. 137–144. *In* O. Zak and M. A. Sande (ed.), Handbook of animal models of infection. Academic Press, London, United Kingdom.
7. **Koenig, H., and M. Kremer.** 1979. A propos des discordances observees dans les resultants des CMI faites sur spores ou filaments d'*Aspergillus*. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. **8:**237–242.
8. **Kontoyiannis, D. P., G. P. Bodey, H. Hanna, R. Hachem, M. Boktour, E. Girgaway, M. Mardani, and I. I. Raad.** 2004. Outcome determinants of fusariosis in a tertiary care cancer center: the impact of neutrophil recovery. Leuk. Lymphoma **45:**139–141.
9. **Lewis, R. E., R. A. Prince, J. Chi, and D. P. Kontoyiannis.** 2002. Itraconazole preexposure attenuates the efficacy of subsequent amphotericin B therapy in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**3208–3214.
10. **Lionakis, M. S., R. E. Lewis, G. Samonis, and D. P. Kontoyiannis.** 2003. Pentamidine is active in vitro against *Fusarium* species. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**3252–3259.
11. **Marras, T. K., K. Sanders, J. H. Lipton, H. A. Messner, J. Conly, and C. K. Chan.** 2002. Aerosolized pentamidine prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia after allogeneic marrow transplantation. Transpl. Infect. Dis. **4:**66–74.
12. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard. NCCLS document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
13. **Sands, M., M. A. Kron, and R. B. Brown.** 1985. Pentamidine: a review. Rev. Infect. Dis. **7:**625–634.
14. **Torres, H. A., and D. P. Kontoyiannis.** 2003. Hyalohyphomycoses (other than aspergillosis and penicilliosis), p. 252–270. *In* W. E. Dismukes, P. G. Pappas, and J. D. Sobel (ed.), Oxford textbook of clinical mycology, 1st ed. Oxford University Press, New York, N.Y.
15. **Waalkes, T. P., C. Denham, and V. T. DeVita.** 1970. Pentamidine: clinical pharmacologic correlations in man and mice. Clin. Pharmacol. Ther. **11:**505–512.

Downloaded from aac.asm.org by on December 18, 2007