

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Microbiología II



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de  
antifúngicos triazólicos en muestras preclínicas y clínicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Emilio Cendejas Bueno**

Directora

**Alicia Gómez López**

**Madrid, 2018**



U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Microbiología II**

**Directora de tesis: Doctora Alicia Gómez López.**

**Científico Titular de OPI**

**Servicio de Micología, CNM**

**Instituto de Salud Carlos III**

Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antifúngicos triazólicos en muestras biológicas: aplicaciones preclínicas y clínicas.

Memoria para la obtención del Grado de Doctor  
Emilio Cendejas Bueno

A mis Padres,  
Hermanos y María

## Agradecimientos.

Al terminar un trabajo tan complejo y laborioso como es el desarrollo de una tesis doctoral tengo un sentimiento de satisfacción personal enorme. Es la conclusión, en mi caso particular, de un período de formación y aprendizaje que ha durado muchos años. Pero este largo camino no podría haber sido posible sin toda la gente de la que he estado rodeado en este tiempo, tanto en el plano personal como en el profesional.

En primer lugar, mi agradecimiento a la directora de esta Tesis Doctoral, la Doctora Alicia Gómez López por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Además agradecerle la dedicación exclusiva con las prisas de última hora. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué al Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología en 2009. Pero su tutela no ha sido sólo importante en la elaboración de esta Tesis Doctoral, sino también en la redacción de manuscritos, aprendizaje del método científico y en la estancia en el extranjero, período que disfruté mucho y del que guardo uno de los mejores recuerdos de mi vida.

Mi agradecimiento al Doctor Manuel Cuenca Estrella, por darme la oportunidad de formar parte del Servicio de Micología durante cuatro años. También a los investigadores titulares, predoctorales, postdoctorales y técnicos que forman y han formado parte de él, porque todos en algún momento dado me han aportado cosas en lo profesional y en lo personal.

Agradecer también a todas las personas (facultativos, enfermeras, técnicos, residentes y jefes) que han contribuido a hacer de mi profesión una vocación y un placer, todas ellas en los Servicios de Microbiología y Parasitología Clínica del Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario Virgen de la Luz, Fundación Hospital de Alcorcón y Hospital Virgen de Altagracia. Me han enseñado que la microbiología clínica es un trabajo en equipo en el que los beneficiados no debemos ser nosotros, sino las personas a las que prestamos asistencia, y que eso, y sólo eso, es lo realmente importante. Darle las gracias al Doctor Julio García Rodríguez por facilitarme la disposición de tiempo para acabar esta Tesis Doctoral.

También quiero expresar mi agradecimiento a mi familia. Sin ellos no podría haber llegado a este punto. A mis padres, Carmen y Emilio, que han sacado adelante a tres hijos y me han proporcionado las herramientas tanto para mi desarrollo personal como profesional. A mis hermanos Luis y Alfredo, por haber sido siempre un ejemplo académica, profesional y personalmente. Y a María, mi mujer, que en estos años ha estado dándome su apoyo

incondicional en todos los momentos, los buenos y los menos buenos, además de aconsejarme y ayudarme profesionalmente.

No quiero olvidarme de todos los amigos que en estos años me han demostrado su apoyo y confianza, vosotros sabéis quienes sois.



## Índice

Índice de tablas .....	8
Índice de figuras.....	9
Índice de abreviaturas y símbolos .....	10
Resumen .....	12
Abstract .....	16
1.- Introducción.....	20
1.1.- La enfermedad fúngica invasora. Concepto y epidemiología. ....	21
1.2.- Tratamiento de la EFI.....	25
Bibliografía.....	31
1.3.- Farmacología clínica. Conceptos generales. ....	36
Bibliografía.....	43
1.4.-Técnicas para la monitorización de niveles séricos y plasmáticos de fármacos. ....	45
Bibliografía.....	50
1.5.-Validación de métodos bioanalíticos.....	51
Bibliografía.....	58
1.6.- Revisión de la literatura en relación a la utilidad clínica de la monitorización de fármacos antifúngicos azólicos sistémicos. ....	59
2.- Planteamiento y objetivo. ....	76
2.1.- Planteamiento.....	77
2.2.- Objetivo. ....	77
2.3.- Desarrollo del objetivo. ....	78
Bibliografía.....	78
3.- Desarrollo.....	80
3.1.-Fase preanalítica: desarrollo y validación de métodos bioanalíticos para la cuantificación de antifúngicos azólicos sistémicos. ....	81
3.2.- Utilidad de la determinación de concentraciones sanguíneas y tisulares en modelos animales. Relaciones dosis exposición, establecimiento de parámetros farmacocinéticos. Relaciones entre concentraciones séricas y respuesta, evaluación de métodos de diagnóstico y seguimiento. ....	110
3.3.- Parte clínica: Utilidad de la monitorización en pacientes tratados con voriconazol. ....	160
4.- Discusión general.....	169
Sección 1ª.- Métodos; Aportaciones, ventajas y parámetros de validación. Modelos preclínicos y aplicaciones en pacientes con tratamiento. ....	171
Sección 2ª.- Recomendaciones actuales en la monitorización terapéutica de antifúngicos y futuro como herramienta terapéutica.....	177

Bibliografia.....	179
5.- Conclusiones.....	184

## Índice de tablas

*Tabla 1:* factores condicionantes y poblaciones de riesgo de desarrollo de EFI. **Página 22**

*Tabla 2:* indicaciones de los diferentes antifúngicos sistémicos. **Página 30**

*Tabla 3:* requisitos para la monitorización de niveles séricos. **Página 37**

*Tabla 4:* poblaciones en las que está recomendado la monitorización de niveles séricos. **Página 41.**

## Índice de figuras.

**Figura 1:** factores de cada variable relacionada con la infección fúngica. **Página 21**

**Figura 2:** evolución de los episodios de candidemia en un hospital de la Comunidad de Madrid (España), del año 1985 al año 2007. **Página 23**

**Figura 3:** adaptación de los datos presentados por Guinea y cols. (Guinea, Zaragoza et al., 2014) en un estudio de vigilancia epidemiológica de la candidemia. **Página 23**

**Figura 4:** cronología de la introducción de los fármacos antifúngicos sistémicos. **Página 25**

**Figura 5:** espectro de actividad de los agentes antifúngicos. **Página 27**

**Figura 6:** sitios de acción y mecanismos de los antifúngicos de uso sistémico. **Página 28**

**Figura 7:** representación gráfica de rango terapéutico. **Página 39**

**Figura 8:** esquema para la correcta utilización de la monitorización. **Página 42**

**Figura 9:** cromatograma de una muestra de suero con OH-itraconazol, ravuconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol. **Página 47**

**Figura 10:** medio de crecimiento para bioensayo. **Página 48**

**Figura 11:** bioensayo revelado. **Página 49**

**Figura 12:** placa de bioensayo, microorganismo revelador y medidor de halos. **Página 49**

**Figura 13:** relaciones entre fármaco, microorganismo y hospedador. **Página 171**

## Índice de abreviaturas y símbolos

### Índice de abreviaturas

**EFI** enfermedad fúngica invasora

**TPH** trasplante de células madre hematopoyéticas

**TOS** trasplantados de órgano sólido

**Alo-TPH** trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

**EICH** enfermedad de injerto contra huésped

**LMA** leucemia mieloide aguda

**EPOC** enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**SMD** síndrome mielodisplásico

**SIDA** síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**FDA** Food and Drug Administration

**ARN** ácido ribonucleico

**LADME** Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

**HPLC** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

**LC-MS** cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

**HPLC-UV** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con detección ultravioleta

**EMA** European Medicines Agency

**EC** estándares de calibración

**CC** controles de calidad

**CI** control interno

**LIC** límite inferior de cuantificación

**LSC** límite superior de cuantificación

**PDA** detector de arreglo de diodos

**CMI** Concentración mínima inhibitoria

## **Índice de símbolos**

$K_e$  constante de eliminación del fármaco

$t_{1/2}$  vida media de eliminación del fármaco

$AUC_{0-24h}$  área bajo de la curva de 0 a 24 horas

$C_{max}$  Concentración máxima

## Resumen

**Título:** Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antifúngicos triazólicos en muestras biológicas: aplicaciones preclínicas y clínicas.

### **Introducción.**

El tratamiento de las micosis sistémicas es uno de los principales retos a día de hoy en el manejo de la patología infecciosa. En los últimos años el arsenal terapéutico antifúngico para el tratamiento de la infección fúngica invasora ha experimentado una importante mejora. La aparición y comercialización de nuevas moléculas con mayor actividad y menos toxicidad han modificado el tratamiento y el pronóstico de la infección fúngica.

A pesar de ello, esta patología continúa siendo un problema médico de gran importancia debido a la elevada mortalidad/morbilidad asociada en algunos grupos de pacientes inmunodeprimidos y, en menor medida, en individuos inmunocompetentes. Son varios los factores que condicionan la evolución de los pacientes con estas infecciones como son el estado inmunológico, las características del patógeno (principalmente la susceptibilidad a los antifúngicos), el tiempo transcurrido desde el establecimiento de la infección hasta el diagnóstico, así como un uso efectivo y seguro del fármaco.

Los triazoles sistémicos forman parte de este arsenal terapéutico. Los antifúngicos del grupo de los triazoles se han convertido en fármacos de primera línea para el tratamiento y profilaxis de muchas micosis sistémicas. Este grupo muestra importantes peculiaridades farmacocinéticas y en consecuencia una misma dosis administrada a diferentes pacientes puede dar como resultado concentraciones muy distintas, tanto plasmáticas como tisulares, lo que hace que estos agentes sean firmes candidatos a la monitorización terapéutica.

La individualización de la terapia mediante la determinación de las concentraciones sanguíneas (monitorización) implica una mejora de la respuesta al tratamiento, una prevención de las reacciones adversas, un mejor manejo de las interacciones medicamentosas y en consecuencia un ahorro en costes derivados de tratamientos y dosificaciones inadecuados. El objetivo de la monitorización es, por tanto, aumentar la probabilidad de éxito terapéutico minimizando la toxicidad.

Los estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos en las diferentes poblaciones de pacientes tratan de definir la relación entre la dosis administrada y el éxito o fracaso de una terapia, con el objetivo de definir un parámetro farmacocinético/farmacodinámico que ayude a predecir el éxito terapéutico.

## **Síntesis**

El trabajo de tesis que aquí se desarrolla persigue implementar métodos analíticos válidos basados en cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y en métodos microbiológicos (bioensayos) para la cuantificación de concentraciones sanguíneas de antifúngicos azólicos (itraconazol, voriconazol y posaconazol). Estos métodos se han desarrollado y validado para su aplicación en monitorización de pacientes tratados, así como para el estudio de la relación exposición-respuesta en modelos animales de infección, tanto invertebrados como murino.

Como ventajas generales de todos los métodos cromatográficos desarrollados destacar que son métodos rápidos, fiables, reproducibles, más exactos y precisos que los métodos microbiológicos y facilitan la toma de decisiones que impliquen cambios posológicos inmediatos; requieren pequeños volúmenes de muestra, lo que favorece la evaluación de estos fármacos en pacientes pediátricos y finalmente, permiten el uso rutinario en la práctica clínica, ya que han sido validados en el rango de concentraciones que permite realizar una monitorización eficaz. A su vez sirven como métodos de referencia para realización de estudios farmacocinéticos. En cuanto a las ventajas metodológicas relativas a las técnicas cromatográficas se pueden enumerar las siguientes; la fase móvil no necesita de aditivos adicionales (soluciones tampón) el uso de un compuesto de características químicas similares como control de extracción (ravuconazol) asegura un comportamiento cromatográfico similar al de los compuestos evaluados. Así mismo el método de extracción usado en los tres métodos cromatográficos desarrollados, asegura un porcentaje de recuperación de los tres antifúngicos mayor del 90%. Adicionalmente, el detector de arreglo de fotodiodos (PDA) proporciona espectros ultravioleta característicos que verifican la identidad y homogeneidad de los picos detectados, específicos de cada compuesto analizado.

Los métodos microbiológicos desarrollados y validados para voriconazol y posaconazol, resultaron ser precisos, exactos y rápidos, con un tiempo de respuesta no mayor de 24-48 horas. Para la validación de un método microbiológico, además de evaluar precisión y exactitud, es imprescindible realizar una validación cruzada con un método de referencia, para verificar que no exista variabilidad metodológica en ningún parámetro. La validación cruzada realizada con muestras clínicas de pacientes tratados con uno u otro fármaco estableció una correlación válida entre el bioensayo y el método cromatográfico de referencia, y por tanto la validez de los métodos para la monitorización de voriconazol y posaconazol en el laboratorio clínico. Los bioensayos evaluados y validados demuestran ser fiables, precisos y baratos para monitorizar azoles en laboratorios clínicos de hospitales o laboratorios sin acceso a instrumentos cromatográficos.

Se han evaluado también aspectos farmacocinéticos de posaconazol y voriconazol en dos modelos animales de aspergilosis invasora; un modelo murino (rata wistar inmunodeprimida) y

un modelo alternativo de invertebrado (*Galleria mellonella*) con el objetivo de establecer relaciones exposición-respuesta. Se han utilizado cepas sensibles y cepas resistentes de *Aspergillus fumigatus* para evaluar la validez de los modelos en el establecimiento de tales relaciones.

El modelo invertebrado de *Galleria mellonella* ha mostrado ser un modelo válido para estudios de virulencia y actividad antimicrobiana y corrobora que la patogenicidad de cepas de *A. fumigatus* con diferentes grados de resistencia a azoles no se ve afectada por la adquisición de un determinado mecanismo de resistencia. Tampoco se ve afectada la capacidad de crecimiento. Se observó que el perfil de exposición de posaconazol y voriconazol, expresado mediante el AUC<sub>0-24</sub>, fue comparable a los descritos en otros modelos.

En el modelo de rata en el que se utilizó posaconazol como profilaxis, se observó que la exposición al fármaco era similar en los dos grupos de animales, tanto en el grupo de los infectados por la cepa resistente como los infectados por la cepa sensible. Los resultados de este experimento, confirmaron la eficacia de un régimen de profilaxis a dosis superior a la estándar con una cepa de *A. fumigatus* susceptible, mientras que con la cepa resistente, la dosis administrada no mostró eficacia alguna y no se frenó la progresión de la infección. De igual manera, se demostró la utilidad de dos marcadores como son la carga fúngica y el índice de galactomanano para hacer el seguimiento de la progresión de la infección fúngica y la monitorización de la eficacia de la profilaxis.

En cuanto a los parámetros farmacocinéticos y la distribución observados en el modelo de infección por *A. fumigatus*, con la administración de posaconazol como tratamiento, se observó que un aumento de la exposición (expresada como la concentración en sangre) en función del aumento de la dosis. Resultados similares observados tanto en humanos como en ratones, permiten establecer la validez de este modelo como una herramienta adecuada para determinar la exposición real al fármaco.

Fue evaluada la disposición y penetración en pulmón, fundamental para entender la eficacia del fármaco. Se observó que posaconazol distribuye muy bien a pulmones, donde la cantidad cuantificada es superior a la de suero. Las concentraciones encontradas en pulmón aumentaban en función de la dosis administrada, mayor concentración a mayor dosis. El aumento con la dosis más alta era menos evidente, lo que sugiere un equilibrio entre la concentración en suero y la concentración en pulmón (saturación en el lugar de infección). Se producía acumulación de posaconazol en el pulmón de manera clara.

Respecto al estudio en pacientes tratados con voriconazol, el primer punto a destacar es la variabilidad de concentraciones séricas de voriconazol observadas en la población en estudio. Tampoco se puede afirmar que una vez alcanzados niveles terapéuticos, estos se mantienen dentro del rango terapéutico en posteriores determinaciones. Se observó una alta proporción de muestras en los que los niveles cuantificados fueron subterapéuticos y las principales causas

relacionadas de esta variabilidad son, en el caso de la vía oral, el incumplimiento así como la pobre absorción del fármaco, estado funcional del hígado o comedificaciones. La monitorización de las concentraciones entre dosificaciones puede ser, en casos concretos y determinados, una solución para poder dar explicación a la presencia de estos niveles subterapéuticos, establecer una cinética individual para una dosificación a medida, predecir la cinética del fármaco y guiar el ajuste de dosis de una manera adecuada. Las asociaciones obtenidas en este estudio entre niveles valle y respuesta, proporcionan más datos a los ya existentes para apoyar la utilidad de la monitorización de voriconazol. La ausencia de respuesta fue más frecuente en los pacientes en los que los niveles valle estaban por debajo de 1µg/mL de manera persistente.

### **Conclusiones**

- 1.- Los métodos analíticos han sido desarrollados y validados siguiendo los parámetros exigidos en las guías para la validación de métodos bioanalíticos de la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA).
- 2.- Los métodos desarrollados y validados cumplen con los criterios de precisión y exactitud, así como con el resto de parámetros exigidos en los procesos de validación de métodos bioanalíticos, con lo que los métodos presentados son fiables y reproducibles.
- 3.- La determinación de los niveles de voriconazol, posaconazol e itraconazol, muestran que las concentraciones séricas de los tres fármacos en los diferentes pacientes y en las diferentes muestras obtenidas de cada uno de ellos son muy variables, lo que unido a las características farmacocinéticas complejas expuestas en la revisión incluida en la introducción, justifican la monitorización de las concentraciones séricas de los tres fármacos.
- 4.- En los modelos animales estudiados se establece una buena correlación in vivo-in vitro para ambos antifúngicos y definen un parámetro PK/PD similar a los ya expuestos en publicaciones previas, lo que permite establecer la validez de los modelos animales para la determinación de relaciones exposición-respuesta con antifúngicos.
- 5.- La evaluación de la utilidad de la monitorización de voriconazol en pacientes en tratamiento presentada en esta tesis, muestra conclusiones interesantes que son corroboradas por publicaciones tanto previas como posteriores.

## Abstract

### Introduction

Invasive fungal infections are currently one of the most important issues in infectious diseases. In recent years, therapeutic arsenal has been increased and development of broad spectrum drugs with higher activity and lower toxicity has improved the management and prognosis of invasive fungal diseases.

This infectious disease is still a very major clinical problem due to its high mortality and morbidity rates. It is almost always associated to immunocompromised patients and, in lower frequency, to immunocompetent patients. Evolution and prognosis of fungal infections are associated to other factors as immunological status, pathogen features, time between the set up of infection and diagnosis and a rational use of the antifungal drugs.

They kill the fungal cell due to the growth inhibition of the fungus cell wall. Triazole agents are first line agents in treatment and prophylaxis of systemic fungal infections. Due to their especial pharmacokinetic features, therapeutic drug monitoring (TDM) can be recommended in order to ensure blood and tissue concentrations. TDM implies an improvement in response to treatment, decreased in frequency of adverse events and drug-drug interactions. Therefore, there is a save in costs´ treatments and in adverse events. The final target of TDM is the optimisation of the antifungal therapy.

Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies are essential to define pharmacokinetic parameters to optimize and follow up the efficacy of the antifungal treatment. These studies should be done in different populations (healthy and patients populations) in order to define the best pharmacokinetic parameter which defines the exposure to the drug and helps the clinician to manage the infection in a better manner.

### Synthesis

The main objective of this thesis was to develop, validate and implement High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and microbiological methods for quantifying blood concentrations of voriconazole, itraconazole and posaconazole. These methods were developed and validated to perform TDM in treated patients, as well as to establish exposure- response relationships in animal models (*Galleria mellonella* and wistar rats).

Two different methodologies for quantification of triazole agents, HPLC and bioassay, are compared and described. Both methods offer interesting advantages. HPLC has been demonstrated as a more accurate, precise and faster methodology, being a useful tool for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. HPLC method offers superior

precision and accuracy compared to the microbiological methods. Additional advantages such as a simple sample pretreatment procedure, the use of ravuconazole as ES (with similar chemical profile to ensure a comparable chromatographic behaviour) or the use of a simple mobile phase without buffers or additives make this a valuable method for triazole agents quantification. However, such facilities might not be available in all clinical microbiology laboratories whereas bioassay facilities are almost certainly available. The proposed bioassays have been shown to be a simple, inexpensive and reliable method for triazole quantification. The data demonstrate sufficient accuracy and precision in spite of the intrinsic variability described for this methodology. However, it is worth noting that bioassays have important limitations; first, bioassay quantifies the antifungal activity, but fails to identify the drug or its active metabolites. In addition, total inhibition zones can be modified by concomitant antifungal drugs, and therefore they might not represent correctly the serum antifungal concentration.

The *G. mellonella* model of invasive aspergillosis appears to be a useful tool for studying pathogenicity, especially because there are clear correlations with findings from mammals. Conserved aspects of the innate immune response to microbial infection in insects and mammals may explain this correlation. As result of data presented here, the model is capable of showing either no virulence (heat-killed conidia) or equal virulence, as shown in wild-type and mutant strains. Our results suggest that acquisition of these particular azole-resistance mechanisms in *A. fumigatus* does not appear to have any impact in terms of virulence. The results also highlight the fact that insects may provide valuable early insights into virulence and pathogenicity and, in particular, may contribute to the generation of hypotheses that can be further tested in refined experiments in mammalian models.

The *G. mellonella* model of invasive aspergillosis was also useful to evaluate the role of pharmacokinetic parameters to corroborate the lack of in vitro–in vivo correlations. In this regard, a wild-type strain and five *A. fumigatus* cyp51A mutated strains showing different azole susceptibility profiles were used to investigate the in vivo efficacy of voriconazole and posaconazole. Administration of both azoles improved the survival of larvae infected with susceptible strains. However, those larvae infected with resistant strains did not respond to treatment. The phenotype observed in vitro was found to correlate with the efficacy observed in vivo. Moreover, using this in vivo model, the pharmacodynamic target predicting therapeutic success ( $AUC_{0-24}/MIC$ ) was in the same range as previously described, allowing the use of the *G. mellonella* model to predict the azole susceptibility profile of *A. fumigatus* strains.

The rat model objective was to collect pharmacokinetic (PK) information related to blood and tissue distribution of posaconazole in a particular animal model of invasive pulmonary aspergillosis. Pharmacokinetic parameters described in lung samples were systematically higher than those described in serum. After multiple-dose administration of posaconazole a significant accumulation of the drug was evident in lung tissue. Pharmacokinetic behavior of posaconazole

in this particular experimental model reflected human exposures, concluding that it might be a valid tool to evaluate posaconazole exposure-response relationship. The rat model of invasive pulmonary aspergillosis was also performed to explore the utility of galactomannan enzyme immunoassay (GM) and quantitative real time PCR (RT-PCR) to evaluate the association between response and exposure after a high dose of prophylactic posaconazole. Two different strains of *Aspergillus fumigatus*, differing on *in vitro* posaconazole susceptibility were used. Results demonstrated similar posaconazole exposure for all treated animals; however response to posaconazole was relied on *in vitro* susceptibility of infecting strain. After prophylaxis galactomannan index and fungal burden decreased only in those animals infected with the most susceptible strain. This model demonstrated that both biomarkers may be useful tools for predicting efficacy of antifungal compounds in prophylaxis when the exposure to the antifungal agent is the same in both groups of animals.

As regards, the results from monitored patients, it was found a high inter- and intra-patient variability in the patients treated with triazole agents. Regarding the study in patients treated with voriconazole, the first point to note is the variability in serum voriconazole concentrations observed in the study population. It cannot be said that once therapeutic levels are reached, these levels are going to be maintained within the therapeutic range in subsequent determinations. In a high proportion of samples subtherapeutic levels were quantified. The main causes for this variability are related to oral administration, failure and poor drug absorption or comedications. The associations observed in this study between trough levels and response, provide more data to support the usefulness of therapeutic drug monitoring of voriconazole. The lack of response was more frequent in patients in whom trough levels were below 1 µg / mL persistently.

## **Conclusions**

- 1.- Biosassay and HPLC were developed and validated according to the parameters required by the guidelines for validation of bioanalytical methods of the Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA).
2. The developed and validated methods meet the criteria for precision and accuracy, as well as other parameters required in the process of validation of bioanalytical methods. The methods are reliable and reproducible.
3. Levels of voriconazole, posaconazole and itraconazole, show that serum concentrations in different patients and different samples are highly variable. This high variability and the complex pharmacokinetic behavior make TDM essential to optimize the use of these antifungal drugs.

4. In both animal models, In vivo behavior correlates well with *in vitro*. PK / PD parameters calculated are similar to those already mentioned in previous publications in different animal models, allowing establish the validity of both animal models for determining pharmacokinetic parameters and the transfer of acquired knowledge to humans.

5. Usefulness of TDM in patients receiving voriconazole shows interesting conclusions. These conclusions are corroborated by the literature.



# 1.- Introducción

## 1.1.- La enfermedad fúngica invasora. Concepto y epidemiología.

La incidencia de la enfermedad fúngica invasora (EFI) ha aumentado significativamente a lo largo de las últimas dos décadas, principalmente debido al aumento de pacientes inmunodeprimidos. Estos pacientes, con un sistema inmunológico deprimido en mayor o menor grado, son más susceptibles de contraer este tipo de enfermedades infecciosas (Bitar, Lortholary et al., 2014). Las de mayor frecuencia en nuestro medio son las EFI oportunistas, entre las cuales podemos encontrar las infecciones causadas por *Candida spp*, *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocystis jiroveci*. Las EFI endémicas, menos frecuentes, están asociadas a áreas geográficas concretas del continente americano y África. Estas EFI endémicas están causadas por *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis* y *Paracoccidioides brasiliensis* (Jehangir, Tadepalli et al., 2015).

Estudios recientes, como el publicado en Francia, muestran una incidencia de EFI cercana a los 5.9 /100000 casos por año y una tasa de mortalidad del 27.6%, aumentando en ciertos grupos de pacientes (hematológicos). Las entidades clínicas más frecuentes fueron candidemia, aspergilosis invasora, neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, cryptococosis y mucormicosis (Bitar, Lortholary et al., 2014).

Los factores condicionantes del desarrollo y evolución de una EFI influyen en cada uno de los tres vértices del triángulo que compone la infección fúngica: 1) factores relacionados con el huésped; 2) factores que dependen del hongo y 3) factores que dependen del tratamiento antifúngico específico como se exponen en la siguiente figura 1.

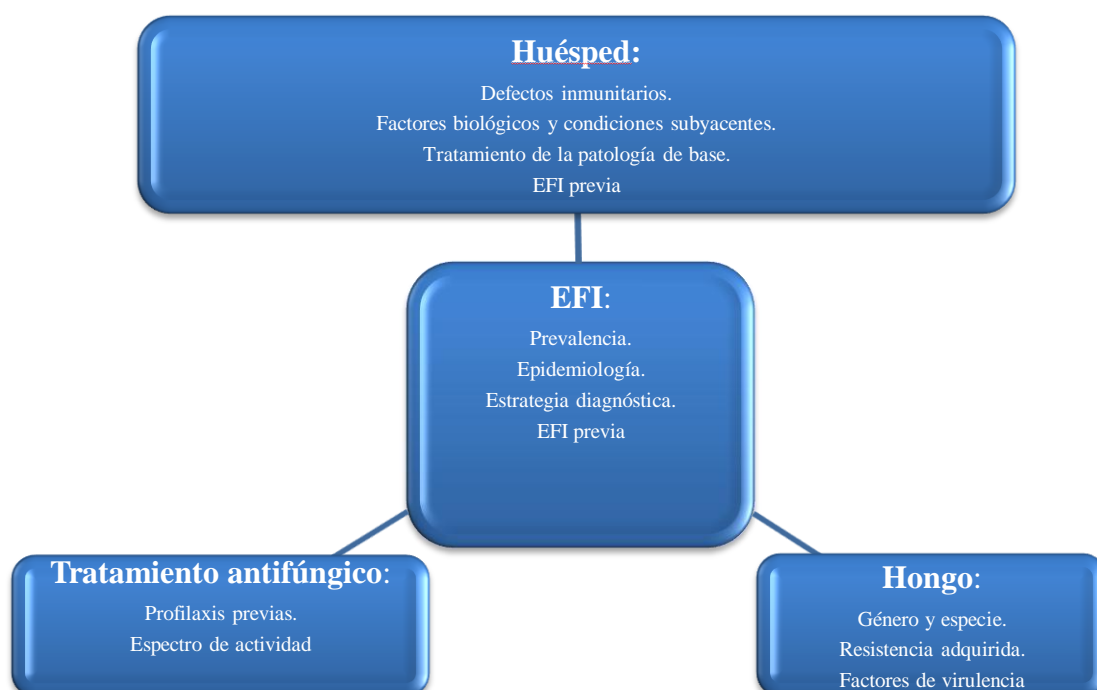


Figura 1: Factores de cada variable relacionada con la infección fúngica.

Los pacientes con mayor riesgo de adquirir una EFI en nuestro medio son aquellos pacientes inmunodeprimidos a consecuencia de un tratamiento quimioterápico para tratar una patología neoplásica, aquellos que reciben trasplante de células madre hematopoyéticas (TPH) o bien los trasplantados de órgano sólido (TOS) y aquellos ingresados en unidades de cuidados intensivos (Peman and Salavert, 2012a). En la tabla 1 se exponen los factores condicionantes y las poblaciones de riesgo para desarrollar las principales EFI.

#### **Candidiasis invasora/Candidemia.**

Factores de riesgo generales:

- Gravedad de la enfermedad aguda.
- Edad: <1 año, >65 años.
- Comorbilidades.
- Cirugía gastrointestinal previa.
- Larga estancia en UCI.
- Dispositivos invasivos.
- Transfusiones múltiples.
- Nutrición parenteral.
- Catéter vesical.
- Ventilación mecánica.

Condicionantes individuales o población de mayor riesgo:

- Uso prolongado de catéter venoso central.
- Antibioterapia de amplio espectro.
- Colonización previa por *Candida spp.*
- Insuficiencia renal y/o hemodiálisis.
- Neutropenia.
- Inmunosupresión.
- Patología gastrointestinal.
- Politraumatismo y/o gran quemado.
- Neonato prematuro.

#### **Aspergilosis invasora.**

Factores de riesgo:

- Neutropenia.
- Déficits de función fagocitaria.
- Alteración de la inmunidad celular.
- Uso de inmunosupresores.
- Exposición ambiental.
- Rotura de barreras mucocutáneas.

Población de mayor riesgo.

- Neutropénico.
- Pacientes con EICH e inmunosupresión.
- Receptor de órgano sólido.
- VIH-SIDA con CD4 <100 células/ $\mu$ l.
- Enfermedad granulomatosa crónica.
- Uso de terapias biológicas: anti-CD52, anti-TNF- $\alpha$
- Paciente crítico no hematológico.
- Enfermedad hepática avanzada.
- Post cirugía mayor y compleja.

Tabla 1: Factores condicionantes y poblaciones de riesgo de desarrollo de EFI. Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; EICH: enfermedad de injerto contra huésped; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; LMA: leucemia mieloide aguda; SMD: síndrome mielodisplásico. <sup>a</sup>Factores de riesgo independientes en estudios específicamente diseñados. Tabla adaptada de J. Pemán y Cols (Peman, Canton et al., 2011)

Las infecciones por *Candida spp.* se han convertido en una de las principales causas de sepsis en hospitales con incidencia en constante crecimiento en los últimos 20 años (Figura 2). *Candida spp.* hoy ocupan el cuarto lugar entre las especies que con mayor frecuencia causan infecciones del torrente sanguíneo en muchos países (EFI más común). *Candida albicans* es aún la principal causa de candidemia en los estudios basados en la población en todo el mundo, pero su frecuencia relativa está disminuyendo, mientras que la frecuencia de otras especies está

aumentando. En España la distribución general de las especies que causan candidemia se muestra en la figura 3. El uso de fluconazol como agente profiláctico, ha provocado un cambio epidemiológico hacia especies y cepas de *Candida* con sensibilidad disminuida a los azoles (Kullberg, Verweij et al., 2011). Actualmente la candidemia está asociadas a una tasa global de mortalidad que oscila entre el 12% y el 31% y no depende de las poblaciones de pacientes estudiados (Puig-Asensio, Padilla et al., 2014)..

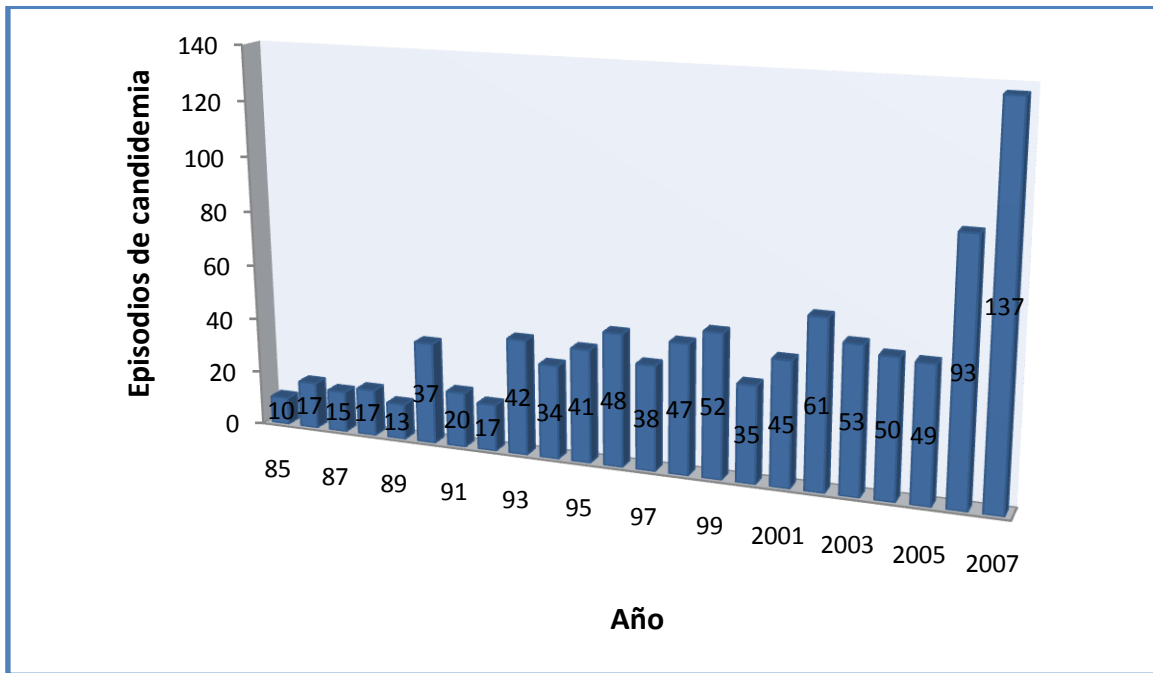


Figura 2: evolución de los episodios de candidemia en un hospital de la Comunidad de Madrid (España), del año 1985 al año 2007 (Bouza and Munoz, 2008).

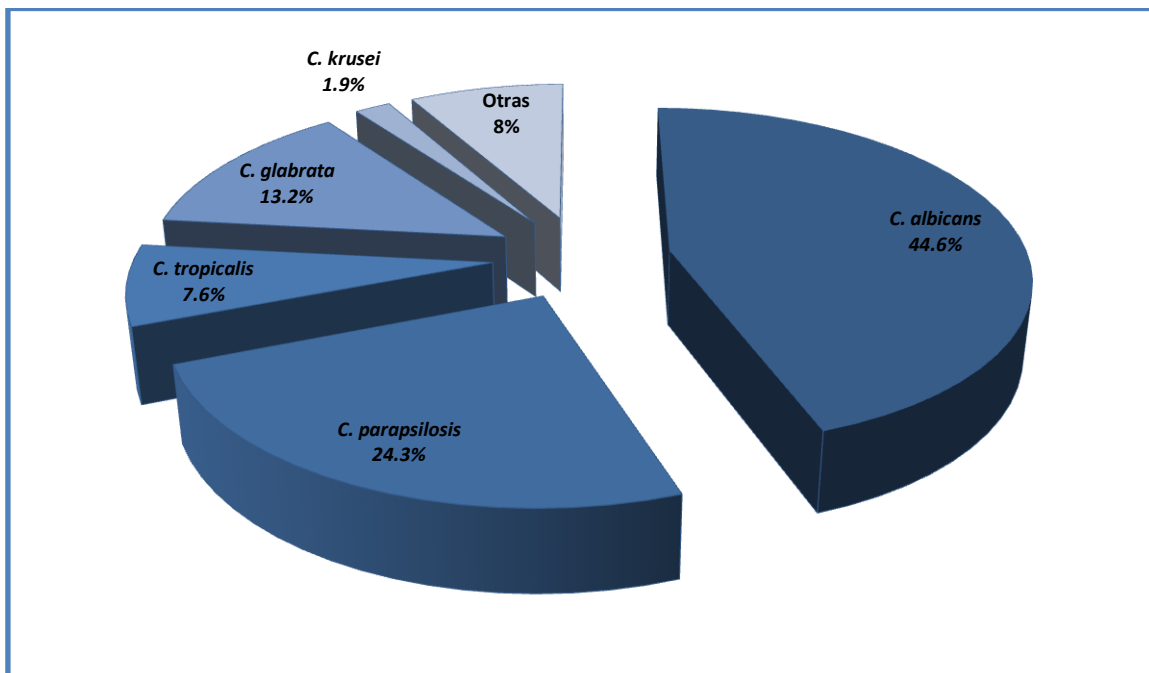


Figura 3. Adaptación de los datos presentados por Guinea y cols.(Guinea, Zaragoza et al., 2014) en un estudio de vigilancia epidemiológica de la candidemia.

La aspergilosis invasiva es la segunda de las EFI en orden de frecuencia, Una neutropenia prolongada es el principal factor de riesgo asociado. Los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y aquellos sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH), con periodos de neutropenia prolongados, están en mayor riesgo pudiendo alcanzar tasas de aspergilosis cercanas al 25% (Oren and Paul, 2014). Sin embargo, la incidencia de aspergilosis invasiva es muy dependiente tanto de la epidemiología local como de la calidad del control aéreo en unidades hemato-oncológicas.

En los últimos años, otros hongos filamentosos han incrementado su proporción de infecciones en poblaciones de pacientes con determinados factores de riesgo, como hongos de los géneros *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y zigomicetos. Estas infecciones fúngicas se caracterizan por su elevado índice de mortalidad, que oscila entre el 40 y el 90% (Alastruey-Izquierdo, Mellado et al., 2013).

Más del 90% de las infecciones causadas por *Aspergillus* spp., están causadas por *Aspergillus fumigatus* y el resto por especies como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y especies recientemente descritas como patógenos humanos como son *A. calidoustus* o *A. lentulus* (Peman and Salavert, 2012b). En recientes estudios se ha comprobado que el porcentaje de las infecciones debidas a *A. fumigatus* ha disminuido hasta valores del 70%, aumentando otras especies como son *A. flavus*, *A. niger* o *A. terreus* (Steinbach, Marr et al., 2012). En el estudio FILPOP publicado en 2013, el género más frecuente fue *Aspergillus* spp. (86.3%) seguido por *Scedosporium* spp. (4.7%), Mucorales (2.5%), *Penicillium* spp (2.2%) y *Fusarium* spp (Alastruey-Izquierdo, Mellado et al., 2013). La correcta identificación a nivel de especie es esencial debido a los diferentes perfiles de sensibilidad que las diferentes especies muestran dentro del mismo género.

El conocimiento de la epidemiología local y el perfil de sensibilidad de las diferentes especies condicionan la instauración de un tratamiento en un paciente en el que no haya habido un aislamiento microbiológico. Hay que tener en cuenta la epidemiología real del entorno, los factores clínicos que afectan al paciente, la unidad donde se encuentra hospitalizado, el centro en el que está ingresado y el país.

El aumento de los casos de EFI causada por cepas con sensibilidad disminuida a antifúngicos es una situación que aparece con relativa frecuencia y complica en gran medida el manejo del paciente. La resistencia en *Aspergillus* spp. puede ser primaria, sin la previa exposición al

antifúngico, o secundaria, tras una exposición inicial que lleva asociada una alteración de la expresión génica. La resistencia a azoles a principios del siglo XXI era de aproximadamente el 2%, pero en países de nuestro entorno ha ido aumentando progresivamente. Un ejemplo es el caso de los Países Bajos, donde ha pasado del 2% en el año 2000 a aproximadamente el 10% en el año 2010. En cambio en otros Países como España o Austria encontramos porcentajes del 2% y el 0% respectivamente. En Estados Unidos, la aparición de cepas con resistencia a azoles es aislada, no llegando al 1% (Mayr and Lass-Flörl, 2011).

## **1.2.- Tratamiento de la EFI.**

### **1.2.1.- Antifúngicos: Mecanismo de acción y espectro de actividad.**

El manejo de la EFI constituye un reto importante en patología infecciosa. En los últimos años el arsenal terapéutico antifúngico disponible ha experimentado una importante mejora. El desarrollo y comercialización de nuevas moléculas con mayor actividad y menor toxicidad han modificado el tratamiento y el pronóstico de la infección fúngica.

La era de la terapia antifúngica sistémica comenzó con la introducción de la anfotericina B deoxicolato en el año 1958. Anfotericina B ha sido el tratamiento de elección durante cuarenta años para el tratamiento de infecciones graves causadas por hongos. Como consecuencia de su elevada nefrotoxicidad, se desarrollaron nuevas moléculas y formulaciones con menor toxicidad y espectro de acción comparable.

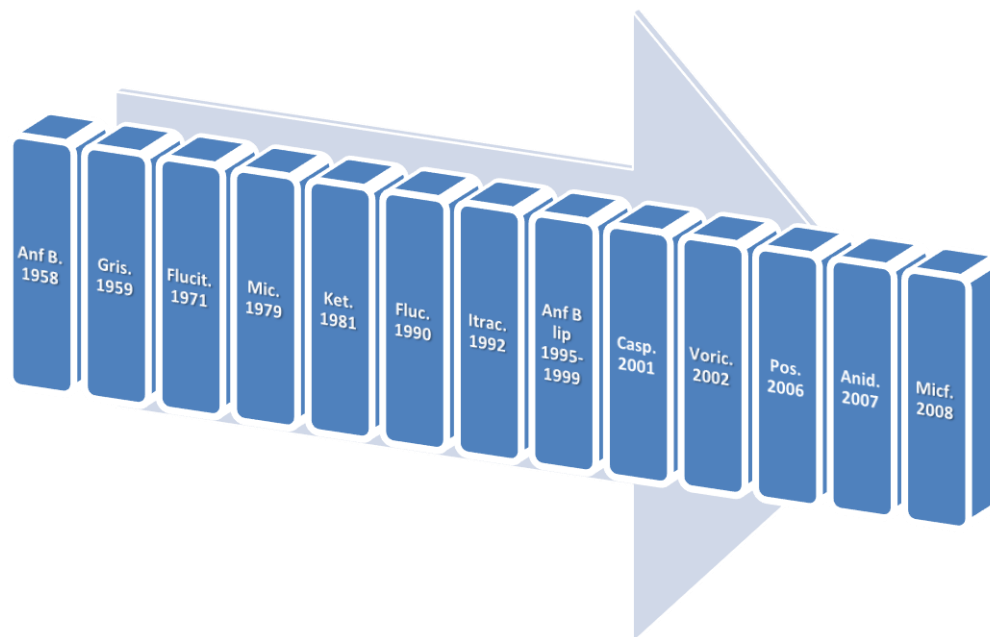


Figura 4: Cronología de la introducción de los fármacos antifúngicos sistémicos. Adaptación de Lewis y cols. *Anf B:anfotericina B; Gris: Griseofulvina; Flucit: flucitosina; Mic: Miconazol; Ket: ketoconazol; Fluc: fluconazol; Itrac: itraconazol; Anf B Lip: anfotericina B lipídicas; Casp: caspofungina; Voric: voriconazol; Anid: anidulafungina; Micf: micafungina; Pos: posaconazol* (Lewis, 2011).

Hasta principios de los años 90, con la introducción de Fluconazol, estas limitaciones no fueron superadas. Éste es un antifúngico con excelente biodisponibilidad por vía oral, una farmacocinética lineal con buena distribución en tejidos, incluyendo líquido cefalorraquídeo y humor vítreo. Fluconazol mostró una gran eficacia en el tratamiento de la candidiasis orofaríngea en pacientes con SIDA. Fluconazol no es activo frente a hongos filamentosos oportunistas y una tiene menor actividad frente a *Candida glabrata* y *Candida krusei*. En 1992 se comercializó itraconazol, un compuesto del grupo de los triazoles con actividad frente a especies de *Aspergillus* pero con limitaciones farmacocinéticas (absorción errática y efectos adversos gastrointestinales), que limitaban su uso en pacientes oncológicos con mucositis, vómitos o náuseas (Lewis, 2011).

La actividad de 5-fluorocitosina se limita exclusivamente a hongos levaduriformes. Muestran resistencia ciertas especies de *Candida* y de *Cryptococcus*, así como *Trichosporon*. Si se utiliza en monoterapia genera resistencia secundaria con facilidad (Cuenca-Estrella, Diaz-Guerra et al., 2001; Cuenca-Estrella, Gomez-Lopez et al., 2006).

La introducción de voriconazol (2002) y posaconazol (2006) cambió el manejo de las infecciones fúngicas en individuos inmunodeprimidos. Voriconazol se ha mostrado más efectivo en el tratamiento de aspergilosis invasora que anfotericina B (Herbrecht, Denning et al., 2002; Walsh, Anaissie et al., 2008), resultando útil en el tratamiento de la fusariosis (Perfect, Marr et al., 2003). Posaconazol ha aportado un espectro ampliado respecto a voriconazol, teniendo actividad además frente a mucorales (Cuenca-Estrella, Gomez-Lopez et al., 2006; Lewis, 2011; van Burik, Hare et al., 2006) y siendo alternativa para el tratamiento de las aspergilosis refractarias a los tratamientos estándar (Walsh, Raad et al., 2007). Estos dos antifúngicos tienen inconvenientes relacionados con sus propiedades farmacocinéticas. Voriconazol posee una farmacocinética no lineal, consecuencia del metabolismo saturable a través del sistema enzimático del citocromo P450, que implica cambios impredecibles en la exposición y gran variabilidad tanto inter como intraindividual e interacciones farmacológicas. Posaconazol posee una farmacocinética lineal, resultando concentraciones sanguíneas proporcionales a las dosis administradas, pero tiene problemas de absorción. Es impredecible en pacientes con patología gástrica como pérdida de apetito, náuseas, diarrea, disfunción gastrointestinal debida a quimioterapia anticancerígena y pacientes en tratamiento con fármacos que modifican el pH gástrico (Alffenaar, van et al., 2009; Krishna, Moton et al., 2009). Los triazoles que están actualmente en desarrollo como isavuconazol, ya aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) norteamericana, parecen tener un espectro de actividad similar a

voriconazol y posaconazol, pero con menos variabilidad farmacocinética e interacciones farmacológicas (Girmenia, 2009; McCormack, 2015).

A principios del siglo XXI surge un nuevo grupo de antifúngicos, las equinocandinas. Se trata de compuestos de naturaleza lipopeptídica con actividad antifúngica. Su diana es la pared fúngica, poseen pocos efectos secundarios y tienen una farmacocinética muy poco variable y predecible. Por el contrario, no tiene actividad frente a ciertos hongos oportunistas, como *Cryptococcus spp.*, y hongos filamentosos menos comunes como son *Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.* y mucorales.

El espectro de actividad de los antifúngicos es muy variable entre las diferentes familias y los diferentes antifúngicos. En la figura 5 se representa de forma esquemática el espectro de actividad de los principales antifúngicos.

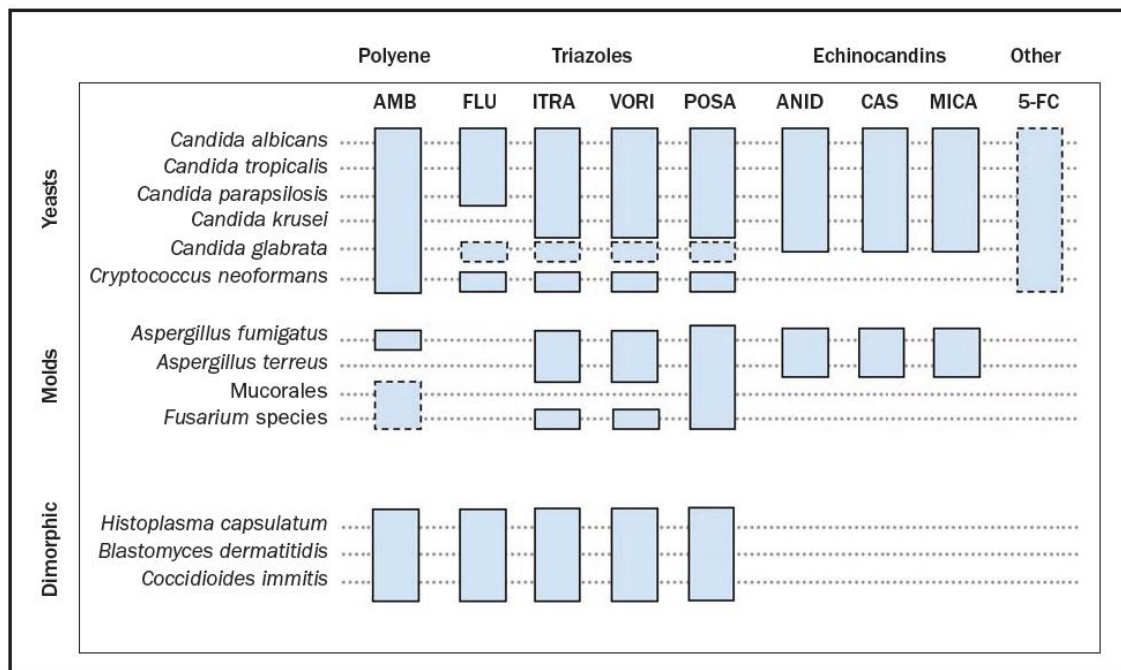


Figura 5: Espectro de actividad de los agentes antifúngicos (Lewis, 2011).

### Mecanismos de acción.

Los hongos son metabólicamente similares a las células de mamíferos y tienen pocas dianas específicas propias. Los antifúngicos sistémicos se pueden agrupar en función del lugar de acción en la célula fúngica, como se muestra en la figura 5.

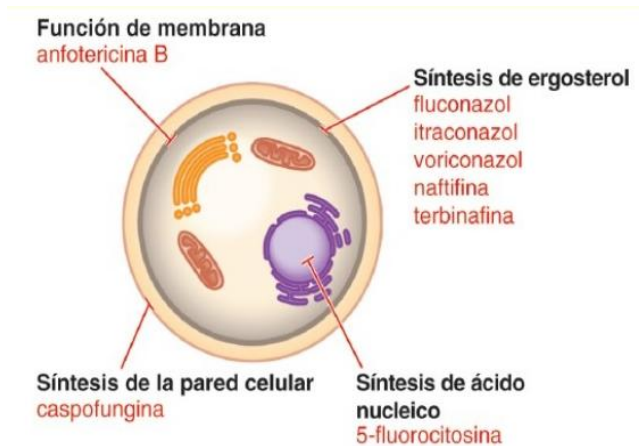


Figura 6: sitios de acción y mecanismos de los antifúngicos de uso sistémico (<http://es.slideshare.net/OswaldoAngeles/antimicoticos-15781749>).

Los triazoles actúan en la ruta de la síntesis del ergosterol, inhibiendo la lanosterol-14 $\alpha$ -desmetilasa, localizada en el retículo endoplasmático provocando la acumulación de esteroides 14 $\alpha$ -metilados tóxicos. Evitan el crecimiento de la membrana celular y provocan la muerte de la célula fúngica. Anfotericina B es el otro antifúngico que actúa en la membrana celular de la célula fúngica. Se une directamente al ergosterol, formando complejos que se intercalan en la membrana celular que dan como resultado la formación de poros y la salida del contenido intracelular (Lewis, 2011). Así mismo, recientemente se ha demostrado que anfotericina B induce la formación de especies reactivas de oxígeno que contribuyen a su acción fungicida (Mesa-Arango, Trevijano-Contador et al., 2014).

Las equinocandinas (micafungina, caspofungina y anidulafungina) son la única clase de antifúngicos sistémicos que actúan a nivel de la pared fúngica mediante la inhibición competitiva de la síntesis de los polímeros de  $\beta$ -1,3-D-glucano. La pared de la célula se hace más susceptible a la lisis osmótica, hecho especialmente evidente en las células de crecimiento rápido (Lewis, 2011). Esto hace que las equinocandinas actúen como fungicidas frente especies de *Candida*, y sean fungistáticos frente *Aspergillus spp.* (Denning, 2002).

Por último, 5-Fluorocitosina actúa mediante la inhibición de la timidilato sintetasa, causando errores en la codificación del ARN (Lewis, 2011).

### **Toxicidad y efectos secundarios.**

Los triazoles presentan una amplia gama de efectos secundarios. Además de los efectos secundarios inespecíficos como cefaleas, mialgias y síntomas gastrointestinales inespecíficos, hay efectos secundarios específicos. Todos los triazoles son potencialmente hepatotóxicos y voriconazol tiene efectos dermatológicos como rash, fototoxicidad y puede provocar cáncer de células escamosas. Posee efectos tóxicos sobre la visión y el sistema nervioso central. Itraconazol y posaconazol tienen efectos secundarios gastrointestinales (Herbrecht, Denning et

al., 2002; Ruiz-Camps and Cuenca-Estrella, 2009). Tanto anfotericina B como 5- flucitosina, pueden causar supresión de la médula ósea. Anfotericina B ha demostrado una importante toxicidad renal (Lewis, 2011). Las equinocandinas son los antifúngicos que mejor perfil de seguridad tienen, con escasos efectos adversos relacionados con la administración mediante infusión intravenosa (Ruiz-Camps and Cuenca-Estrella, 2009).

### 1.2.2 Principales Indicaciones clínicas.

El desarrollo de nuevas moléculas antifúngicas de mayor potencia y propiedades cinéticas más favorables es un hecho muy positivo en nuestros días. Se dispone de nuevos fármacos y la realización de estudios amplios y contrastados ha permitido obtener nuevas evidencias para elaborar guías de tratamiento y avanzar en el manejo de la EFI.

Estas nuevas estrategias (régimenes de profilaxis y tratamientos anticipados) persiguen evitar la aparición de una EFI e instaurar el tratamiento más adecuado en el menor tiempo posible. Además, la individualización de la terapia antifúngica constituye un valor añadido para poder controlar con eficacia aquellos factores que influyen en la evolución de los pacientes como son las interacciones farmacológicas, comorbilidades, inmunosupresión, tipo de infección, tipo de patógeno, etc...(Lewis, 2011).

Las principales indicaciones clínicas se muestran en la tabla 5:

Antifúngico	Indicación	Terapia
<b>Voriconazol</b>	Aspergilosis invasiva; Aspergilosis crónica	Primera línea; Alternativa
	Tratamiento candidiasis invasora en niños hematológicos	Primera línea
	Tratamiento candidemia adultos no neutropénicos	Alternativa
<b>Itraconazol</b>	Profilaxis aspergilosis invasiva	Alternativa
	Tratamiento candidiasis invasora en niños hematológicos	Alternativa
	Micosis endémicas	Primera línea
	Tratamiento aspergilosis crónica	Alternativa
<b>Posaconazol</b>	Profilaxis aspergilosis invasiva	Primera línea
	Tratamiento candidiasis invasora en niños hematológicos	Alternativa
	Zigomicosis	Terapia de rescate
<b>Fluconazol</b>	Tratamiento Candidemia, profilaxis Candidiasis invasora	Primera línea

	Tratamiento candidiasis invasora	Alternativa
	Tratamiento candidiasis invasora en niños hematológicos	Primera línea
<b>Anfotericina B</b>	Aspergilosis invasiva	Alternativa
	Candidiasis invasiva	Primera línea y alternativa
	Neutropenia febril	Primera línea
	Profilaxis secundaria	Primera línea
	Mucormicosis y criptococosis grave del Sistema Nervioso Central	Alternativa y Primera línea.
<b>5-fluorocitosina</b>	Meningitis criptocócica en combinación con Anfotericina B	Primera línea
<b>Caspofungina</b>	Tratamiento candidemia adultos no neutropénicos	Primera línea
	Tratamiento candidiasis orofaríngea y esofágica	Primera línea
	Neutropenia febril	Alternativa
	Aspergilosis refractaria	Tratamiento de rescate
<b>Micafungina</b>	Profilaxis aspergilosis invasiva	Alternativa
	Tratamiento candidemia adultos no neutropénicos	Primera línea
	Candidiasis sistémica en neutropénicos	Alternativa
	Profilaxis candidiasis invasora y orofaríngea	Alternativa
<b>Anidulafungina</b>	Tratamiento candidemia adultos no neutropénicos	Primera línea
	Candidemia orofaríngea	Alternativa

Tabla 2: indicaciones de los diferentes antifúngicos sistémicos tomadas de diferentes guías, publicaciones y recomendaciones de sociedades científicas (Andes, Pascual et al., 2009; Blyth, Gilroy et al., 2014; Cornely, Bassetti et al., 2012; Fortún, Carratalá et al., 2011; Hope, Castagnola et al., 2012; Lortholary, Petrikos et al., 2012; Ruiz-Camps and Cuenca-Estrella, 2009; Ullmann, Akova et al., 2012; Walsh, Anaissie et al., 2008).

## Bibliografía

Alastruey-Izquierdo,A., Mellado,E., Pelaez,T., Peman,J., Zapico,S., Alvarez,M., Rodriguez-Tudela,J.L., Cuenca-Estrella,M., 2013. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 3380-3387.

Alffenaar,J.W., van,A.S., van der Werf,T.S., Kosterink,J.G., Uges,D.R., 2009. Omeprazole significantly reduces posaconazole serum trough level. *Clin. Infect. Dis.*, 48, 839.

Andes,D., Pascual,A., Marchetti,O., 2009. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 24-34.

Bitar,D., Lortholary,O., Le,S.Y., Nicolau,J., Coignard,B., Tattevin,P., Che,D., Dromer,F., 2014. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg. Infect. Dis.*, 20, 1149-1155.

Blyth,C.C., Gilroy,N.M., Guy,S.D., Chambers,S.T., Cheong,E.Y., Gottlieb,T., McGuinness,S.L., Thursky,K.A., 2014. Consensus guidelines for the treatment of invasive mould infections in haematological malignancy and haemopoietic stem cell transplantation, 2014. *Intern. Med. J.*, 44, 1333-1349.

Bouza,E., Munoz,P., 2008. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 32 Suppl 2, S87-S91.

Cornely,O.A., Bassetti,M., Calandra,T., Garbino,J., Kullberg,B.J., Lortholary,O., Meersseman,W., Akova,M., Arendrup,M.C., Arikan-Akdagli,S., Bille,J., Castagnola,E., Cuenca-Estrella,M., Donnelly,J.P., Groll,A.H., Herbrecht,R., Hope,W.W., Jensen,H.E., Lass-Flörl,C., Petrikos,G., Richardson,M.D., Roilides,E., Verweij,P.E., Viscoli,C., Ullmann,A.J., 2012. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18 Suppl 7, 19-37.

Cuenca-Estrella,M., Diaz-Guerra,T.M., Mellado,E., Rodriguez-Tudela,J.L., 2001. Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 20, 276-279.

Cuenca-Estrella,M., Gomez-Lopez,A., Mellado,E., Buitrago,M.J., Monzon,A., Rodriguez-Tudela,J.L., 2006. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 917-921.

Denning,D.W., 2002. Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49, 889-891.

Fortún, J., Carratalá, J., Gavaldá, J., Lizasoain, M., Salavert, M., de la Cámara, R., Borges,M., Cervera, C., Garnacho, J., Lassaleta, A., Lumbreras, C., Sanz, M.A., , Ramos, J.T., , Torre-Cisneros, J., Aguado, J.M., Cuenca-Estrella, M., 2011. Guidelines for the Treatment of Invasive Fungal Disease by *Aspergillus* spp. and Other Fungi Issued by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2011 Update. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Jun-Jul;29(6):435-54

Girmania,C., 2009. New generation azole antifungals in clinical investigation. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 18, 1279-1295.

Guinea,J., Zaragoza,O., Escribano,P., Martin-Mazuelos,E., Peman,J., Sanchez-Reus,F., Cuenca-Estrella,M., 2014. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58, 1529-1537.

Herbrecht,R., Denning,D.W., Patterson,T.F., Bennett,J.E., Greene,R.E., Oestmann,J.W., Kern,W.V., Marr,K.A., Ribaud,P., Lortholary,O., Sylvester,R., Rubin,R.H., Wingard,J.R., Stark,P., Durand,C., Caillot,D., Thiel,E., Chandrasekar,P.H., Hodges,M.R., Schlamm,H.T., Troke,P.F., de Pauw,B., 2002. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*, 347, 408-415.

Hope,W.W., Castagnola,E., Groll,A.H., Roilides,E., Akova,M., Arendrup,M.C., Arikan-Akdagli,S., Bassetti,M., Bille,J., Cornely,O.A., Cuenca-Estrella,M., Donnelly,J.P., Garbino,J., Herbrecht,R., Jensen,H.E., Kullberg,B.J., Lass-Florl,C., Lortholary,O., Meersseman,W., Petrikos,G., Richardson,M.D., Verweij,P.E., Viscoli,C., Ullmann,A.J., 2012. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and

management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. Clin. Microbiol. Infect., 18 Suppl 7, 38-52.

Jehangir,W., Tadopalli,G.S., Sen,S., Regevik,N., Sen,P., 2015. Coccidioidomycosis and Blastomycosis: Endemic Mycotic Co-Infections in the HIV Patient. J. Clin. Med. Res., 7, 196-198.

Krishna,G., Moton,A., Ma,L., Medlock,M.M., McLeod,J., 2009. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. Antimicrob. Agents Chemother., 53, 958-966.

Kullberg,B.J., Verweij,P.E., Akova,M., Arendrup,M.C., Bille,J., Calandra,T., Cuenca-Estrella,M., Herbrecht,R., Jacobs,F., Kalin,M., Kibbler,C.C., Lortholary,O., Martino,P., Meis,J.F., Munoz,P., Odds,F.C., De Pauw,B.E., Rex,J.H., Roilides,E., Rogers,T.R., Ruhnke,M., Ullmann,A.J., Uzun,O., Vandewoude,K., Vincent,J.L., Donnelly,J.P., 2011. European expert opinion on the management of invasive candidiasis in adults. Clin. Microbiol. Infect., 17 Suppl 5, 1-12.

Lewis,R.E., 2011. Current concepts in antifungal pharmacology. Mayo Clin. Proc., 86, 805-817.

Lortholary,O., Petrikos,G., Akova,M., Arendrup,M.C., Arikian-Akdagli,S., Bassetti,M., Bille,J., Calandra,T., Castagnola,E., Cornely,O.A., Cuenca-Estrella,M., Donnelly,J.P., Garbino,J., Groll,A.H., Herbrecht,R., Hope,W.W., Jensen,H.E., Kullberg,B.J., Lass-Flörl,C., Meersseman,W., Richardson,M.D., Roilides,E., Verweij,P.E., Viscoli,C., Ullmann,A.J., 2012. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. Clin. Microbiol. Infect., 18 Suppl 7, 68-77.

Mayr,A., Lass-Flörl,C., 2011. Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. Eur. J. Med. Res., 16, 153-157.

McCormack,P.L., 2015. Isavuconazonium: first global approval. Drugs, 75, 817-822.

Mesa-Arango,A.C., Trevijano-Contador,N., Roman,E., Sanchez-Fresneda,R., Casas,C., Herrero,E., Arguelles,J.C., Pla,J., Cuenca-Estrella,M., Zaragoza,O., 2014. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic

yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58, 6627-6638.

Oren,I., Paul,M., 2014. Up to date epidemiology, diagnosis and management of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 20 Suppl 6, 1-4.

Peman,J., Canton,E., Minana,J.J., Florez,J.A., Echeverria,J., Ortega,D.N., Alarcon,J.M., Fontanals,D., Sard,B.G., Moreno,B.B., Torroba,L., Ayats,J., Perez,M.A., Fernandez,M.A., Reus,F.S., Natal,I.F., Garcia,G.R., Ezpeleta,G., Martin-Mazuelos,E., Iglesias,I., Rezusta,A., de Ocariz,I.R., Nieto,A.G., 2011. [Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study]. *Rev. Iberoam. Micol.*, 28, 91-99.

Peman,J., Salavert,M., 2012a. [General epidemiology of invasive fungal disease]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 30, 90-98.

Peman,J., Salavert,M., 2012b. [General epidemiology of invasive fungal disease]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 30, 90-98.

Perfect,J.R., Marr,K.A., Walsh,T.J., Greenberg,R.N., DuPont,B., Torre-Cisneros,J., Just-Nubling,G., Schlamm,H.T., Lutsar,I., Espinel-Ingroff,A., Johnson,E., 2003. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.*, 36, 1122-1131.

Puig-Asensio,M., Padilla,B., Garnacho-Montero,J., Zaragoza,O., Aguado,J.M., Zaragoza,R., Montejo,M., Munoz,P., Ruiz-Camps,I., Cuenca-Estrella,M., Almirante,B., 2014. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.*, 20, O245-O254.

Ruiz-Camps,I., Cuenca-Estrella,M., 2009. [Antifungals for systemic use]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 27, 353-362.

Steinbach,W.J., Marr,K.A., Anaissie,E.J., Azie,N., Quan,S.P., Meier-Kriesche,H.U., Apewokin,S., Horn,D.L., 2012. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J. Infect.*.

Ullmann,A.J., Akova,M., Herbrecht,R., Viscoli,C., Arendrup,M.C., Arikan-Akdagli,S., Bassetti,M., Bille,J., Calandra,T., Castagnola,E., Cornely,O.A., Donnelly,J.P., Garbino,J., Groll,A.H., Hope,W.W., Jensen,H.E., Kullberg,B.J., Lass-Florl,C., Lortholary,O., Meersseman,W., Petrikos,G., Richardson,M.D., Roilides,E., Verweij,P.E., Cuenca-Estrella,M., 2012. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin. Microbiol. Infect.*, 18 Suppl 7, 53-67.

van Burik,J.A., Hare,R.S., Solomon,H.F., Corrado,M.L., Kontoyiannis,D.P., 2006. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect. Dis*, 42, e61-e65.

Walsh,T.J., Anaissie,E.J., Denning,D.W., Herbrecht,R., Kontoyiannis,D.P., Marr,K.A., Morrison,V.A., Segal,B.H., Steinbach,W.J., Stevens,D.A., van Burik,J.A., Wingard,J.R., Patterson,T.F., 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 46, 327-360.

Walsh,T.J., Raad,I., Patterson,T.F., Chandrasekar,P., Donowitz,G.R., Graybill,R., Greene,R.E., Hachem,R., Hadley,S., Herbrecht,R., Langston,A., Louie,A., Ribaud,P., Segal,B.H., Stevens,D.A., van Burik,J.A., White,C.S., Corcoran,G., Gogate,J., Krishna,G., Pedicone,L., Hardalo,C., Perfect,J.R., 2007. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect. Dis*, 44, 2-12.

### 1.3.- Farmacología clínica. Conceptos generales.

#### 1.3.1.- Concepto.

Farmacología se define como la ciencia que estudia los fármacos. Cuando la Farmacología se dirige al estudio del comportamiento y utilización de los fármacos en el hombre sano y enfermo, se denomina Farmacología Clínica, teniendo como objeto de estudio el uso de los fármacos en la población general, en subgrupos específicos y en pacientes concretos.

La farmacología clínica estudia la acción de los fármacos sobre el organismo humano y la influencia de éste sobre las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de éstos. También se ocupa de que la utilización de los fármacos sea óptima, aumentando su eficacia y disminuyendo los riesgos asociados a su uso.

Estos objetivos se pueden alcanzar mediante la aplicación de metodologías y actividades como la individualización del tratamiento farmacológico (monitorización), programas de farmacovigilancia, realización de ensayos clínicos, estudios de utilización de medicamentos e información sobre los fármacos, así como el desarrollo y elaboración de estudios farmacocinéticos.

La farmacocinética a su vez, estudia todos los procesos y los factores que pueden influir en los diferentes procesos del L.A.D.M.E. (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción). El conocimiento y control de estos procesos favorece el diseño de la posología más adecuada en pacientes concretos. Para ello es necesario el conocimiento de los parámetros cinéticos en distintos tipos de pacientes, y por ello, en los últimos años ha ganado relevancia la *farmacocinética poblacional*, que se encarga del estudio de la variabilidad intra e interindividual de los parámetros farmacocinéticos básicos y la influencia sobre los mismos de diversas variables, como son las condiciones fisiopatológicas y clínicas en poblaciones definidas de pacientes.

Otra de las funciones de la farmacocinética corresponde al control y ajuste de las dosis, con el objetivo de individualizar la terapia y adaptarlas a las condiciones de cada paciente. Hay otras funciones no tan conocidas, pero que no por ello menos importantes, como son la detección diagnóstica (casos de incumplimiento, problemas de biodisponibilidad, errores de medicación, interacciones, efectos farmacogenéticos, etc...), consulta y asesoramiento en caso de intoxicaciones medicamentosas así como el análisis retrospectivo de errores terapéuticos o tratamientos inadecuados. La individualización de la dosis es un factor importante que no se puede ignorar, ya que las consecuencias pueden ser intoxicaciones o fracasos terapéuticos innecesarios.

### 1.3.2.- Monitorización.

La respuesta terapéutica varía de unos pacientes a otros en función de las características del fármaco, de la forma farmacéutica en que se administre, de las características del paciente y su enfermedad y de las interacciones con otros fármacos que se administren simultáneamente. El conjunto de estos factores hacen que las dosis estándar puedan ser ineficaces en unos pacientes y tóxicas en otros. La finalidad es individualizar el tratamiento farmacológico, adaptándolo a las necesidades de cada paciente.

Se considera que para que la monitorización de un fármaco sea útil en la práctica clínica deben cumplirse los requisitos expuestos en la tabla 3.

Si no hay proporcionalidad entre dosis y nivel sanguíneo, y exista relación entre nivel sanguíneo y efecto, más útil resultará la determinación de los niveles en el control del tratamiento.

---

#### 1.- Que sea necesaria. Fármacos con las siguientes características:

Índice terapéutico pequeño.  
Difícil valoración clínica de la eficacia.  
Difícil valoración clínica de la toxicidad.  
Asegurar eficacia y prevenir toxicidad.  
Control de cumplimiento.  
Ajustes de dosis complejos.

---

#### 2.- Que esté justificada

Variabilidad dosis-nivel.  
Cinética dosis dependiente.  
Intervalo óptimo establecido.  
Método analítico asequible y fiable.  
Conocimiento de la farmacocinética y farmacodinamia.  
Útil en la práctica clínica.

---

#### 3.- Que se use correctamente:

Extracción de la muestra correcta.  
Resultado fiable.  
Interpretación desde el punto de vista farmacodinámico y farmacocinético.  
El nivel sérico como una ayuda y no una guía de tratamiento.

---

Tabla 3: requisitos para la monitorización de niveles séricos (Adaptada de Calvo M.V. <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo1/cap212.pdf>. Farmacia hospitalaria; Capítulo 2.12. Farmacocinética humana).

Se utilizarán criterios clínicos cuando se pueden valorar fácilmente los efectos terapéuticos o tóxicos de los fármacos. Cuando esto no es posible, se monitorizan constantes vitales (como la presión arterial) o parámetros bioquímicos. Cuando no es posible emplear estos criterios anteriores, puede considerarse la ineficacia como resistencia y decidir asociar otros fármacos, y la toxicidad como intolerancia y decidir por lo tanto sustituir el fármaco por otro en lugar de ajustar la dosis. En estos casos puede emplearse la determinación de niveles sanguíneos de fármacos para individualizar el tratamiento, siempre que la eficacia y la toxicidad estén relacionadas con dichos niveles.

El principio de la monitorización de niveles sanguíneos de fármacos se basa en que el efecto farmacológico depende de las concentraciones que estos alcancen en su lugar de acción (exposición). Esta evaluación de niveles no está justificada para todos los fármacos y para todos los pacientes y circunstancias. El objetivo final es la individualización de la dosis para obtener el máximo efecto terapéutico en el menor tiempo posible y con el menor riesgo de toxicidad para el paciente. Con la monitorización se pretende adecuar la pauta posológica a través de las concentraciones sanguíneas del fármaco. Las aportaciones más recientes aplicables a esta estrategia han sido la caracterización de la farmacocinética de poblaciones, definición de concentraciones diana para algunos fármacos y los ensayos clínicos randomizados y controlados por las concentraciones de fármaco.

La monitorización de niveles sanguíneos consta de dos etapas: determinación de las concentraciones e interpretación de las mismas.

### **Recomendaciones para conseguir la máxima utilidad de la monitorización.**

Tiempo de muestreo: En la determinación de las concentraciones es importante el tiempo de muestreo. La selección apropiada de estos tiempos es importante, ya que una inadecuada estrategia de muestreo puede conllevar pautas de dosificación incorrectas, dando lugar a ausencia de eficacia o la aparición de efectos tóxicos.

Para que las muestras tengan utilidad desde el punto de vista farmacocinético, deben ser obtenidas de acuerdo a los siguientes criterios:

1. Una vez alcanzado el equilibrio de distribución del fármaco entre sangre y el resto de fluidos, órganos y tejidos. Solo cuando se alcanza este equilibrio, las concentraciones sanguíneas pueden constituir un índice válido de las concentraciones en el lugar de acción. Las concentraciones deben fluctuar lo menos posible entre un valor máximo y un mínimo. El tiempo requerido para alcanzar este equilibrio depende de la velocidad de eliminación del fármaco ( $K_e$ ), o vida media de eliminación del fármaco ( $t_{1/2}$ ). En general se considera alcanzado el estado estacionario de un fármaco una vez transcurridas entre tres y cinco  $t_{1/2}$ .
2. El tiempo de muestreo. El tiempo de determinación viene condicionado por la vía de administración del fármaco y tipo de fármaco. Por vía oral las concentraciones más útiles vienen dadas por las concentraciones valle, antes de la siguiente administración. Por perfusión endovenosa las muestras pueden ser obtenidas a cualquier tiempo. Y por vía endovenosa tipo bolus y perfusiones intermitentes, interesan concentraciones máximas o mínimas, dependiendo del fármaco monitorizado.
3. Cuando por razones clínicas hay una necesidad de análisis.

Para la selección de los tiempos de muestreo se deben considerar, además de los anteriormente expuestos, las características cinéticas del fármaco, la vía de administración y la forma de dosificación utilizada, así como el tipo de pacientes y el objetivo que persigue la monitorización. Es fundamental para una correcta interpretación del resultado el conocimiento exacto y preciso del momento en el que se han tomado las muestras en relación con la administración de la última dosis de fármaco, así como conocer el Rango Terapéutico, definido como el intervalo de concentraciones plasmáticas que están comprendidas entre la mínima que produce el efecto terapéutico (Concentración Mínima Eficaz) y la máxima que se puede alcanzar sin que aparezca toxicidad grave (Concentración Mínima Tóxica). La representación gráfica del rango terapéutico se muestra en la figura 7.

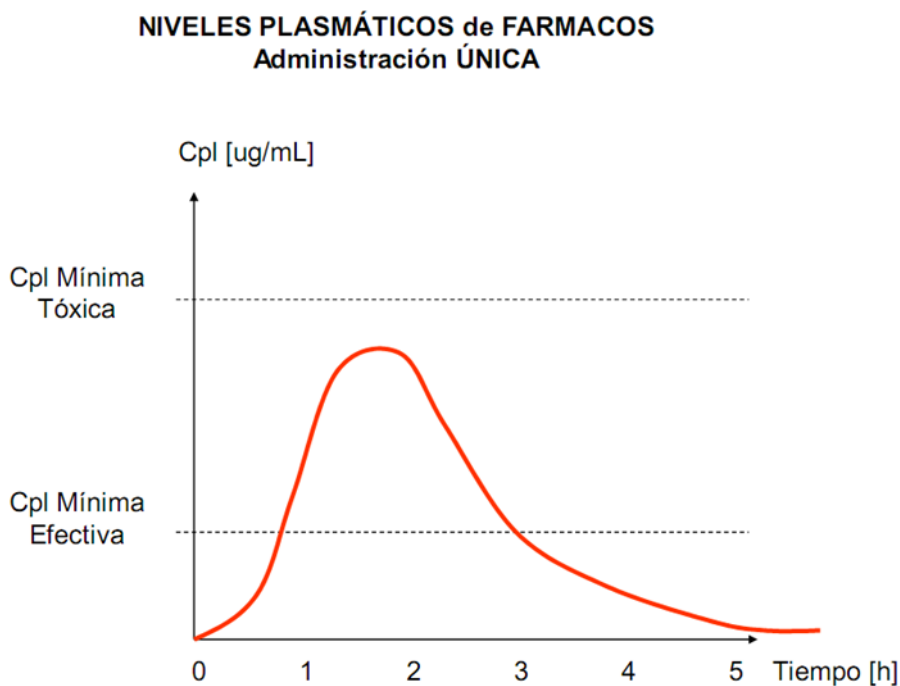


Figura 7: Representación gráfica de rango terapéutico.

Por debajo de este intervalo es frecuente la ineficacia del tratamiento, y por encima hay más probabilidad de que aparezcan efectos tóxicos. Como existen factores que alteran la relación entre nivel sanguíneo y efecto terapéutico, el nivel sanguíneo no debe ser una guía prioritaria del tratamiento, sino una ayuda más supeditada siempre a la respuesta clínica observada en el paciente.

#### Tipo de muestra

La concentración efectiva del fármaco es aquella que llega al lugar de acción y está disponible para proporcionar un efecto. Por consenso se establece que, ante la dificultad de obtener muestras biológicas apropiadas (líquidos internos, tejido...), la concentración sanguínea (suero, plasma, a partir de sangre venosa) constituye un fiel reflejo de la cantidad de fármaco que

alcanza el lugar de acción en el estado estacionario. Se cuantifican las concentraciones totales de fármaco, siendo esta concentración la suma de las fracciones de fármaco libre y unido a proteínas. La fracción libre es un porcentaje constante del total, de esta manera, la concentración total es orientativa de los efectos farmacológicos esperados. La determinación de la concentración total es más simple y aunque existen técnicas analíticas, como la ultrafiltración y la diálisis, que permiten la cuantificación de la concentración unida a proteínas plasmáticas de un fármaco, éstas son técnicas más complejas, costosas, y sujetas a mayor posibilidad de error. La utilidad de esta determinación está muy limitada a situaciones muy concretas y no es superior a la determinación de fármaco total en suero.

Puede ser conveniente el uso de otros fluidos cuando el fármaco se une a proteínas plasmáticas en un alto porcentaje, y por diferentes causas esta proporción puede estar alterada. Por ejemplo, el uso de saliva se ha descrito como conveniente, sencillo y útil para antibióticos (Kiang and Ensom, 2015). Calculando la proporción de fármaco presente en saliva respecto al fármaco presente en sangre, siempre que sea constante, puede dar una aproximación fiable de las concentraciones plasmáticas y/o séricas.

La determinación de concentraciones de fármacos en orina resulta útil cuando el fármaco es eliminado de manera inalterada por la orina, y lo hace en una manera proporcional y constante a las concentraciones presentes en suero y/o plasma. Siguiendo el planteamiento de la obtención de muestras no invasivas, pueden usarse como fluidos para estudios farmacocinéticos el sudor, las lágrimas y la leche, con la dificultad de establecer previamente la proporción en la que se eliminan y su correlación con las concentraciones plasmáticas y/o séricas, la obtención y preparación de la muestra y las dificultades asociadas a estos procedimientos.

#### Disponibilidad de técnicas analíticas fiables

Hay que tener en cuenta, como anteriormente se ha comentado, la relación coste-beneficio. Si las concentraciones se determinan de una manera incorrecta (por inadecuada obtención de las muestras o por el uso de una técnica analítica poco fiable), o bien no se adopta la actitud terapéutica adecuada (por interpretación incorrecta de los resultados), los pacientes no se beneficiarían de la información proporcionada por la monitorización. Solo se deben monitorizar niveles séricos cuando se puede garantizar un uso adecuado, una técnica fiable y una interpretación correcta.

#### Principales indicaciones y utilidad de la monitorización de fármacos:

El objetivo final de la monitorización es la optimización de la terapia. Alcanzar este objetivo no solo depende del fármaco utilizado, también del paciente y su situación clínica.

Las alteraciones farmacocinéticas y farmacodinámicas dependientes de la edad son importantes en los extremos de la vida. La politerapia presenta un elevado riesgo de interacciones, que se pueden detectar y controlar mediante la monitorización. Los pacientes en los que se recomienda la monitorización se muestran en la tabla 4.

<b>1.- Pacientes pediátricos y geriátricos.</b>
<b>2.- Pacientes sometidos a politerapia.</b>
<b>3.-Riesgo alto de incumplimiento (Tuberculosis, SIDA, Transplantes, asma).</b>
<b>4.- Respuestas anómalas a dosis habituales.</b>
<b>5.-Factores patológicos (Insuf. renal, hepática, cardíaca...)</b>
<b>6.- Infradosificación con consecuencias graves (críticos, oncológicos, neonatos)</b>

Tabla 4: poblaciones en las que está recomendado la monitorización de niveles séricos.

Una vez justificada la monitorización en un determinado paciente, por su situación clínica y/o las características del tratamiento administrado, es importante conocer cómo interpretar los resultados obtenidos para que puedan aplicarse con eficacia.

La correcta utilización de la monitorización debe seguir lo más fielmente posible el siguiente esquema:

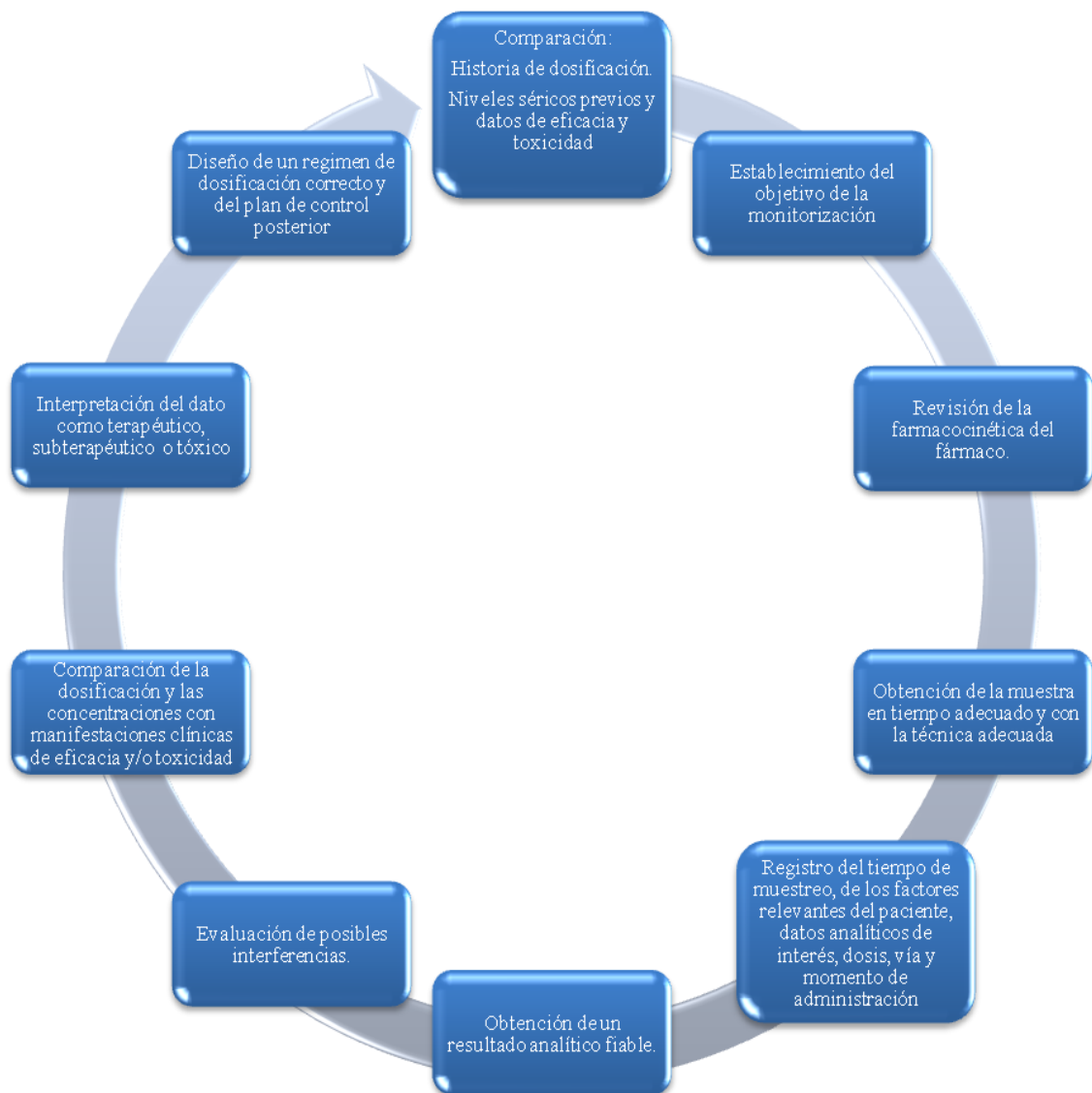


Figura 8: esquema para la correcta utilización de la monitorización.

El rango terapéutico, necesario para evaluar la eficacia de un fármaco, no debe ser una guía única. Por ello es necesario integrar todos los datos recopilados del paciente, la experiencia y la respuesta farmacológica real. Para poder optimizar la dosificación se necesitan datos de sensibilidad del paciente, respuesta clínica, concentraciones obtenidas y perfil farmacocinético individual. Actualmente se prefiere esta opción a los métodos más tradicionales de mantener las concentraciones dentro del margen terapéutico sin considerar la respuesta individual del paciente.

#### Interpretación farmacocinética y modelos farmacocinéticos

Para la interpretación del comportamiento farmacocinético de un compuesto en un modelo vivo, y estimar un rango terapéutico útil, hay que simplificar el complejo sistema biológico del organismo y los procesos que el fármaco puede experimentar en él. El modelo farmacocinético permite caracterizar el comportamiento básico del fármaco en cuanto a distribución y eliminación, y caracterizar la exposición mediante ecuaciones que describen la evolución de las concentraciones en función del tiempo. Con estas ecuaciones se calculan parámetros farmacocinéticos en el individuo, y en función de estos se estima su rango terapéutico.

Dado que el número de muestras que se obtienen de cada paciente es limitado, es necesario recurrir a modelos no compartimentales y bicompartimentales. El modelo no compartimental considera el organismo como un sistema homogéneo. Los cálculos que permiten determinar los parámetros que describen el perfil cinético del fármaco son relativamente simples, y permiten realizar predicciones adecuadas tanto de concentraciones como de dosificaciones. Este modelo es el más frecuentemente utilizado en estudios cinéticos aplicados.

Para fármacos con una distribución más amplia y lenta a tejidos, es preferible usar un modelo bicompartimental. Este modelo realiza mejores predicciones para fármacos con una marcada fase de distribución. Para ello son necesarios gran cantidad de datos y complejos diseños experimentales. .

En la actualidad la disponibilidad de programas informáticos especializados, que contemplan diferentes modelos farmacocinéticos, han contribuido a avanzar en el establecimiento de parámetros individuales y rangos terapéuticos de utilidad. En el caso de los triazoles de uso sistémico, objeto de esta tesis, los rangos terapéuticos descritos se detallan en la publicación incluida en esta introducción (Cendejas, Cuenca-Estrella et al. 2014).

### **Bibliografía**

Calvo M.V. <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo1/cap212.pdf>. Farmacia hospitalaria; Capítulo 2.12. Farmacocinética humana.

Cendejas-Bueno E, Cuenca-Estrella M, Gómez-López A., 2013. Clinical indications for therapeutic drug monitoring of antifungal agents. In the way for optimizing the treatment of fungal infection. Rev Esp Quimioter. 2014 Mar;27(1):1-16

Jesús Flórez, Juan Antonio Armijo y África Mediavilla. 2003 Masson S.A. Farmacología humana; 4ª Edición

Kiang,T.K., Ensom,M.H., 2015. A Qualitative Review on the Pharmacokinetics of Antibiotics in Saliva: Implications on Clinical Pharmacokinetic Monitoring in Humans. Clin Pharmacokinet. 2015 Sep 7. [Epub ahead of print]

## 1.4.-Técnicas para la monitorización de niveles séricos y plasmáticos de fármacos.

### 1.4.1.- Introducción.

Para que la monitorización sea útil y el método analítico sea exitoso, el desarrollo de la metodología debe seguir dos pasos básicos:

- Debe responder al problema analítico que se plantea. Qué fármaco se necesita analizar y qué características químicas presenta, así como rango de concentraciones que haya que determinar (las concentraciones máximas y mínimas).
- En qué tipo de muestras se aplicará: Tipo de fluido biológico en el que es necesario evaluar concentración del antifúngico. Será la matriz analítica a analizar. Se analizará también la estabilidad de las muestras, el tiempo de muestreo y condiciones de extracción de la muestra. Debe aplicarse un proceso de validación correcto, que asegure su validez en las muestras a analizar. La validación del método incluye exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y de cuantificación, rango de linealidad y reproducibilidad.

Las metodologías más habitualmente desarrolladas y aplicadas a la monitorización de antifúngicos en particular son técnicas cromatográficas. En su mayoría son técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) acoplada a diferentes tipos de detectores como son ultravioleta, de fluorescencia o de arreglo de diodos. Aunque de manera menos habitual debido a los costes del aparataje, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) es otra de las técnicas de elección en la monitorización. Adicionalmente, en la monitorización de antibióticos y de antifúngicos, se han empleado métodos biológicos o bioensayos, en ellos se mide la actividad biológica de un compuesto activo en una matriz biológica determinada. Los métodos cromatográficos (HPLC, LC-MS) son los más comúnmente utilizados ya que proporcionan una gran sensibilidad, alta especificidad, rapidez de análisis y de respuesta. Permiten cuantificar los diferentes compuestos de forma independiente, así como sus metabolitos en los casos en los que su determinación pueda tener utilidad clínica. Como desventajas hay que destacar que son necesarios grandes equipos, en algunos casos costosos (especialmente los equipos LC-MS) y de difícil adquisición por aquellos laboratorios con recursos limitados, siendo más propios de centros de referencia y de investigación. Esto hace que el tiempo de respuesta pueda ser demasiado largo y los resultados no tengan la utilidad clínica esperada.

Los métodos microbiológicos tienen la ventaja de que son más baratos que los anteriores, de implantación más sencilla en laboratorios de microbiología pequeños con menos recursos económicos y que permiten emitir un resultado en 24-48 horas. Como desventajas, son métodos

menos sensibles, precisos y exactos que los cromatográficos, pueden dar lugar a resultados confusos cuando el paciente esté sometido a terapia combinada, y debe realizarse una validación cruzada con métodos cromatográficos. Hay que recordar que estos métodos no detectan el fármaco, sino que miden su actividad biológica, por lo que cualquier compuesto presente en el suero evaluado que tenga la misma actividad que el compuesto a evaluar puede dar lugar a resultados equívocos.

En esta tesis se exponen el desarrollo, la validación y la aplicabilidad de métodos HPLC con detección ultravioleta (HPLC-UV) mediante un detector de arreglo de fotodiodos (PDA), así como la validación de métodos microbiológicos (bioensayos) y su aplicabilidad a la monitorización de compuestos antifúngicos perteneciente a la familia de los triazoles sistémicos.

#### **1.4.2.- Métodos cromatográficos.**

Se basa en la separación de los componentes de una mezcla en función de las características físico químicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad, afinidad, etc...) de un compuesto que se reparte entre dos fases inmiscibles, una fija estacionaria y una móvil. Las interacciones químicas que se establecen entre la fase móvil y la muestra, y entre la fase estacionaria y la muestra, determinan el grado de migración y separación de los compuestos contenidos en una mezcla.

La identificación de los compuestos se realiza mediante un sistema de detección que mida diferentes propiedades fisicoquímicas de las moléculas en cuestión. Las posibilidades de detección son numerosas, siempre condicionadas por las propiedades fisicoquímicas del compuesto: capacidad de absorción de luz UV, fluorescencia, conductividad, relación masa/carga, etc.

Para la cuantificación de un fármaco, previamente es necesario calcular la curva de calibración correspondiente. Para ello se evalúan soluciones del compuesto de concentración conocida y se analiza la señal correspondiente a cada una de ellas. Se obtiene una representación gráfica de la señal del detector en función del tiempo de análisis denominado cromatograma, en el que se observan picos cuyas áreas o alturas se relacionan con la concentración del compuesto en la mezcla. Esos picos son proporcionales a las concentraciones de analito lo que hace que haya una relación entre concentración y área/altura permitiendo el cálculo de rectas de calibración. Se establece la ecuación que mejor ajuste los datos concentración-área/altura, y proporcione valores de  $R^2$  próximos a 1. Un ejemplo de cromatograma se representa en la figura 9.

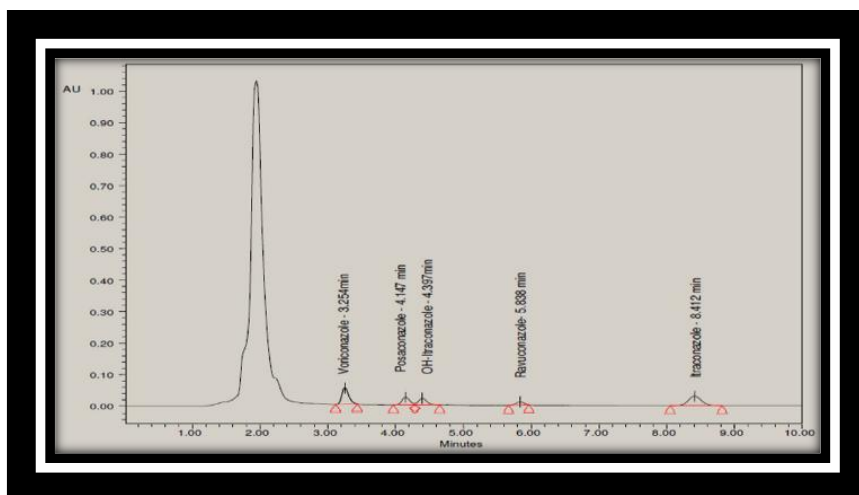


Figura 9: cromatograma de una muestra de suero con OH-itraconazol, ravuconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol. El cromatograma fue obtenido con un detector UV de arreglo de fotodiodos.

#### Tipos de cromatografía usados en monitorización de azoles.

Una de las variantes cromatográficas más útil en química clínica es la cromatografía líquida en fase reversa. La fase estacionaria es una matriz de sílice empaquetada que lleva unida una cadena alquílica de n- carbonos (C-8, cadena octil; C-18, cadena octadecil). En este caso la fase más hidrofóbica es la estacionaria, luego los compuestos que eluirán primero serán aquellos que sean más polares, quedando retenidos los compuestos más lipófilos, que interactuarán con la fase estacionaria.

#### **1.4.3.- Métodos microbiológicos.**

Son métodos basados en la medición de la actividad de un compuesto biológicamente activo sobre un organismo vivo. En el caso de compuestos antimicrobianos, el fundamento de la técnica se basa en la capacidad de la inhibición del crecimiento de un microorganismo, causado por el compuesto que se quiere evaluar.

VARIABLES DE UN BIOENSAYO:

- **Analito.** Dependiendo del compuesto que se quiera determinar, se seleccionará un microorganismo que sea susceptible a la actividad biológica del compuesto a analizar. Este microorganismo es también llamado microorganismo revelador, y determina la actividad biológica del compuesto.

- Medio de crecimiento del microorganismo revelador. El medio de crecimiento deberá tener unas características que favorezcan el crecimiento de este microorganismo, así como una porosidad adecuada para la difusión del compuesto a analizar a través de él. Es un medio sólido (agar) con los nutrientes necesarios para el desarrollo y crecimiento del microorganismo (Figura 10). También influye en la elección del medio la matriz biológica del ensayo, ya que la difusión puede variar en función de la densidad del medio.

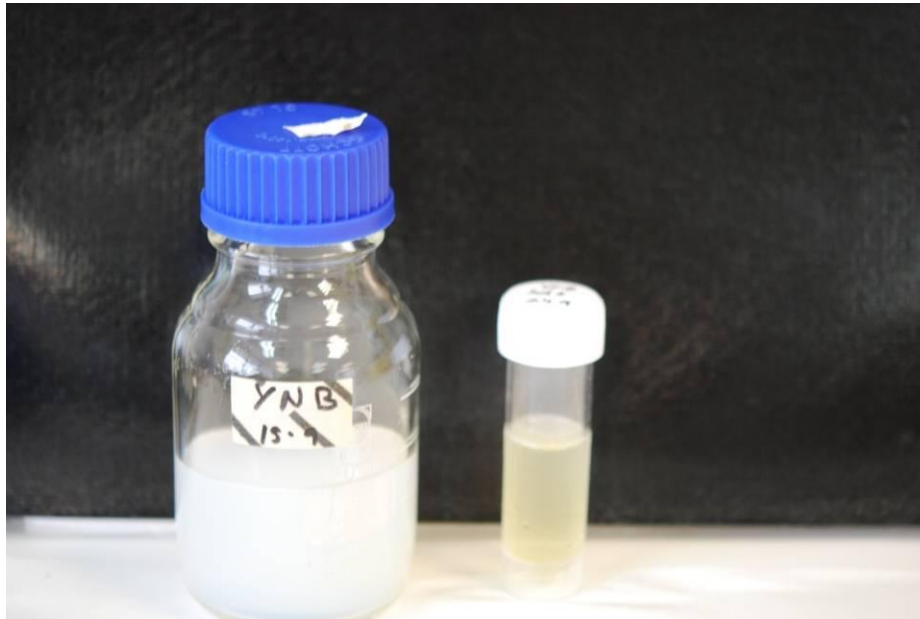


Figura 10: medio de crecimiento para bioensayo, compuesto por agar (izquierda) y suplementos nutricionales (derecha).

- Relación entre actividad biológica y concentración del antimicrobiano. El compuesto debe difundir de manera homogénea, creando una zona de inhibición del crecimiento del microorganismo que sea fácilmente medible. Lo ideal es la medición del diámetro de los halos de inhibición formados (figura 2). Este diámetro de inhibición se relacionará con la concentración del compuesto antimicrobiano en la matriz inoculada. Realizando una serie de patrones estándar, se establece la ecuación que mejor ajuste de los datos concentración/diámetros de inhibición proporcione ( $R^2$  próximo a 1) para proceder a calcular las concentraciones en matrices problema donde la concentración de analito es desconocida.

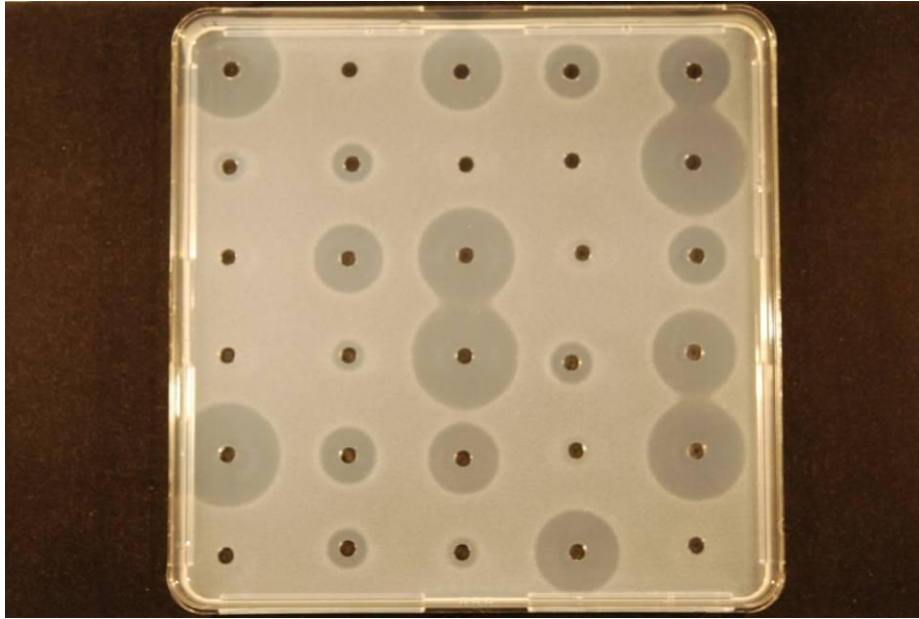


Figura 11: Bioensayo revelado donde se muestran los halos de inhibición de crecimiento a diferentes concentraciones de analito.

- Validación del bioensayo acorde a los parámetros de validación que se especifican más adelante en la introducción de esta tesis.



Figura 12: placa de bioensayo, microorganismo revelador y medidor de halos.

Como ventajas fundamentales estos métodos son más baratos que los cromatográficos y de implantación más sencilla en laboratorios de microbiología pequeños con menos recursos económicos. Así mismo son ensayos flexibles, pudiendo variar tanto medios de crecimiento como microorganismos reveladores en función de las necesidades y de los analitos a determinar. Como desventajas se pueden enumerar que son métodos menos sensibles, precisos y exactos que los cromatográficos, pueden dar lugar a resultados confusos cuando el paciente esté sometido a terapia antimicrobiana combinada o esté medicado con otros fármacos con actividad antimicrobiana, y debe realizarse una validación cruzada con métodos cromatográficos, que son por lo general los métodos de referencia. Hay que recordar que estos métodos no detectan el antimicrobiano, sino que miden su actividad biológica, por lo que cualquier compuesto presente en el suero evaluado que tenga actividad antimicrobiana puede dar lugar a resultados equívocos.

### **Bibliografía**

Daniel C. Harris. 3ª edición. 1992 Grupo editorial Iberoamérica. Análisis químico cuantitativo.

J.M. Hernández Pérez. Ed. Cont. Lab. Clin. 2005; 8:49-62. Cromatografía líquida de alta afinidad.

### 1.5.-Validación de métodos bioanalíticos.

Hay guías elaboradas por organismos internacionales, Food and Drug Administration norteamericana y European Medicines Agency europea, que establecen los parámetros necesarios en un proceso de validación para métodos bioanalíticos. Son de obligado cumplimiento para aquellos métodos que vayan a ser comercializados o para los desarrollados en la industria farmacéutica. Para la metodología desarrollada en los laboratorios de investigación y análisis clínico, son recomendaciones para establecer la validez de los métodos analíticos a desarrollar y la fiabilidad de los resultados emitidos. En este trabajo de tesis se han seguido las especificaciones y rangos de validez de los parámetros especificados en estas guías.

La validación de un método bioanalítico incluye los procedimientos que demuestran que un método particular para la cuantificación de un determinado analito en una determinada matriz biológica (suero, sangre, plasma, orina), es reproducible y fiable para el uso que se le da.

Hay que hacer una validación de los métodos bioanalíticos en casos como la adaptación de un método publicado a otro laboratorio, cuando se realizan cambios en métodos previamente validados, durante el desarrollo de nuevos medicamentos en los que el método sufre modificaciones en función de las fases que se dan en el desarrollo del fármaco, etc. Los diferentes niveles de validación demuestran la validez de la aplicabilidad del método.

Se definen diferentes tipos de validación:

1. **Validación completa:** es el establecimiento de todos los parámetros de validación aplicados al análisis de las muestras para cada método bioanalítico y para cada analito.
  - a. Es importante cuando se desarrolla e implanta un método bioanalítico por primera vez.
  - b. También es importante en la caracterización de un nuevo fármaco.
  - c. Se debe realizar una validación completa de un ensayo previamente validado cuando se añaden metabolitos que deben ser cuantificados.
2. **Validación parcial.** Es la modificación de un método bioanalítico validado que no necesita una validación completa. Esta validación puede estar en el rango de una pequeña determinación de exactitud intra ensayo hasta una validación casi completa del método. Los cambios más habituales que están dentro de esta categoría son los siguientes:
  - a. Transferencias de métodos entre laboratorios y analistas.

- b. Cambio en la metodología de análisis, como puede ser el cambio de sistema de detección.
- c. Cambio de matriz dentro de la misma especie (por ejemplo cuando se cambia de evaluar plasma humano a evaluar orina humana).
- d. Cambio en los métodos de procesamiento de las muestras.
- e. Cambio de especie dentro de la misma matriz (por ejemplo cuando se cambia plasma de rata por plasma de ratón).
- f. Cambio relevante en los rangos de concentraciones.
- g. Cambios en los instrumentos o en el software de procesamiento de los resultados.
- h. Cuando se tiene un volumen limitado de muestra (por ejemplo en estudios pediátricos).
- i. Matrices raras (por ejemplo líquido cefalorraquídeo)
- j. Variación en la sensibilidad de un analito en presencia de medicaciones concomitantes.
- k. Variación en la sensibilidad de un analito en presencia de metabolitos específicos.

**3. Validación cruzada.** Es una comparación de los parámetros de validación cuando dos o más métodos bioanalíticos se usan para generar datos dentro de un mismo estudio o en estudios diferentes. La validación cruzada debe realizarse, por ejemplo, cuando un mismo estudio es llevado a cabo en más de un laboratorio de manera simultánea. La validación debe realizarse con estándares incluidos en el tipo de matriz biológica, y cada laboratorio donde se lleve a cabo el estudio debe evaluar estas muestras para establecer la fiabilidad interlaboratorio. También esta validación se debe realizar cuando se van a generar en un estudio datos mediante dos técnicas analíticas diferentes (LC-MS-MS vs. ELISA).

El proceso por el cual se desarrolla y valida un método bioanalítico debe seguir los siguientes pasos secuenciales.

- a) Preparación de los estándares de referencia.
- b) Desarrollo del método bioanalítico y establecimiento del procedimiento del ensayo.
- c) Aplicación del método validado al análisis rutinario del compuesto, así como de los criterios de aceptación para la validación de los resultados de los sets de muestras.

#### Preparación de estándares de referencia.

El análisis de compuestos y de sus metabolitos en una matriz biológica es llevado a cabo usando muestras a las que se les añade estándares de calibración (EC) y usando muestras controles de

calidad (CC) de concentración definida. El estándar de calibración se usará en el establecimiento de los parámetros de validación del método, mientras que los controles de calidad se usarán para comprobar la validez del método a lo largo del tiempo en el que esté en uso.

La pureza del EC puede afectar a los datos que se obtienen en el estudio. Por lo tanto, se debe usar un estándar de referencia de identidad y pureza conocida para la preparación de soluciones de concentración conocida. Siempre que sea posible, el compuesto de referencia debe ser idéntico al analito. Si no fuera posible, se puede usar una forma química de pureza conocida (bien sea una sal, una base, un ácido o un éster) del mismo analito.

Estos estándares pueden ser de tres tipos:

- Estándares de referencia certificados.
- Estándares de referencia suministrados por una fuente comercial fiable.
- Productos de pureza documentada suministrados por un laboratorio analítico o alguna otra corporación no comercial.

Estos estándares, sea la procedencia cual sea, deben estar identificados siempre con un número de lote, fecha de caducidad, certificados de análisis, y un control externo o interno de identidad y pureza del compuesto.

#### Desarrollo del método y establecimiento del procedimiento.

##### Validación completa de un método bioanalítico

Una validación completa requiere evaluar selectividad exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Los pasos incluyen la determinación de:

- 1) Selectividad y sobrecarga.
- 2) Exactitud, precisión y recuperación
- 3) Curva de calibración.
- 4) Sensibilidad
- 5) Reproducibilidad
- 6) Estabilidad del analito.

**Selectividad.** Es la capacidad del método analítico de diferenciar y cuantificar el analito, así como el control interno (CI) en presencia de otros componentes endógenos de la matriz biológica y otros componentes de las muestras. La selectividad debe ser evaluada con al menos seis fuentes de la matriz biológica adecuadas. Las fuentes seleccionadas no deben contener ni el

analito ni el CI que se vayan a evaluar en el método. Se acepta la ausencia de interferencias cuando la respuesta es menor del 20% del límite inferior de cuantificación del analito (LIC).

No sólo es necesario evaluar las interferencias endógenas de la matriz, sino que también hay que evaluar las posibles interferencias que se puedan producir por la degradación de productos durante la preparación de la muestra. También es necesaria la evaluación de interferencias que puedan producir medicaciones que estén administrándose de manera simultánea en la población en la que vaya a ser analizado ese compuesto.

Si el método que se desarrolla pretende cuantificar más de un analito al mismo tiempo, debe demostrarse la ausencia de interferencias que reduzcan la fiabilidad del método en cada uno de los puntos donde se detecta cada analito.

**Sobrecarga.** Comprobación de que el método puede analizar altas concentraciones de analito en una determinación sin afectar a posteriores determinaciones. Debe ser identificada y minimizada durante el desarrollo del método. Se realiza inyectando muestras blanco (matriz biológica sin analito) después de la concentración más alta del estándar de calibración que se está usando. Si aparece sobrecarga y esta no puede evitarse, se deben tomar medidas específicas durante la validación, como puede ser la inclusión de muestras blanco después de la inyección de muestras con una alta concentración de analito antes del análisis de la siguiente muestra.

**Exactitud.** Describe la proximidad del valor calculado al valor real o nominal del analito (expresado en porcentaje de Error Relativo). La exactitud debe de ser evaluada con controles de calidad (CC). Para su determinación deben hacerse análisis repetitivos que cubran el rango descrito en la curva de calibración y que incluirá al menos las siguientes concentraciones:

- El Límite inferior de cuantificación (LIC). Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser cuantificada fiablemente con una precisión y una exactitud aceptables. Este LIC debe ser adaptado a las concentraciones esperadas y al objetivo del estudio.
- Una concentración tres veces superior al LIC (CC bajo).
- Una concentración que esté en la mitad de la curva de calibración (CC medio).
- Y una concentración que esté en la parte final de las concentraciones que abarca la curva de calibración (CC alto).

La exactitud debe de ser evaluada tanto en un set de muestras simple (exactitud en un día), como en set de muestras en diferentes días (exactitud entre días). Esta última es el indicativo de la exactitud del método a lo largo del tiempo.

- Exactitud en un día: al menos deben evaluarse cinco muestras por concentración. El error relativo medio debe ser del 15% o menor respecto de las concentraciones

nominales para los CC, excepto para el LIC, donde la desviación puede llegar a ser de hasta el 20%.

- Exactitud entre días: al menos se deber realizar cinco determinaciones por concentración y por set de muestras de los CC. Al menos se deben evaluar tres set de muestras en dos días diferentes El error relativo medio debe ser del 15% o menor respecto de las concentraciones nominales para los CC, excepto para el LIC, donde la desviación puede llegar a ser de hasta el 20%.

**Precisión.** Describe la cercanía de las medidas individuales que se hacen en el análisis de un analito. Se expresa con el coeficiente de variación. La precisión se debe demostrar para el LIC, el CC bajo, el CC medio y el CC alto.

- Precisión en un día: la precisión media debe ser del 15% o menor respecto de las concentraciones nominales para los CC, excepto para el LIC, donde la desviación puede llegar a ser de hasta el 20%.
- Exactitud entre días: la exactitud media debe ser del 15% o menor respecto de las concentraciones nominales para los CC, excepto para el LIC, donde la desviación puede llegar a ser de hasta el 20%.

**Recuperación.** Es la respuesta de un detector obtenida cuando se evalúa una concentración de analito que ha sido extraída de una matriz biológica comparada con la respuesta del detector obtenida de la evaluación de la concentración de un estándar sin extraer. Se evalúa la capacidad del método de extracción. No es necesario que la recuperación tenga valores del 100%, pero sí debe ser consistente, precisa y reproducible. Estos experimentos se deben realizar a tres concentraciones, baja, media y alta.

**Curva de calibración.** Se debe conocer la respuesta del instrumento respecto al analito, y esta respuesta debe ser evaluada en un rango de concentraciones adecuado (como por ejemplo el rango de concentraciones que se prevee encontrar en las muestras a avaluar). Las concentraciones de los EC deben estar preparadas en la misma matriz biológica de las muestras que pretendan estudiarse.

El rango de concentraciones que se incluirá en una curva de calibración, queda definido por el LIC, que es el EC de concentración más baja, y el límite superior de cuantificación (LSC), que es el EC de concentración más elevada. Este rango de concentraciones siempre debe de estar justificado y basado en información científica fiable.

Una curva de calibración consiste en una muestra blanco (muestra de la matriz procesada sin CI), una muestra cero (muestra de la matriz procesada con CI) y de seis a ocho muestras de la matriz con el analito que incluya el rango de concentraciones esperado. Las muestras blanco y cero no deben ser tomadas en consideración para el cálculo de los parámetros de la curva de calibración.

Al menos se deben realizar tres curvas de calibración. Una vez calculada la curva de calibración, se debe analizar la exactitud de los EC en esa misma curva de calibración. Los valores calculados para cada EC deben cumplir los criterios que se detallan a continuación:

- Los valores de cada EC no deben desviarse más del  $\pm 15\%$  del valor nominal (concentración teórica que contiene el EC), a excepción del LIC, para el que se permite una desviación del  $\pm 20\%$  de su valor nominal.
- Al menos el 75% de los calibradores de un mínimo de seis deben de cumplir estos criterios. En caso de que no lo cumplan, este EC debe ser descartado y la curva de calibración recalculada, incluyendo los análisis de regresión que se hayan efectuado. Se recomienda que las curvas de calibración se evalúen con EC preparados lo más recientemente posible.
- Para el cálculo de la curva de calibración, se debe aplicar el modelo más simple que describa adecuadamente la relación concentración-respuesta. El modelo más simple suele ser el de regresión lineal. El uso de modelos y ecuaciones complejas de regresión debe de estar justificado.

**LIC.** Para que un EC sea aceptado como LIC, debe cumplir las siguientes condiciones: la respuesta del analito en el LIC tiene que ser al menos cinco veces superior comparado con la respuesta de la muestra blanco. La respuesta del analito (pico cromatográfico), debe ser identificable, discreta y reproducible con una precisión del 20% y una exactitud del 80-120%.

**Sensibilidad.** La sensibilidad es definida como la concentración de analito más baja que puede ser medida con precisión y exactitud aceptable. Es también conocida como Límite inferior de cuantificación (LIC)

**Reproducibilidad** La reproducibilidad del método se define por la realización de mediciones repetidas de controles de calidad y muestras. Se determina también la reproducibilidad de la reinyección de muestras para determinar si una serie de análisis pueden repetirse en el caso de que existan fallos del instrumento durante el análisis de muestras.

**Estabilidad del analito.** La evaluación de la estabilidad debe de realizarse para asegurar que los procedimientos realizados durante el procesamiento de la muestra, el análisis y el almacenaje,

no afectan a la concentración del analito. La estabilidad de un analito en un fluido biológico es función de las condiciones de almacenaje, la matriz y el recipiente que se utiliza tanto en el procesado como en el almacenaje. La estabilidad del analito es particular de una matriz y de un recipiente de almacenaje, y no puede ser extrapolada a otros recipientes y matrices biológicas.

Las condiciones que se usen para el estudio de estabilidad deben reflejar las condiciones que se encontrarán durante el manejo y el análisis de las muestras. Todas las determinaciones que se realicen deben ser de sets de muestras preparadas desde soluciones stock recientemente preparadas del analito. Las soluciones stock del analito deben de ser preparadas en el solvente y la matriz adecuada y a concentraciones conocidas.

**Estabilidad congelación-descongelación.** Se debe determinar la estabilidad del analito después de tres ciclos de congelación-descongelación. Al menos tres alícuotas de concentraciones bajas y altas. Se deben congelar las soluciones a la temperatura de almacenaje durante 24 horas, para posteriormente descongelarlas a temperatura ambiente. Una vez descongeladas completamente, deben congelarse de nuevo durante al menos otras 12-24 horas bajo las mismas condiciones. El ciclo debe repetirse al menos durante dos veces más y las muestras serán analizadas al final del tercer ciclo. Si un analito es inestable a la temperatura de almacenaje evaluada, debe hacerse la evaluación de la estabilidad a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Estabilidad a corto plazo.** Las muestras deben descongelarse a temperatura ambiente y mantenidas a esta temperatura durante 4-24 horas para después ser analizadas. Este tiempo dependerá del tiempo que se tengan las muestras del estudio a temperatura ambiente antes de evaluarlas.

**Estabilidad a largo plazo.** El tiempo durante el cual se evaluará esta estabilidad debe exceder el tiempo que pasa desde el primer muestreo que se prepara y la última muestra analizada. Se almacenarán tres alícuotas de las concentraciones que se evalúen. Los volúmenes deben de ser lo suficientemente grandes como para permitir el análisis en tres ocasiones diferentes. Las concentraciones que se obtienen deben compararse con las concentraciones obtenidas el primer día de la evaluación a largo plazo.

**Estabilidad de la solución stock.** La estabilidad de las soluciones stock y del control interno debe documentarse cuando estas soluciones se congelan durante el período de validación. Después de que el tiempo de almacenaje se haya completado, debe compararse el resultado de la señal del instrumento con la señal del instrumento para esas muestras antes de proceder a la congelación de estas soluciones stock.

**Estabilidad post-preparativa.** Debe ser evaluada la estabilidad de las muestras procesadas. Esta se realizará dejando dentro del aparato de cromatografía las muestras

procesadas durante 24 y 96 horas, para posteriormente proceder a evaluar la señal del instrumento. Esta señal debe de ser comparada con la de las muestras evaluadas a tiempo cero.

La evaluación de la estabilidad y de los tipos de estabilidad que deben aplicarse a cada método analítico y a cada analito, deben adaptarse a las condiciones en las que se van a almacenar y evaluar las muestras para las que se vaya a aplicar el método desarrollado y validado. Las temperaturas también variarán en función de las temperaturas a las que las muestras vayan a ser almacenadas y procesadas.

### **Bibliografía**

EMA.Guideline on validation of bioanalytical methods.February 2012.

FDA.Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation.FDA 2013 September.

### 1.6.- Revisión de la literatura en relación a la utilidad clínica de la monitorización de fármacos antifúngicos azólicos sistémicos.

**Artículo Original: “Indicaciones clínicas de la monitorización de azoles de uso sistémico. Hacia la optimización del tratamiento de la infección fúngica”.**

Revista Española de Quimioterapia. 2014 Mar;27(1):1-16.

#### **Objetivos:**

- 1.- Evaluación del papel de la monitorización clínica de los antifúngicos que están actualmente disponibles en la práctica clínica, con una dedicación exclusiva a los compuestos azólicos.
- 2.- Elaborar un compendio de toda la metodología publicada hasta el momento de la elaboración de la revisión, incluyendo métodos cromatográficos y métodos biológicos.
- 3.- Resumir las indicaciones más recientes acerca de la monitorización de azoles

#### **Conclusiones:**

- 1.- La posibilidad de monitorizar concentraciones sanguíneas de los antifúngicos ha supuesto un valor añadido en el manejo de los pacientes con infección fúngica invasora. En la actualidad es una herramienta terapéutica complementaria en el tratamiento de estos pacientes.
- 2.- Los resultados publicados de diferentes estudios con itraconazol, posaconazol y voriconazol hacen que su monitorización rutinaria deba ser tomada en cuenta, y en el caso de voriconazol obligatoria como herramienta de manejo en pacientes en tratamiento o profilaxis.
- 3.- En cuanto a itraconazol y posaconazol, la monitorización de concentraciones valle es recomendable, siendo también la monitorización de la absorción una actitud terapéutica válida para asegurar la biodisponibilidad de ambos fármacos.

## Revisión

Emilio Cendejas-Bueno  
Manuel Cuenca-Estrella  
Alicia Gómez-López

# Indicaciones clínicas de la monitorización de azoles de uso sistémico. Hacia la optimización del tratamiento de la infección fúngica

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid

### RESUMEN

La monitorización de fármacos se ha consolidado en los últimos años como una herramienta útil, y en algunos casos esencial, en el manejo de las enfermedades infecciosas. En las infecciones fúngicas, la posibilidad de monitorizar las concentraciones sanguíneas de los antifúngicos ha supuesto un valor añadido en el manejo de esta patología infecciosa. Las especiales características farmacocinéticas de estos fármacos y de sus formulaciones dificultan el correcto empleo que asegure su eficacia y minimice su toxicidad. La monitorización de las concentraciones plasmáticas puede mejorar la utilización de estos agentes antiinfecciosos, así como facilitar el manejo de las interacciones medicamentosas, la patología y los efectos adversos teniendo como consecuencia un ahorro en costes derivados de tratamientos y dosificaciones inadecuadas. En esta revisión se evalúa el papel de la monitorización clínica de los antifúngicos que están actualmente disponibles en la práctica clínica, con una dedicación casi exclusiva a los compuestos azólicos.

**Palabras clave:** concentraciones plasmáticas; Voriconazol; Itraconazol; Posaconazol

### Clinical indications for therapeutic drug monitoring of antifungal agents. In the way for optimizing the treatment of fungal infection

### SUMMARY

Therapeutic drug monitoring as a tool in the management of infectious diseases has been introduced in therapy with anti-infective agents for years. Nowadays, it has taken importance in the management of fungal diseases due to the appearance

of new antifungal drugs such as new-generation azoles. These azoles have pharmacokinetic characteristics that hinder a proper use to ensure efficacy and minimize toxicity. Monitoring of serum concentrations may help in the better use of these anti-infective agents, as well as in a better management of drug interactions, infectious disease and adverse effects. It has resulted in saving costs of treatment and in avoiding inadequate dosages. This review will attempt to clarify the role of the antifungal agents Therapeutic Drug Monitoring, highlighting the role of azole compounds.

**Keywords:** serum concentrations; Voriconazole; Posaconazole; Itraconazole

### INTRODUCCIÓN

La individualización de la terapia mediante la determinación de las concentraciones plasmáticas (monitorización) implica la mejora de la respuesta al tratamiento, la prevención de las reacciones adversas, el mejor manejo de las interacciones medicamentosas y en consecuencia un ahorro en costes derivados de tratamientos y dosificaciones inadecuados. El objetivo de la monitorización es, por tanto, aumentar la probabilidad de éxito terapéutico minimizando la toxicidad.

Los estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos en las diferentes poblaciones de pacientes tratan de definir la relación entre la dosis administrada y el éxito o fracaso de una terapia, con el objetivo de definir un parámetro sencillo que ayude a predecir el pronóstico terapéutico.

En términos generales, las principales indicaciones para la monitorización de un fármaco se describen a continuación: relaciones dosis-respuesta y dosis-toxicidad clínicamente relevantes; manejo de fármacos con un estrecho margen terapéutico; predicción de interacciones farmacológicas; manejo de infecciones en lugares con acceso complejo para el fármaco; administración a poblaciones con características especiales como por ejemplo son niños o neonatos; control del grado de cumplimiento de la medicación; necesidad de cambio de dosificación o de vía de administración; fallo terapéutico y/o pronóstico desfavorable de la enfermedad.

En los últimos años, se ha producido un importante au-

Correspondencia:  
Alicia Gómez-López  
Ctra Majadahonda-Pozuelo Km 2. 28220 Majadahonda (Madrid), España.  
Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III,  
Teléfono: + 34-91-8223661.  
Fax: + 34-91-5097966.  
E-mail: aliciagl@isciii.es

mento del número de fármacos disponibles para el tratamiento de infección fúngica con la aprobación y comercialización de nuevas moléculas. A pesar de ello, esta patología continúa siendo un problema médico de gran importancia debido a la elevada mortalidad/morbilidad asociada en algunos grupos de pacientes inmunodeprimidos y, en menor medida, en individuos inmunocompetentes<sup>1</sup>. Son varios los factores que condicionan la evolución de los pacientes con estas infecciones como son el estado inmunológico, las características del patógeno (principalmente la susceptibilidad a los antifúngicos), el tiempo transcurrido desde el establecimiento de la infección hasta el diagnóstico, así como el uso efectivo y seguro del fármaco. Los antifúngicos del grupo de los triazoles se han convertido en fármacos de primera línea para el tratamiento y profilaxis de muchas micosis sistémicas. Este grupo muestra las siguientes peculiaridades farmacocinéticas:

- 1) relación no lineal entre la dosis administrada y la concentración detectada en sangre, como ocurre en los casos particulares de voriconazol e itraconazol<sup>2</sup>.
- 2) irregularidades en la absorción, interacciones con alimentos, así como saturación de los mecanismos de absorción, en especial itraconazol y posaconazol<sup>3-6</sup>.
- 3) importantes interacciones farmacológicas con otras medicaciones concomitantes, sobre todo en los casos de itraconazol, voriconazol, fluconazol y en menor medida posaconazol.

Estas peculiaridades farmacocinéticas hacen que estos agentes sean firmes candidatos a la monitorización terapéutica.

Por el contrario, los datos farmacocinéticos poblacionales disponibles para polienos y equinocandinas demuestran relaciones dosis exposición predecibles, y en el caso particular de anfotericina B, la eficacia clínica y la toxicidad parecen estar relacionadas con la formulación utilizada, con la patología de base de la población estudiada y con el agente patógeno causante de la infección, y en menor medida con las concentraciones plasmáticas. Respecto a las equinocandinas, no hay datos suficientes actualmente que otorguen un papel fundamental a su monitorización<sup>7</sup>. Por lo tanto, ambos grupos de antifúngicos no cumplen con los criterios que justifiquen su monitorización.

De manera general para los azoles, la concentración en el valle una vez alcanzado el estado estacionario, definida como aquella que se obtiene en el momento justo antes de la administración de la siguiente dosis, se ha establecido como la concentración guía para la toma de decisiones. Esta concentración proporciona información no solo relativa al proceso de eliminación, sino también acerca de los procesos de absorción y distribución, y por ello contribuye de manera significativa a estimar el área bajo la curva (ABC) relacionada con la respuesta terapéutica<sup>1</sup>. En diversos estudios esta relación ha sido cuantificada mediante complejos modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos y software específicos que ayudan a predecir la respuesta en función del valor de ciertos parámetros<sup>8,9</sup>.

El objetivo de esta revisión es recopilar los datos recientemente publicados acerca de la monitorización de antifúngicos, en especial de antifúngicos azólicos, presentar estudios que describan relaciones entre las concentraciones séricas, toxicidad y eficacia, revisar las tecnologías y metodologías descritas en la literatura para la monitorización de esta familia de antifúngicos, así como la aplicabilidad clínica.

## FUENTES

Se procedió a realizar una búsqueda en Pubmed introduciendo las palabras "voriconazole", "itraconazole", "posaconazole", "echinocandins", "amphotericin B" "fluconazole", "antifungal drug monitoring", "therapeutic drug monitoring", "chromatographic methods" and antifungal serum levels. Así mismo también se combinaron estas palabras para ampliar y mejorar las características de la búsqueda. Se incluyeron como criterios de búsqueda revisiones, artículos originales y estudios clínicos.

## MÉTODOS DISPONIBLES PARA MONITORIZACIÓN DE AZOLES. VENTAJAS E INCONVENIENTES

Se han descrito gran variedad de métodos para la monitorización de azoles en muestras biológicas humanas, siendo las muestras de suero y plasma las preferentes para realizar estas determinaciones. La mayoría de estos métodos son cromatográficos (cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC, con pequeñas diferencias relacionadas con el sistema de detección, ultravioleta-visible (UV), espectrometría de masas (MS) o fluorescencia) o bien microbiológicos (también descritos en la literatura como bioensayos). Los más frecuentes en la literatura son los métodos HPLC/UV y LC/MS, con una serie de ventajas y de inconvenientes que son expuestos a continuación.

**Métodos cromatográficos:** son los más comúnmente utilizados ya que proporcionan alta sensibilidad y especificidad, rapidez de análisis y tiempo de respuesta (una muestra puede evaluarse en horas desde su recepción en el laboratorio). Permiten cuantificar los diferentes compuestos así como sus metabolitos en aquellos casos en los que su determinación pueda tener utilidad clínica. Como desventajas destacar que requieren de equipos de elevado coste (especialmente los equipos LC/MS) y de difícil adquisición por aquellos laboratorios con recursos limitados, siendo más propios de centros de referencia y de investigación. Esto hace que el tiempo de respuesta, considerado desde el momento en el que se decide la monitorización hasta que se recibe un resultado desde el centro de referencia, pueda ser demasiado largo y los resultados no tengan la utilidad clínica esperada.

**Métodos microbiológicos:** son métodos de implantación sencilla y precio asequible especialmente para aquellos laboratorios de microbiología con menos recursos económicos. Sin embargo son métodos menos sensibles, precisos y exactos que los cromatográficos, pueden dar lugar a resultados confusos cuando el paciente está sometido a terapia antifúngica com-

**Tabla 1** Resumen de la metodología disponible descrita y referida en la literatura para fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol.

Métodos	Ventajas	Desventajas	Referencias			
			Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol
Cromatográficos (HPLC, LC/MS-MS)	HPLC	Equipos caros, mantenimiento y personal especializado. Tiempo de respuesta condicionado a la recepción y centralización de las muestras en centros de referencia.	10-18	14, 19-32	14, 33-40	14, 33, 35, 41-44
	LC/MS		13, 45-48	45, 49	50-53	45, 50, 54-57
Microbiológicos (bioensayos)	Más baratos. Emisión en 24 horas del resultado (tiempo mínimo de lectura e incubación).	Menos sensible, resultados confusos en terapia combinada, necesidad de validación cruzada.	58-60	61-65	40, 66, 67	68, 69

binada, y debe realizarse una validación cruzada con métodos cromatográficos para asegurar su validez. Hay que recordar que estos métodos no detectan el antifúngico, sino que miden su actividad biológica, por lo que cualquier compuesto presente en la muestra biológica evaluada que tenga actividad antifúngica puede dar lugar a resultados equívocos.

En la tabla 1 se exponen las metodologías, sus ventajas e inconvenientes, así como un resumen de los métodos publicados para cada antifúngico hasta la fecha.

## FLUCONAZOL

Fluconazol pertenece al grupo de los antifúngicos triazólicos y debido a su perfil de seguridad y amplio espectro de actividad es uno de los azoles más utilizados, aunque sólo es activo frente a levaduras<sup>70</sup>. Está disponible tanto en formulación intravenosa como en formulaciones orales, tiene una excelente biodisponibilidad, baja unión a proteínas plasmáticas (11-12%) y una amplia distribución en tejidos. La concentración máxima (C<sub>max</sub>) y el ABC no se ven influenciados por su administración junto con alimentos y el estado estacionario se alcanza entre los días 5 y 10 tras la administración. Se elimina en un 80% por la orina de forma inalterada, mientras que aproximadamente el 11% lo hace en forma de metabolitos. Además, muestra una farmacocinética lineal cuando se administran dosis comprendidas entre 50 y 800 mg/día<sup>71,72</sup>, que puede alterarse en situaciones de disfunción renal, detectándose en estos casos una relación inversamente proporcional entre aclaramiento de creatinina y tiempo de vida media del fármaco.

Se ha definido una relación lineal entre la dosis y el ABC, tanto en humanos como en modelos animales, de manera que el ABC es fácilmente predecible según la dosis de fluconazol administrada<sup>73</sup>. En estudios de candidiasis tratadas con fluconazol, el parámetro farmacocinético que mejor se ha relacionado con respuesta terapéutica es el cociente entre ABC y la

CMI (concentración mínima inhibitoria)<sup>74</sup>. Esta relación se ha estimado en valores comprendidos entre 25 y 100 para la obtención de resultados clínicos favorables, por lo que conociendo la CMI del microorganismo responsable de la infección podía establecerse la dosis más adecuada para la eficacia terapéutica. Se propuso un valor de 25 para este cociente si se usa la metodología CLSI para la determinación de la CMI<sup>75</sup>, o un valor de al menos 100 si se usa la metodología EUCAST<sup>76</sup>.

Fluconazol es bien tolerado a dosis altas y las reacciones adversas como alteraciones de la función hepática, náuseas, vómitos, eritema multiforme y convulsiones, se observan en pacientes tratados con estas dosis, aunque no se ha establecido una relación directa entre estas y la probabilidad de toxicidad.

La monitorización está indicada solo en ciertos grupos como pacientes pediátricos, con disfunción renal y/o en diálisis, grandes quemados y pacientes con infecciones en lugares de difícil acceso para el fármaco como pueden ser las infecciones del sistema nervioso central o infecciones oculares. Es una herramienta complementaria que puede ayudar en el manejo de estos pacientes y podría contribuir a una mejora de la respuesta. La monitorización rutinaria no es necesaria debido a su farmacocinética favorable y al amplio índice terapéutico<sup>1</sup>. En cualquier caso, pocos trabajos permiten establecer valores guía con suficientes evidencias. Se recomienda alcanzar concentraciones efectivas de fluconazol en la práctica clínica de 7-8 mg/L para infecciones por *Candida* y de 15-20 mg/L para infecciones graves<sup>77</sup>. Estas concentraciones no se alcanzan fácilmente en pacientes quemados por sus especiales características hemodinámicas y, por lo tanto, la monitorización en estos casos sería útil cuando el tiempo de tratamiento sea prolongado para mantener la eficacia clínica, ya que se espera gran variabilidad en los niveles plasmáticos de estos pacientes<sup>78</sup>.

Por último, los métodos analíticos descritos tienen una exactitud y precisión aceptables (tabla 1).

**Tabla 2** Principales interacciones farmacológicas de itraconazol, voriconazol y posaconazol. Recomendaciones.

Fármaco	Fármacos que reducen los niveles de antifúngico	Fármacos que interactúan con voriconazole pero no requieren ajuste de dosis	Fármacos que aumentan sus niveles plasmáticos cuando se coadministran con el antifúngico	Fármacos que aumentan sus niveles plasmáticos cuando se coadministran con el antifúngico, por lo que deberían monitorizarse o ajustarse la dosis.
Itraconazol	Rifampicina, rifabutina; fenitoína, carbamazepina, fenobarbital; isoniazida. Antiácidos como el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, calcio, magaldrato, carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, trisilicato de magnesio, bicarbonato sódico. Omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol. Cimetidina, famotidina, nizatidina, ranitidina, roxatidina. Darunavir, didanosina, efavirenz, etravirina, nevirapina.  Rifampicina, rifabutina, fenitoína, carbamazepina, fenobarbital e isoniazida.	AZT (zidovudina) y fluvastatina. imipramina, propranolol, diazepam, indometacina, tolbutamida, sulfametazina, etinilestradiol y noretisterona	Ritonavir, indinavir, claritromicina y eritromicina.  Terfenadina, astemizol, mizolastina, cisaprida, triazolam, midazolam oral, dofetilida, nisoldipina, quinidina, pimozida, inhibidores de HMG-CoA reductasa metabolizados a través de CYP3A4 como simvastatina y lovastatina.  Bloqueantes de los canales de calcio.	Inhibidores de proteasa HIV tal como ritonavir, indinavir, saquinavir. alcaloides de la vinca, busulfan, docetaxel y trimetrexato. Bloqueantes de los canales de calcio como dihidropiridinas y verapamil. Inmunosupresores como ciclosporina, tacrolimus, sirolimus. Atorvastatina, ciertos glucocorticoides como budesonida, dexametasona, fluticasona, y metilprednisolona. Digoxina (via inhibición de glucoproteína P), carbamazepina, buspirona, alfentanilo, alprazolam, brotizolam, midazolam IV, rifabutina, metilprednisolona, dexametasona, ebastina, reboksetina, cilostazol, disopiramida, eletriptan, fentanilo, halofantrina, repaglinida
Voriconazol	Rifabutina, rifampicina, rifapentina, carbamazepina, fenitoína, amprenavir, darunavir, delavirdina, efavirenz, nevirapina, ritonavir (bajas dosis), tripanavir, alifuzosina, barbituratos en general rifampicina, ritonavir (altas dosis), hierba de San Juan, carbamazepina, barbitúricos de larga vida media, rifabutina.	Cimetidina, ranitidina, eritromicina y azitromicina.	Delavirdina, etravirina, fosamprenavir, nelfinavir, nevirapina, saquinavir, tripanavir, anticonceptivos orales como etinil estradiol e inhibidores de la bomba de protones como el omeprazol,  Sirolimus, Terfenadina, astemizol, cisaprida, pimozida, quinidina, alcaloides del cornezuolo del centeno.	Alfentanilo, fentanilo, oxidodona, ciclosporina, metadona, tacrolimus, warfarina, anticoagulantes orales cumarínicos, estatinas benzodiacepinas, bloqueantes de los canales de calcio metabolizados por el CYP3A4. Sulfonilureas, alcaloides de la vinca y efavirenz,
Posaconazol	Rifampicina, rifabutina, carbamazepina, fenitoína, efavirenz, fenobarbital, primidona. Antagonistas H2 e inhibidores de la bomba de protones como la cimetidina, ranitidina... o como el omeprazol, lansoprazol, pantoprazol  Rifampicina, rifabutina, carbamazepina, fenitoína, efavirenz, fenobarbital, primidona.		Terfenadina, astemizol, cisaprida, pimozida, halofantrina y quinidina, alcaloides del cornezuolo del centeno, simvastatina, lovastatina, atorvastatina, alcaloides de la vinca.	Tacrolimus, sirolimus, atazanavir y midazolam, alcaloides de la vinca. Rifabutina, ciclosporina, Inhibidores de la proteasa del VIH (atazanavir y ritonavir). Midazolam y otras benzodiacepinas metabolizadas por CYP3A. Bloqueantes de los canales de calcio metabolizados a través del CYP3A4 (por ejemplo diltiazem, verapamil, nifedipino, nisoldipino). Digoxina. Sulfonilureas

Resaltados en negrita aquellos fármacos cuya administración simultánea con el azol correspondiente está contraindicada

Tabla 3		Recomendaciones monitorización niveles plasmáticos de antifúngicos.		
	Indicaciones	Tiempo monitorización tras inicio de la terapia (días)	CC plasmática en el valle orientativa para eficacia	CC plasmática en el valle orientativa para toxicidad
Itraconazol	Falta de respuesta. Alteraciones gastrointestinales. Comedicaciones (inductores del Cít P450). Administración simultánea de antiácidos.	4-7 días 2-4 horas después de la administración del fármaco (Documentación de la absorción cuando se administran formulaciones orales de Itraconazol).	Si es para profilaxis, recomendadas CC > de 0,5 mg/L Para tratamiento CC entre 1 y 2 mg/L. En caso de histoplasmosis se recomiendan CC > de 1 mg/L.	No hay datos que definan una concentración valle orientativa para toxicidad.
Posaconazol	Falta de respuesta. Comedicaciones, incluyendo antagonistas H <sub>2</sub> e inhibidores de la bomba de protones. Mucositis y otro tipo de alteraciones gastrointestinales.	El estado estacionario tarda en alcanzarse de 7-10 días.	Tanto en profilaxis como en tratamiento, niveles mayores de 0,7 mg/L. En IFI refractaria con respuesta deficiente se recomiendan niveles mayores 1,3 mg/L.	No hay datos que definan una concentración valle orientativa para toxicidad
Voriconazol	Falta de respuesta a la terapia. Interacciones con fármacos coadministrados simultáneamente. Cambio de administración de vía oral a vía IV o viceversa. Insuficiencia hepática. Administración en pacientes en edad pediátrica.	El estado estacionario se alcanza a los 5-7 días de tratamiento, pudiendo reducirse a 3-4 con la administración de una dosis de carga.	Tratamiento CC > de 1 mg/L Con la aparición de los primeros ensayos prospectivos podría reevaluarse este nivel y quedar establecido > 1,5-2 mg/L.	CC < de 6 mg/L Con la aparición de los primeros ensayos prospectivos podría reevaluarse este nivel y quedar establecido < 4,5-5,5 mg/L.

## ITRACONAZOL

Itraconazol es un triazol de amplio espectro antifúngico<sup>79</sup> que ha demostrado eficacia en la profilaxis y en el tratamiento de la aspergilosis aguda y crónica y en la aspergilosis broncopulmonar alérgica. Está indicado en el tratamiento de infecciones localizadas en piel y uñas, infecciones por hongos dematiáceos y micosis endémicas (coccidioidomicosis, histoplasmosis, blastomycosis y sporotrichosis)<sup>1</sup>. Disponible en formulaciones orales (solución y cápsulas) y solución intravenosa, los estudios farmacocinéticos demuestran gran variabilidad interindividual en la biodisponibilidad de este azol, generalmente relacionada con una absorción errática. La solución oral, en la que itraconazol se formula unido a moléculas del oligosacárido ciclodextrina, ha demostrado una mayor biodisponibilidad aumentando el ABC en un tercio si se compara con la biodisponibilidad de la presentación en cápsulas<sup>80,81</sup>.

La administración de itraconazol junto con una comida completa o un refresco de cola favorece la absorción, sin embargo, ésta se ve comprometida cuando se administra junto a fármacos antagonistas H<sub>2</sub> e inhibidores de la bomba de protones (como por ejemplo el omeprazol). En pacientes que sufren de aclorhidria (pacientes VIH) y en situaciones de mu-

cositis asociada a quimioterapia, la absorción se ve modificada resultando la variabilidad de las concentraciones plasmáticas mayor en pacientes con patologías que la observada en voluntarios sanos<sup>80,82-87</sup>.

Itraconazol es metabolizado a través del complejo enzimático del citocromo P450 y en particular de la isoenzima CYP3A4 tanto en el tracto gastrointestinal como en el hígado, dando lugar a diferentes metabolitos de los que hidroxitraconazol es el mayoritario, demostrando poseer actividad antifúngica comparable a itraconazol<sup>88</sup>. El complejo enzimático del citocromo P450 es una vía metabólica muy activa que transforma y metaboliza itraconazol, así como otros muchos fármacos, lo cual explica el gran número de interacciones farmacológicas que pueden ocurrir en el curso del tratamiento con este antifúngico (tabla 2)<sup>89</sup>.

Hay varios estudios publicados que refieren las relaciones dosis administrada-respuesta terapéutica y dosis-toxicidad, tanto en tratamiento como en profilaxis con itraconazol. En profilaxis, itraconazol ha demostrado ser eficaz en el control de la infección fúngica. Así, en una cohorte de 121 pacientes en régimen de profilaxis con itraconazol (400-600 mg/día en cápsulas), se observó que en el grupo control (sin profilaxis), había

<b>Tabla 4</b>					
<b>Resumen de los trabajos más significativos referidos en la literatura sobre eficacia y toxicidad de voriconazol.</b>					
<b>Autores (año)</b>	<b>Diseño del estudio</b>	<b>Población estudiada</b>	<b>Relación concentración plasmática eficacia -toxicidad</b>	<b>Limites superior e inferior sugeridos</b>	<b>Otras aportaciones</b>
Trifilio et al. 2005	Retrospectivo	25 pacientes con trasplante alogénico de progenitores de células hematopoyéticas	No se establece relación ni en toxicidad ni en eficacia	No hay establecimiento de niveles óptimos	Relación entre concentraciones altas de VRC y niveles elevados de AST y fosfatasa alcalina.
Smith et al. 2006	Retrospectivo	28 pacientes monitorizados en tratamiento con VRC	Sí, en eficacia y en progresión de la enfermedad	Sí. Se establece un límite inferior de 2,05 mg/L	No otras aportaciones de interés.
Trifilio et al. 2007	Retrospectivo	87 pacientes con enfermedades hematológicas	No se establece relación ni en toxicidad ni en eficacia	No hay establecimiento de niveles óptimos	No hay predicción de niveles proporcionales a las dosis administradas.
Pascual et al. 2008	Prospectivo en el grupo de monitorizados	52 pacientes con micosis invasivas según criterios EORTC	Sí, tanto en eficacia como en toxicidad	Límite inferior: 1 mg/L ; límite superior 5,5 mg/L	Toxicidad hepática independiente de las concentraciones.
Ueda et al. 2009	Retrospectivo	34 enfermos hematológicos en tratamiento con VRC	Sí, tanto en eficacia como en toxicidad	Límite inferior: 2 mg/L ; límite superior 6 mg/L	No otras aportaciones de interés
Miyakis et al. 2009	Retrospectivo	25 pacientes con infección fúngica invasora probada o probable	Sí en eficacia y en progresión de la enfermedad	Sí. Se establece un límite inferior de 2,2 mg/L	Pacientes con concentraciones bajas en las diferentes determinaciones, peor pronóstico
Myrianthefs et al. 2009	Prospectivo y observacional	18 pacientes ingresados en unidad de cuidados intensivos	No se establece relación ni en toxicidad ni en eficacia	No hay establecimiento de niveles óptimos. Se toma como referencia los de Pascual et al	Asociación en un 37% de los pacientes entre niveles subóptimos y administración IV. Dosis habituales inadecuadas en este tipo de pacientes.
Trifilio et al. 2009	Retrospectivo	64 pacientes con trasplante alogénico de progenitores de células hematopoyéticas	No se establece relación ni en toxicidad ni en eficacia	No hay establecimiento de niveles óptimos	Estudio con muestras pareadas, donde se puede observar la variabilidad de los niveles para cada paciente
Park et al. 2012	Prospectivo, randomizado y controlado	110 pacientes en tratamiento con voriconazol debido a IFI	Sí, tanto en eficacia como en toxicidad	Se toma el rango de 1-5,5mg/L para la toma de decisiones en la modificación de la dosis. Con sus datos rango entre 2 y 5,5mg/L	La monitorización de voriconazol reduce la discontinuación de tratamiento, así como la incidencia de efectos adversos y mejora la respuesta en IFI
Pascual et al. 2012	Prospectivo	55 pacientes en tratamiento con voriconazol	Sí, en eficacia y en toxicidad	Establecimiento de rango terapéutico entre 1,5 y 4,5 mg/L mediante análisis de regresión multivariante	Uso de la monitorización para un mejor ajuste de dosis para asegurar eficacia y minimizar la probabilidad de neurotoxicidad.

mayor incidencia de IFI que el grupo en profilaxis (8,8% vs. 0,9%,  $P=0,005$ )<sup>90</sup>. En una cohorte de pacientes neutropénicos, Glasma-cher et al. demostraron un mayor riesgo de infección de brecha en los casos en los que las concentraciones de itraconazol no superaban el valor de 0,50 mg/L<sup>91</sup>. De igual manera, en referencia a pacientes en tratamiento, algunos estudios han determinado que el fallo terapéutico podría predecirse si las concentraciones de itraconazol no alcanzan valores de 1 mg/L<sup>90</sup>.

En general, y atendiendo a los datos recogidos en recientes revisiones, se han establecido concentraciones mínimas terapéuticas orientativas que sugieren niveles valle eficaces mayores de 0,50 mg/L para profilaxis y entre 1,00 y 2,00 mg/L para predecir el éxito en tratamiento<sup>7,92</sup>. En el caso particular de histoplasmosis, las guías de tratamiento recomiendan alcanzar una concentración de itraconazol en el estado estacionario de al menos 1 mg/L<sup>93</sup>. En conclusión, a falta de estudios clínicos más concluyentes que aporten mayor número de evidencias, se establecen los valores guías orientativos para eficacia en tratamiento y en profilaxis que son expuestos a continuación en la tabla 3.

La monitorización de concentraciones plasmáticas de itraconazol está recomendada para la toma de decisiones que impliquen una optimización de la dosis en determinadas situaciones como son la falta de respuesta clínica, alteraciones gastrointestinales, comedificaciones con inductores del Citocromo P450 y administración concomitante de antiácidos. La recomendación para el inicio de la monitorización es comenzar a los 4-7 días tras la instauración de la terapia, y la toma de muestras debe realizarse en el valle<sup>7</sup>. También es recomendable con las formulaciones orales, documentar la absorción solicitando una toma de muestra adicional a las 2-4 horas después de la administración del fármaco<sup>94</sup>.

En cuanto a su metabolito mayoritario, hidroxí itraconazol, no hay en la literatura datos concluyentes sobre su valor en la práctica clínica. Hay estudios que cuantifican ambos compuestos, como los recogidos en la revisión de Buchkowsky et al., pero en ningún caso se ha establecido hasta el momento una clara relación entre concentraciones de itraconazol e hidroxí itraconazol y eficacia de una manera conjunta en tratamiento y profilaxis<sup>92</sup>. Así mismo, la relación media de las concentraciones plasmáticas de hidroxí itraconazol respecto a itraconazol en una cohorte de 56 pacientes (104 muestras) fue de 1,99. Es decir, el metabolito activo se encuentra de manera general en concentraciones superiores a itraconazol<sup>95</sup>.

Los métodos desarrollados y publicados varían en cuanto a metodología, HPLC/UV, LC/MS o microbiológicos (ver tabla 1). Mención especial requieren los métodos microbiológicos en lo relativo a su utilidad para cuantificar itraconazol. Se ha demostrado que las concentraciones evaluadas mediante bioensayo son 2 y 3 veces superiores a las obtenidas por métodos cromatográficos. Esto es debido a que en el bioensayo se evalúa la actividad biológica total tanto del compuesto como de su metabolito activo, hecho que debe ser tenido en cuenta a la hora de aplicar esta metodología a la monitorización de itraconazol<sup>61, 62, 64, 65</sup>.

En conclusión, se han establecido relaciones entre concentraciones y eficacia/ toxicidad, pero serían necesarios más estudios donde se valoraran concentraciones y eficacia clínica, así como efectos secundarios (que por lo general son transitorios y poco importantes, como náuseas, vómitos, diarrea y molestias gastrointestinales) de la combinación de concentraciones plasmáticas de itraconazol y de su metabolito activo. También deberían efectuarse estudios prospectivos en indicaciones y poblaciones concretas. Hasta que se realicen estos estudios y se clarifique la importancia de la monitorización, es recomendable realizarla para asegurar la eficacia del tratamiento y de la profilaxis, así como para confirmar la correcta absorción de las formulaciones orales.

### POSACONAZOL

Posaconazol es un triazol de nueva generación relacionado química y estructuralmente con itraconazol y ketoconazol que ha demostrado gran actividad *in vitro*<sup>96</sup>. Es el azol más recientemente aprobado tanto para profilaxis como para terapia de rescate en pacientes con IFI refractaria a los tratamientos de primera elección y en pacientes con zigomicosis<sup>97-99</sup>. Está disponible actualmente sólo en suspensión oral y posee una farmacocinética que es lineal hasta dosis de 400 mg cada 12 horas, aunque la administración de una dosis única de 600-800 mg diarios produce una saturación de los mecanismos de absorción y niveles plasmáticos menores que los que se alcanzan tras la administración de dosis fraccionadas. Recientemente, los primeros ensayos clínicos con tabletas vía oral han sido publicados por Krishna et al. En ellos se observa que la absorción de posaconazol es mejor si se administra en esta forma farmacéutica que si se administra en solución oral, no siendo necesario administrar el posaconazol con alimentos grasos. Así mismo, la variabilidad en los niveles sanguíneos de posaconazol de los pacientes tratados es menor que con la solución oral. Los resultados de ambos estudios apoyan la administración de una única dosis diaria si se utiliza esta forma farmacéutica<sup>101</sup>.

Dividir la dosis total diaria de posaconazol mejora la absorción y, por lo tanto, aumenta los niveles plasmáticos de fármaco<sup>102-104</sup>. Sin embargo, la absorción y biodisponibilidad pueden verse afectadas por la presencia de alimentos, especialmente aquellos de elevado contenido en grasas<sup>103,105</sup>. La administración de suplementos alimenticios aumenta la cantidad de posaconazol absorbida, variando en función de la cantidad y el tipo de suplemento administrado<sup>4</sup>. Así mismo, las bebidas de cola aumentan significativamente su biodisponibilidad, ya que disminuyen el pH y favorecen la absorción del principio activo<sup>5,105</sup>. Se ha comprobado que el aumento de exposición puede ser debido a una mejor solubilidad de posaconazol en este tipo de bebidas y a un aumento del tiempo de permanencia gástrico<sup>106</sup>. Recientemente se ha publicado un estudio retrospectivo que aporta más evidencias sobre la influencia de desórdenes gastrointestinales y toma de alimentos en la biodisponibilidad de posaconazol<sup>107</sup>.

Por el contrario, la absorción puede reducirse si se administra junto a antiácidos, en presencia de mucositis y otras

alteraciones gastrointestinales<sup>108</sup>. Para compensar la disminución de concentraciones observadas en pacientes con estas patologías, se recomienda aumentar la dosis y fraccionarla<sup>4, 103</sup>.

Desde el punto de vista farmacocinético, posaconazol tiene un gran volumen de distribución, lo cual le confiere una buena penetración en tejidos, además de tener una tasa de unión a proteínas plasmáticas mayor del 95%. Es metabolizado por el hígado, mayoritariamente por el sistema de UDP-glucuronido y en menor proporción por la vía de oxidación mediada por enzimas del complejo citocromo P450, lo que reduce las interacciones farmacológicas respecto a voriconazol e itraconazol (ver tabla 2). La administración simultánea con omeprazol reduce la C<sub>max</sub> alcanzada y el ABC en un 50 y 30% respectivamente. Fármacos como la metoclopramida disminuyen el ABC del orden del 20%<sup>7</sup> y el estado estacionario se alcanza a los 7-10 días de haber comenzado la administración del fármaco<sup>104</sup>.

En cuanto a la relación exposición/efecto terapéutico los datos encontrados en la literatura son aún limitados, pero han permitido establecer algunas relaciones interesantes. En el estudio más significativo, de Andes et al., se describió el parámetro ABC/CMI como predictor de la eficacia clínica en un modelo murino de infección por *Candida albicans*. Se estableció un valor de 16,9 para el cociente ABC/CMI como mejor predictor de eficacia, resultado que coincide con el observado para otros triazoles<sup>109</sup>. Así mismo, en lo que respecta a cepas resistentes de *Aspergillus* spp, en un estudio con mutantes de *Aspergillus fumigatus* resistentes *in vitro* a posaconazol en un modelo experimental de aspergilosis, se estableció igualmente el ABC/CMI como parámetro predictor de eficacia. A la vista de estos resultados dosis elevadas de posaconazol podrían resultar clínicamente útiles para el tratamiento de micosis causadas por cepas con sensibilidad disminuida<sup>110</sup>, aunque con la forma farmacéutica disponible y las posologías recomendadas actualmente, este índice es imposible de alcanzar.

Por otro lado, en pacientes en tratamiento, un estudio retrospectivo que evaluaba la prevalencia de bajas concentraciones de posaconazol en 54 pacientes, 18 con infección fúngica y 36 en profilaxis, demostró cómo las alteraciones gastrointestinales (diarrea o mucositis) influían en las concentraciones sanguíneas de manera negativa. En el grupo de profilaxis, solo dos pacientes manifestaron IFI posible, y en ambos los niveles plasmáticos de posaconazol fueron inferiores a 0,50 mg/L (0,31 y 0,19 mg/L respectivamente)<sup>111</sup>. En otro estudio retrospectivo que incluyó 27 pacientes hematológicos en profilaxis con posaconazol, se observó que los niveles más bajos correspondieron a aquellos pacientes que recibieron pantoprazol de manera simultánea, constatando la necesidad de monitorizar concentraciones de posaconazol cuando se administren ambas medicaciones de manera concomitante<sup>112</sup>.

Los datos que aportan estos trabajos permiten establecer unos valores para la concentración sanguínea de posaconazol orientativos para eficacia en profilaxis y tratamiento. En profilaxis las primeras recomendaciones proponían superar valores de 0,5 mg/L, aunque Jang et al. observan infecciones fúngi-

cas de brecha en pacientes que presentan concentraciones plasmáticas entre 0,5-0,7 mg/L<sup>113</sup>. Dolton et al. concluyen en un estudio publicado recientemente que niveles bajos de posaconazol están asociados a infecciones fúngicas de brecha<sup>114</sup>. En IFI refractarias, Walsh et al., sugieren unos niveles mayores de 0,7 mg/L, debiendo aumentar a más de 1.250 mg/L si la respuesta se muestra deficiente<sup>99</sup>. En el documento de información de la FDA, se establecen unos niveles de 0,70 mg/L como límite inferior para que la terapia con posaconazol pueda ser efectiva<sup>115</sup>. Las recomendaciones en cuanto a niveles plasmáticos de posaconazol quedan como se expone en la tabla 3.

En pacientes pediátricos, aunque de momento no está indicado, hay estudios que relacionan concentraciones de posaconazol y eficacia. Krisna et al., en una cohorte de pacientes transplantados hematópicos con enfermedad injerto contra huésped en los que posaconazol se utilizó como profilaxis, observaron que las concentraciones plasmáticas obtenidas eran comparables a las obtenidas en pacientes adultos. Posaconazol también mostró buena tolerancia y seguridad en estos pacientes, por lo tanto se espera que los resultados clínicos sean similares en pacientes pediátricos que en adultos con infecciones fúngicas refractarias a tratamiento<sup>116</sup>. Actualmente no están establecidas posologías ni indicaciones en pacientes pediátricos debido a la ausencia de estudios, aunque recientemente *Welzen et al.* han desarrollado un algoritmo basado en el peso corporal, en el que una dosificación de posaconazol dos veces diarias conlleva una exposición eficaz y segura en niños con enfermedad granulomatosa crónica<sup>117</sup>.

La toma de muestras para la monitorización debe realizarse idealmente en el valle una vez alcanzado el estado estacionario tras una semana de tratamiento. Estudios recientes han demostrado cómo una concentración mayor de 0,35 mg/L un día después de la primera dosis se relaciona con niveles aceptables en la primera semana (estado estacionario)<sup>118</sup>. Posteriormente, se evaluaron las concentraciones en el segundo día de tratamiento con posaconazol cuatro horas después de la administración de la dosis, con la intención de predecir las concentraciones en el estado estacionario en el día siete. Los resultados fueron prometedores, siete de los 16 (43%) pacientes que en el segundo día de tratamiento mostraron concentraciones inferiores a 0,35 mg/L, no lograron alcanzar concentraciones mayores de 0,70 mg/L en la primera semana. Por el contrario, el 57% (9/16) de los pacientes con concentraciones superiores a 0,35 mg/L en el segundo día de tratamiento superaron el valor de 0,70 mg/L tras la primera semana<sup>119</sup>. A pesar de estos datos, deben realizarse más estudios que demuestren la validez clínica de esta predicción, ya que la cohorte de pacientes estudiados fue poco numerosa.

En pacientes críticos, en los que es muy importante el ajuste de dosis para optimizar el tratamiento tan rápido como sea posible, podría ser aceptable obtener varias muestras de una manera frecuente a intervalos regulares en la primera semana de tratamiento<sup>118</sup>.

La metodología disponible para la cuantificación de posaconazol en muestras de suero y plasma humano es amplia y

muy variable cómo se muestra en la tabla 1. Todos estos métodos tienen una precisión y exactitud aceptables para llevar a cabo la monitorización de este compuesto.

En conclusión, la monitorización de posaconazol es una herramienta útil en el manejo clínico de pacientes en tratamiento o profilaxis, pero son necesarios estudios prospectivos que ayuden a definir el tiempo y el número de muestras óptimo para la monitorización, que puedan ayudar a redefinir las concentraciones diana, y que establezcan objetivos de monitorización específicos para determinadas poblaciones de pacientes y escenarios clínicos. Así mismo, la monitorización es útil si se quiere documentar si el proceso de absorción se ve afectado por patologías del paciente o medicaciones concomitantes.

### VORICONAZOL

Voriconazol es un compuesto triazólico con un amplio espectro antifúngico<sup>96</sup>, considerado agente de primera línea en el tratamiento de la aspergilosis invasora<sup>120, 121</sup>. Su uso está igualmente indicado en el tratamiento de otras infecciones fúngicas de gran relevancia como candidiasis invasora, fusariosis y scedosporiosis<sup>122</sup>.

Está disponible tanto en formulaciones orales como en formulación intravenosa y se caracteriza por un metabolismo hepático saturable<sup>123, 124</sup>. La biodisponibilidad de la formulación oral en ayunas es del 90%, alcanzándose la C<sub>max</sub> dos horas después de su administración. La presencia de alimentos disminuye su biodisponibilidad aproximadamente en un 22% y retrasa la absorción, por lo que no se recomienda su administración junto a las comidas. Desde el punto de vista farmacocinético destaca su buena penetración en tejidos, especialmente sistema nervioso central, humor acuoso y humor vítreo. Se ha estimado un volumen de distribución de 4,6 L/Kg y una tasa de unión a proteínas plasmáticas del 58%. El estado estacionario se alcanza a los 5-7 días de tratamiento, aunque este tiempo puede reducirse con la administración de una dosis de carga<sup>125</sup>.

El metabolismo hepático saturable hace que voriconazol tenga una farmacocinética no lineal, por lo que las concentraciones sanguíneas detectadas no son proporcionales a las dosis administradas. Este metabolismo se produce a través del complejo de enzimas hepáticas Citocromo P450 (CYP450) y más concretamente a través de las isoenzimas CYP2C19, CYP3A4 y CYP2C9. La evidencia actual apunta al CYP2C19 como la enzima más importante involucrada en este proceso metabólico<sup>126</sup> debido a su gran afinidad por la molécula de voriconazol generando diferentes metabolitos sin actividad antifúngica<sup>127</sup> como voriconazol N-óxido (UK 125,265) e hidroximetil-voriconazol. Se ha descrito que el gen que codifica la isoenzima CYP2C19 es altamente polimórfico por lo que existe gran variabilidad poblacional que afecta a la expresión o actividad de la enzima. Así según la capacidad de la enzima CYP2C19 de metabolizar su sustrato se han clasificado los siguientes fenotipos: metabolizadores lentos (Poor Metabolizers, PM, portadores de un gen delecionado o defectivo que se traduce en una proteína con función disminuida), metabolizadores rápidos (Extensive Metabolizers, EM, portadores de genes

funcionales y por tanto con una enzima con actividad normal,) y metabolizadores ultrarrápidos (Ultrafast Metabolizers, UM, que presentan alteraciones genéticas que conducen a aumentos de expresión y en consecuencia de la actividad enzimática correspondiente). Aquellos pacientes con fenotipo metabolizador lento pueden mostrar concentraciones de voriconazol muy superiores comparadas con los que muestran un fenotipo metabolizador rápido o ultrarrápido. En consecuencia, cada vez más datos reportan que la condición de ser portador de una determinada variante genética del isoenzima CYP2C19 puede implicar en el paciente tratado con voriconazol (sustrato de la enzima) una exposición al fármaco y sus metabolitos diferente, constituyendo esta una información útil para el manejo del paciente en tratamiento, aunque la dosificación de voriconazol no debe estar basada solamente en este polimorfismo genético<sup>128</sup>.

Otros factores como la edad, el sexo, la insuficiencia hepática, la administración de medicaciones concomitantes y cambios de terapia de una vía de administración a otra pueden influir en la exposición a voriconazol en el paciente tratado<sup>7</sup>. La edad y el sexo son factores que no justifican ajustes de dosis, aunque algunos trabajos muestran cómo los pacientes de mayor edad y los varones presentaron C<sub>max</sub> más elevadas<sup>7</sup>. Algo que contrasta con lo observado en la población pediátrica, en la que las concentraciones sanguíneas detectadas se mostraron proporcionales a las dosis administradas. Este tipo de población tiene una mayor capacidad de eliminación del fármaco por kilogramo de peso corporal, y en consecuencia las dosis necesarias para tratarlos deben de ser mayores si se comparan con las dosis que reciben los adultos<sup>129, 130</sup>.

Su uso debe ser evaluado con sumo cuidado en situaciones de insuficiencia hepática y, en aquellos pacientes en los que se decida tratar, la monitorización y la vigilancia de la función hepática deben ser llevadas a cabo para prevenir posibles reacciones adversas y de toxicidad. Otro de los factores fundamentales que influyen de manera importante en las concentraciones plasmáticas de voriconazol es la administración de medicaciones concomitantes que usan la misma ruta de metabolización, ya que actúan como sustratos de las mismas enzimas metabólicas (tabla 2). La gran cantidad de posibles interacciones farmacológicas justifica la necesidad de monitorizar concentraciones sanguíneas.

Cuando en el curso de un tratamiento se da el cambio de la administración intravenosa a la administración oral se produce, de manera general, una disminución en los niveles sanguíneos, especialmente evidente en pacientes con sobrepeso/obesidad<sup>128</sup>, que justifica la necesidad de monitorizar y modificar la dosis para mantener las concentraciones dentro del rango terapéutico. Pascual et al., en un estudio prospectivo recientemente publicado, recomiendan incrementar la dosis oral. Las simulaciones poblacionales realizadas con dosis mayores por vía oral (300-400 mg vía oral dos veces al día vs. 200-300 mg vía intravenosa dos veces al día), muestran que las probabilidades de alcanzar niveles terapéuticos ( $\geq 1,5$  mg/L) fueron similares (68-78% para el régimen oral y del 70-80% para el régimen intravenoso). Del mismo modo la probabilidad de su-

perar valores mayores de 4,5 mg/L fue igualmente comparable para las dos formulaciones (19-29% para el régimen oral y del 18-37% para el régimen intravenoso)<sup>131</sup>.

Se ha descrito que la administración de voriconazol produce autoinducción del metabolismo en pacientes pediátricos (activación de la capacidad metabólica del hígado), dando como resultado un mayor aclaramiento<sup>129</sup> y, en consecuencia, la disminución de los niveles plasmáticos.

Los efectos adversos están en su mayoría relacionados con concentraciones elevadas del antifúngico. Los efectos neurológicos asociados a altas concentraciones en líquido cefalorraquídeo y tejido cerebral varían desde simples alteraciones visuales hasta encefalopatía, insomnio, agitación, neuropatía periférica, falta de atención y ansiedad. Se ha observado un aumento del riesgo de alteraciones visuales cuando las concentraciones plasmáticas son mayores de 3 mg/L. Estos efectos adversos aparecen en la primera semana de tratamiento, reduciéndose la probabilidad de aparición en la segunda y disminuyendo progresivamente en sucesivas semanas<sup>128</sup>. La encefalopatía se ha descrito en pacientes con concentraciones plasmáticas mayores de 5,5 mg/L<sup>38, 132</sup> y el desarrollo de alucinaciones se ha observado cuando los niveles de voriconazol superan el valor de 5 mg/L<sup>53</sup>. A concentraciones mayores de 4,5 mg/L, los efectos adversos neurológicos se dan con más frecuencia que a concentraciones por debajo de 4,5 mg/L<sup>131</sup>.

Voriconazol es potencialmente hepatotóxico y varios son los estudios que ponen de manifiesto el daño hepático en diferentes cohortes de pacientes. Estos estudios muestran toxicidad hepática (aumento de aminotransferasa, AST, y fosfatasa alcalina, PA) cuando las concentraciones sanguíneas superaron valores de 6 mg/L<sup>38, 133, 134</sup>. En un estudio reciente realizado por Tan et al. se demostró que niveles plasmáticos mayores de 4 mg/L aumentaban las probabilidades de disfunción hepática de manera considerable. Por tanto en pacientes con problemas hepáticos de base, la recomendación es no sobrepasar esta concentración<sup>135</sup>. Estas reacciones adversas son reversibles con la interrupción del tratamiento<sup>136</sup>. Hay que añadir los efectos cutáneo-dermatológicos en pacientes con tratamiento de larga duración, como rash, eritema facial, queilitis y carcinoma de piel de células escamosas, como complicación de la fotosensibilidad derivada de la administración de voriconazol y se debe evitar la exposición directa a la luz solar durante el tratamiento<sup>137-139</sup>. Otros efectos adversos menos comunes son los efectos cardíacos, ya que altas dosis de voriconazol pueden producir arritmias y prolongación del intervalo QT<sup>140</sup>.

Todas estas reacciones adversas encontradas en los estudios realizados, así como los resultados obtenidos que relacionan concentración y eficacia en diferentes cohortes de pacientes han contribuido a establecer un rango terapéutico orientativo. Así, Pascual et al. observaron que la falta de respuesta al tratamiento se asociaba con concentraciones de voriconazol inferiores a 1 mg/L, mientras que la probabilidad de aparición de efectos adversos aumentaba en pacientes con concentraciones plasmáticas por encima de 5 mg/L. En este trabajo se establece un rango terapéutico guía para la monitorización

de voriconazol entre 1 y 5,5 mg/L<sup>38</sup>, que actualmente está en vigor en las recomendaciones de las guías de tratamiento. Sin embargo, Smith et al. y Miyakis et al. proponen alcanzar concentraciones superiores a 2,05-2,20 mg/L para obtener una respuesta favorable<sup>141, 142</sup>. Ueda et al. establecieron un intervalo terapéutico entre 2 y 6 mg/L, reduciendo el límite superior de este intervalo a 4 mg/L en el caso de pacientes con enfermedad hepática previa<sup>134</sup>.

En el primer ensayo controlado randomizado que evalúa el efecto de la monitorización de voriconazol en su eficacia y seguridad, se seleccionó el rango terapéutico de Pascual et al. (1-5,5 mg/L) como referencia a la hora de tomar decisiones en cuanto a modificaciones de dosis y discontinuación de tratamiento. Con la monitorización de las concentraciones plasmáticas de voriconazol se redujo la discontinuación de tratamiento debida a efectos adversos y mejoró la respuesta al tratamiento en IFI. Así mismo, el rango terapéutico calculado con los datos de este ensayo, dejaría éste entre valores de 2-5,5 mg/L. Más recientemente se ha publicado otro ensayo prospectivo, en el que el rango terapéutico<sup>143</sup> para voriconazol se establece mediante un análisis logístico multivariante. Con los datos de este estudio el rango terapéutico quedaría definido entre 1,5-4,5 mg/L. Con concentraciones mayores de 1,5 mg/L habría más del 85% de probabilidad de respuesta y con concentraciones menores de 4,5 mg/L la probabilidad de aparición de efectos neurotóxicos sería inferior al 15%<sup>131</sup>. Por lo tanto, el rango terapéutico podría ser modificado próximamente a la vista de los resultados de estos primeros estudios prospectivos y las conclusiones que de ellos pudieran extraer los comités de expertos.

En profilaxis, en un estudio reciente en trasplantados de pulmón donde se analizan 93 pacientes, los autores concluyen que las concentraciones diana para profilaxis serían diferentes entre las distintas poblaciones en estudio<sup>144</sup>. Para corroborar esta afirmación harían falta más estudios clínicos.

Todos los estudios anteriormente descritos exponen la gran variabilidad tanto interindividual como intraindividual en las concentraciones plasmáticas de voriconazol, así como la incapacidad de predecir estas en función de las dosis administradas a cada paciente. Trifilio et al. observaron una gran variabilidad intra e interpaciente en las concentraciones plasmáticas detectadas, así como la falta de relación entre las dosis administradas y los niveles obtenidos<sup>133, 145</sup>. Un resumen de los estudios más destacados referidos en la literatura sobre voriconazol, toxicidad y eficacia se presenta en la tabla 4, así como las recomendaciones para la monitorización, que quedan expuestas en la tabla 3.

En lo que respecta a la población pediátrica hay menos estudios publicados que para la población adulta. En 2010, en un estudio con 5 pacientes pediátricos monitorizados, se observó que los niveles de voriconazol obtenidos no se correlacionaban con la dosis administrada recomendándose la monitorización en este grupo de pacientes<sup>129</sup>. Neely et al. analizaron los resultados obtenidos de una serie de 46 pacientes pediátricos estableciendo una relación entre la mejoría y las concentraciones

plasmáticas, así como la dosificación necesaria para alcanzar niveles mayores de 1 mg/L. Mediante simulaciones farmacocinéticas, predijeron una dosis de 7 mg/kg en el caso de que la administración fuera intravenosa, o bien una dosis oral de 200 mg dos veces al día para alcanzar la concentración de 1 mg/L en la mayoría de los pacientes<sup>146</sup>. Brüggemann et al. en un estudio en el que incluye pacientes pediátricos refuerza la necesidad de monitorizar voriconazol desde el inicio de la terapia especialmente en este grupo<sup>147</sup>. Shima et al. observaron que los pacientes menores de 3 años de edad requerían dosis mayores en comparación con aquellos mayores de 3 años, habiendo una mayor variabilidad de niveles después del ajuste de dosis en los primeros. Las dosis óptimas que debían ser administradas eran de 17 mg/kg en los pacientes <3 años y 8 mg/kg en los pacientes >3 años<sup>148</sup>. En otro estudio, en pacientes menores de doce años, para alcanzar niveles plasmáticos adecuados la dosis de voriconazol debe ser de 7 mg/kg. La mayor variabilidad en los menores de tres años es debida a un mayor efecto de primer paso hepático y a un mayor flujo sanguíneo hepático, por lo que el aclaramiento del fármaco es mayor. Esto afecta también a la dosis a administrar, que debe ser, por lo tanto, mayor en los menores de tres años<sup>125</sup>. Todas estas afirmaciones deben ser evaluadas más adelante en más ensayos clínicos, ya que se trata de un estudio retrospectivo que incluyó pocos pacientes.

No existen demasiadas evidencias que relacionen exposición de voriconazol y efecto en infecciones producidas por cepas con sensibilidad disminuida. Mavridou et al. muestran la necesidad de incrementar la exposición de forma significativa para obtener cierto grado de respuesta en un modelo experimental murino de aspergilosis con cepas resistentes o con susceptibilidad reducida a los azoles<sup>149</sup>.

En cuanto a la frecuencia de toma de muestra y análisis para la monitorización, una vez alcanzado el estado estacionario, una muestra a la semana parece suficiente teniendo en cuenta que aumentar esta frecuencia si se introducen o retiran medicaciones que interaccionen con voriconazol o bien cambian las condiciones fisiológicas del paciente. El momento ideal de la toma de muestra sería en el valle, el cual contribuye de manera significativa a estimar el área bajo la curva (ABC), parámetro farmacocinético que se ha relacionado con respuesta terapéutica<sup>1</sup>. Sin embargo existen datos que ponen en entredicho estas afirmaciones. Hope et al. establecieron que los siguientes puntos serían relevantes en el manejo clínico de un paciente en tratamiento con voriconazol: 1) una única concentración valle no sería de utilidad y es difícil de interpretar en pacientes en los cuales las concentraciones séricas son mayores que la Km (constante de Michaelis del sustrato), ya que habrá acumulación del fármaco y podría aumentar el riesgo de desarrollar toxicidad. 2) no hay un intervalo concreto para la toma de muestra, aunque una buena aproximación sería al final del segundo día y otra vez después de una semana de tratamiento. 3) diferenciación entre la toma de muestras para la optimización de la terapia y la toma de muestras para establecer la farmacocinética en un paciente concreto. Para llegar a recomendaciones definitivas, hacen falta más estu-

dios que definan tanto la frecuencia como el inicio óptimo de la monitorización de voriconazol.

Se han descrito numerosos métodos basados en HPLC, en LC-MS así como métodos microbiológicos (ver tabla 2). Respecto a estos últimos, hay que tener en cuenta que en los últimos años hay una mayor tendencia a la terapia combinada con voriconazol, por lo que estos métodos pueden perder utilidad a la hora de utilizarlos para la monitorización<sup>125</sup>.

En conclusión, la monitorización de voriconazol es, a día de hoy, una herramienta fundamental para asegurar el uso eficaz y seguro. Aunque ya han sido publicados los primeros estudios prospectivos, harían falta más donde se incluya la determinación de niveles séricos como una herramienta habitual en el manejo de las infecciones fúngicas invasoras, que ayudarán a modificar o mantener rango terapéutico, así como ver qué ventajas adicionales puede aportar la monitorización. Hay suficientes estudios para afirmar que la monitorización de voriconazol es una herramienta esencial en el manejo de pacientes en tratamiento o profilaxis.

## CONCLUSIONES

En el tratamiento de la infección fúngica, la posibilidad de monitorizar concentraciones sanguíneas de los antifúngicos ha supuesto un valor añadido en el manejo de los pacientes con esta patología. La monitorización de los azoles es actualmente una herramienta complementaria en el tratamiento de pacientes con infección fúngica invasora. Exceptuando fluconazol, cuyas características farmacodinámicas favorables hacen que la monitorización no sea necesaria en la gran mayoría de los pacientes, los resultados publicados de diferentes estudios con itraconazol, posaconazol y voriconazol hacen que su monitorización rutinaria deba ser tenida en cuenta, y en el caso de voriconazol obligatoria como herramienta de manejo en pacientes en tratamiento o profilaxis.

En cuanto a itraconazol y posaconazol, la monitorización de concentraciones valle es recomendable, siendo también la monitorización de la absorción una actitud terapéutica válida para asegurar la biodisponibilidad de ambos fármacos.

Por el contrario, no se dispone de datos ni estudios prospectivos que relacionen las concentraciones séricas con eficacia y toxicidad en el uso de anfotericina B y equinocandinas, y los datos poblacionales farmacocinéticos disponibles demuestran relaciones dosis exposición predecibles para estos antifúngicos. Por lo tanto la monitorización de estas dos familias de antifúngicos no está recomendada hasta este momento como herramienta para el manejo del paciente tratado con estos fármacos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hope WW, Billaud EM, Lestner J, et al. Therapeutic drug monitoring for triazoles. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 580-6.
2. Michael C, Bierbach U, Frenzel K, et al. Voriconazole pharma-

- cokinetics and safety in immunocompromised children compared to adult patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3225-32.
3. Gubbins PO, McConnell SA, Gurley BJ, et al. Influence of grapefruit juice on the systemic availability of itraconazole oral solution in healthy adult volunteers. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 460-7.
  4. Krishna G, Ma L, Vickery D, et al. Effect of varying amounts of a liquid nutritional supplement on the pharmacokinetics of posaconazole in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4749-52.
  5. Krishna G, Moton A, Ma L, et al. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 958-66.
  6. Penzak SR, Gubbins PO, Gurley BJ, et al. Grapefruit juice decreases the systemic availability of itraconazole capsules in healthy volunteers. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 304-9.
  7. Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 24-34.
  8. Neely M, Rushing T, Kovacs A, et al. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 27-36.
  9. Troke PF, Hockey HP, Hope WW. Observational study of the clinical efficacy of voriconazole and its relationship to plasma concentrations in patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4782-8.
  10. Ayub AC, Vianna-Soares CD, Ferreira LA. Fluconazol method validation by RP-HPLC for determination in biological skin matrices. *J Chromatogr Sci* 2007; 45: 286-90.
  11. Baranowska I, Markowski P, Baranowski J. Development and validation of an HPLC method for the simultaneous analysis of 23 selected drugs belonging to different therapeutic groups in human urine samples. *Anal Sci* 2009; 25: 1307-13.
  12. Carrasco-Portugal MC, Flores-Murrieta FJ. Gender differences in the oral pharmacokinetics of fluconazole. *Clin Drug Investig* 2007; 27: 851-5.
  13. Cociglio M, Brandissou S, Alric R, et al. High-performance liquid chromatographic determination of fluconazole in plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 686: 11-7.
  14. Gordien JB, Pigneux A, Vigouroux S, et al. Simultaneous determination of five systemic azoles in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50: 932-8.
  15. Kami M, Sawada Y, Mori S, et al. Serum levels of fluconazole in patients after cytotoxic chemotherapy for hematological malignancy. *Am J Hematol* 2001; 66: 85-91.
  16. Kim SS, Im HT, Kang IM, et al. An optimized analytical method of fluconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852: 174-9.
  17. Majcherczyk PA, Moreillon P, Decosterd LA, et al. Single-step extraction of fluconazole from plasma by ultra-filtration for the measurement of its free concentration by high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 28: 645-51.
  18. Wattananat T, Akarawut W. Validated HPLC method for the determination of fluconazole in human plasma. *Biomed Chromatogr* 2006; 20: 1-3.
  19. Abdel-Rahman SM, Jacobs RF, Massarella J, et al. Single-dose pharmacokinetics of intravenous itraconazole and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in infants, children, and adolescents. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2668-73.
  20. Al Rawithi S, Hussein R, Al Moshen I, et al. Expedient microdetermination of itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 445-8.
  21. Compas D, Touw DJ, de Goede PN. Rapid method for the analysis of itraconazole and hydroxyitraconazole in serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 687: 453-6.
  22. Cox SK, Orosz S, Burnette J, et al. Microassay for determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma and tissue biopsies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 702: 175-80.
  23. Darouiche RO, Setoodeh A, Anaissie EJ. Potential use of a simplified method for determination of itraconazole levels in plasma and esophageal tissue by using high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 757-9.
  24. Gubbins PO, Gurley BJ, Bowman J. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of itraconazole and its hydroxy-metabolite in human serum. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 16: 1005-12.
  25. Khoschorur G, Fruehwirth F, Zelzer S. Isocratic high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for simultaneous determination of levels of voriconazole and itraconazole and its hydroxy metabolite in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3569-71.
  26. Kintzel PE, Rollins CJ, Yee WJ, et al. Low itraconazole serum concentrations following administration of itraconazole suspension to critically ill allogeneic bone marrow transplant recipients. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 140-3.
  27. Lacroix C, Wojciechowski F, Danger P. Simultaneous determination of itraconazole, hydroxy-itraconazole and amphotericin B in human plasma by HPLC with photodiode array detection. *Ann Biol Clin (Paris)* 1995; 53: 293-7.
  28. Mouton JW, van Peer A, de Beule K, et al. Pharmacokinetics of itraconazole and hydroxyitraconazole in healthy subjects after single and multiple doses of a novel formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4096-102.
  29. Ohkubo T, Osanai T. Determination of itraconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 94-8.
  30. Reynes J, Bazin C, Ajana F, et al. Pharmacokinetics of itraconazole (oral solution) in two groups of human immunodeficiency

- virus-infected adults with oral candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2554-8.
31. Rifai N, Sakamoto M, Platt O, et al. A high-performance liquid chromatographic assay for the determination of itraconazole concentration using solid-phase extraction and small sample volume. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 522-5.
  32. Srivatsan V, Dasgupta AK, Kale P, et al. Simultaneous determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2004; 1031: 307-13.
  33. Chhun S, Rey E, Tran A, et al. Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852: 223-8.
  34. Gage R, Stopher DA. A rapid HPLC assay for voriconazole in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17: 1449-53.
  35. Kahle K, Langmann P, Schirmer D, et al. Simultaneous determination of voriconazole and posaconazole concentrations in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3140-2.
  36. Langman LJ, Boakye-Agyeman F. Measurement of voriconazole in serum and plasma. *Clin Biochem* 2007; 40: 1378-85.
  37. Michael C, Teichert J, Preiss R. Determination of voriconazole in human plasma and saliva using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 865: 74-80.
  38. Pascual A, Calandra T, Bolay S, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 201-11.
  39. Pennick GJ, Clark M, Sutton DA, et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2348-50.
  40. Steinmann J, Huelsewede J, Buer J, et al. Comparison and evaluation of a novel bioassay and high-performance liquid chromatography for the clinical measurement of serum voriconazole concentrations. *Mycoses* 2010.
  41. Muller C, Arndt M, Queckenberg C, et al. HPLC analysis of the antifungal agent posaconazole in patients with haematological diseases. *Mycoses* 2006; 49 Suppl 1: 17-22.
  42. Neubauer W, König A, Bolek R, et al. Determination of the antifungal agent posaconazole in human serum by HPLC with parallel column-switching technique. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877: 2493-8.
  43. Storzinger D, Swoboda S, Lichtenstern C, et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for posaconazole utilizing solid-phase extraction. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 1747-51.
  44. Thompson GR, III, Rinaldi MG, Pennick G, et al. Posaconazole therapeutic drug monitoring: a reference laboratory experience. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2223-4.
  45. Chahbouni A, Wilhelm AJ, den Burger JC, et al. Validated liquid chromatography-tandem mass spectroscopy method for the simultaneous quantification of four antimycotic agents in human serum. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 453-7.
  46. Egle H, Trittler R, Kummerer K. A new, rapid, fully automated method for determination of fluconazole in serum by column-switching liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 425-31.
  47. Pereira R, Fidelis S, Vanunci ML, et al. Bioequivalence study of two fluconazole capsule formulations in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42: 39-42.
  48. Wu D, Wade KC, Paul DJ, et al. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of fluconazole in human plasma and its application in infants with Candida infections. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 703-9.
  49. Rhim SY, Park JH, Park YS, et al. A sensitive validated LC-MS/MS method for quantification of itraconazole in human plasma for pharmacokinetic and bioequivalence study in 24 Korean volunteers. *Pharmazie* 2009; 64: 71-5.
  50. Alffenaar JW, Wessels AM, van Hateren K, et al. Method for therapeutic drug monitoring of azole antifungal drugs in human serum using LC/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878: 39-44.
  51. Egle H, Trittler R, König A, et al. Fast, fully automated analysis of voriconazole from serum by LC-LC-ESI-MS-MS with parallel column-switching technique. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 814: 361-7.
  52. Xiong X, Duan J, Zhai S, et al. Fast and reliable determination of voriconazole in human plasma by LC-APCI-MS/MS. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 2151-3.
  53. Zonios DI, Gea-Banacloche J, Childs R, et al. Hallucinations during voriconazole therapy. *Clin Infect Dis* 2008; 47: e7-e10.
  54. Cunliffe JM, Noren CF, Hayes RN, et al. A high-throughput LC-MS/MS method for the quantitation of posaconazole in human plasma: Implementing fused core silica liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50: 46-52.
  55. Farowski F, Cornely OA, Vehreschild JJ, et al. Quantitation of azoles and echinocandins in compartments of peripheral blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1815-9.
  56. Shen JX, Krishna G, Hayes RN. A sensitive liquid chromatography and mass spectrometry method for the determination of posaconazole in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 228-36.
  57. Vogeser M, Rieger C, Ostermann H, et al. A routine method for the quantification of the novel antimycotic drug posaconazole in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 579-84.
  58. Huelsewede JW, Dermoumi H. Serum level determination of fluconazole by high-performance liquid chromatography and bioassay. *Zentralbl Bakteriol* 1996; 283: 492-6.
  59. Marchetti O, Majcherczyk PA, Glauser MP, et al. Sensitive bioassay for determination of fluconazole concentrations in plasma using a *Candida albicans* mutant hypersusceptible to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 696-700.

60. Rex JH, Hanson LH, Amantea MA, et al. Standardization of a fluconazole bioassay and correlation of results with those obtained by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 846-50.
61. Hostetler JS, Heykants J, Clemons KV, et al. Discrepancies in bioassay and chromatography determinations explained by metabolism of itraconazole to hydroxyitraconazole: studies of interpatient variations in concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2224-7.
62. Hulsewede JW, Dermoumi H, Ansorg R. Determination of itraconazole and hydroxy-itraconazole in sera using high-performance-liquid-chromatography and a bioassay. *Zentralbl Bakteriol* 1995; 282: 457-64.
63. Law D, Moore CB, Denning DW. Bioassay for serum itraconazole concentrations using hydroxyitraconazole standards. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1561-6.
64. Law D, Moore CB, Denning DW. Discrepancies associated with the measurement of itraconazole serum concentrations by bioassays. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 577-8.
65. Warnock DW, Turner A, Burke J. Comparison of high performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21: 93-100.
66. Pascual A, Nieth V, Calandra T, et al. Variability of voriconazole plasma levels measured by new high-performance liquid chromatography and bioassay methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 137-43.
67. Perea S, Pennick GJ, Modak A, et al. Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1209-13.
68. Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodriguez-Tudela JL, et al. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 1229-35.
69. Rochat B, Pascual A, Pesse B, et al. Ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry and sensitive bioassay methods for quantification of posaconazole plasma concentrations after oral dosing. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5074-81.
70. Sugar AM, Anaissie EJ, Graybill JR, et al. Fluconazole. *J Med Vet Mycol* 1992; 30 Suppl 1: 201-12.
71. Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, Huls C, et al. Safety, plasma concentrations, and efficacy of high-dose fluconazole in invasive mold infections. *J Infect Dis* 1995; 172: 599-602.
72. McLachlan AJ, Tett SE. Pharmacokinetics of fluconazole in people with HIV infection: a population analysis. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 41: 291-8.
73. Louie A, Liu QF, Drusano GL, et al. Pharmacokinetic studies of fluconazole in rabbits characterizing doses which achieve peak levels in serum and area under the concentration-time curve values which mimic those of high-dose fluconazole in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1512-4.
74. Louie A, Drusano GL, Banerjee P, et al. Pharmacodynamics of fluconazole in a murine model of systemic candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1105-9.
75. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 435-47.
76. Rodriguez-Tudela JL, Almirante B, Rodriguez-Pardo D, et al. Correlation of the MIC and dose/MIC ratio of fluconazole to the therapeutic response of patients with mucosal candidiasis and candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3599-604.
77. Cousin L, Berre ML, Launay-Vacher V, et al. Dosing guidelines for fluconazole in patients with renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2227-31.
78. Santos SR, Campos EV, Sanches C, et al. Fluconazole plasma concentration measurement by liquid chromatography for drug monitoring of burn patients. *Clinics (Sao Paulo)* 2010; 65: 237-43.
79. de Beule K, Van Gestel J. Pharmacology of itraconazole. *Drugs* 2001; 61 Suppl 1: 27-37.
80. Cartledge JD, Midgely J, Gazzard BG. Itraconazole solution: higher serum drug concentrations and better clinical response rates than the capsule formulation in acquired immunodeficiency syndrome patients with candidosis. *J Clin Pathol* 1997; 50: 477-80.
81. Stevens DA. Itraconazole in cyclodextrin solution. *Pharmacotherapy* 1999; 19: 603-11.
82. Denning DW, Tucker RM, Hanson LH, et al. Itraconazole therapy for cryptococcal meningitis and cryptococcosis. *Arch Intern Med* 1989; 149: 2301-8.
83. Denning DW, Tucker RM, Hanson LH, et al. Treatment of invasive aspergillosis with itraconazole. *Am J Med* 1989; 86: 791-800.
84. Hardin TC, Graybill JR, Fetchick R, et al. Pharmacokinetics of itraconazole following oral administration to normal volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1310-3.
85. Lazo dl, V, Volkow P, Yeates RA, et al. Administration of the antimycotic agents fluconazole and itraconazole to leukaemia patients: a comparative pharmacokinetic study. *Drugs Exp Clin Res* 1994; 20: 69-75.
86. Van de Velde V, Van Peer AP, Heykants JJ, et al. Effect of food on the pharmacokinetics of a new hydroxypropyl-beta-cyclodextrin formulation of itraconazole. *Pharmacotherapy* 1996; 16: 424-8.
87. van Peer A, Woestenborghs R, Heykants J, et al. The effects of food and dose on the oral systemic availability of itraconazole in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 36: 423-6.
88. Templeton IE, Thummel KE, Kharasch ED, et al. Contribution of itraconazole metabolites to inhibition of CYP3A4 in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83: 77-85.
89. Smith J, Andes D. Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 167-72.

90. Glasmacher A, Molitor E, Hahn C, et al. Antifungal prophylaxis with itraconazole in neutropenic patients with acute leukaemia. *Leukemia* 1998; 12: 1338-43.
91. Glasmacher A, Hahn C, Leutner C, et al. Breakthrough invasive fungal infections in neutropenic patients after prophylaxis with itraconazole. *Mycoses* 1999; 42: 443-51.
92. Buchkowsky SS, Partovi N, Ensom MH. Clinical pharmacokinetic monitoring of itraconazole is warranted in only a subset of patients. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 322-33.
93. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 807-25.
94. Goodwin ML, Drew RH. Antifungal serum concentration monitoring: an update. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 17-25.
95. Cendejas-Bueno E, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A. A simple, sensitive HPLC-PDA method for the quantification of itraconazole and hydroxy itraconazole in human serum: a reference laboratory experience. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76: 314-20.
96. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, et al. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 917-21.
97. Greenberg RN, Mullane K, van Burik JA, et al. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 126-33.
98. van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, et al. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect Dis* 2006; 42: e61-e65.
99. Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, et al. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 2-12.
100. Krishna G, Ma L, Martinho M, et al. Single-dose phase I study to evaluate the pharmacokinetics of posaconazole in new tablet and capsule formulations relative to oral suspension. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 4196-201.
101. Krishna G, Ma L, Martinho M, et al. A new solid oral tablet formulation of posaconazole: a randomized clinical trial to investigate rising single- and multiple-dose pharmacokinetics and safety in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2725-30.
102. Courtney R, Pai S, Laughlin M, et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2788-95.
103. Courtney R, Radwanski E, Lim J, et al. Pharmacokinetics of posaconazole coadministered with antacid in fasting or nonfasting healthy men. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 804-8.
104. Krieter P, Flannery B, Musick T, et al. Disposition of posaconazole following single-dose oral administration in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3543-51.
105. Courtney R, Wexler D, Radwanski E, et al. Effect of food on the relative bioavailability of two oral formulations of posaconazole in healthy adults. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57: 218-22.
106. Walravens J, Brouwers J, Spriet I, et al. Effect of pH and comedication on gastrointestinal absorption of posaconazole: monitoring of intraluminal and plasma drug concentrations. *Clin Pharmacokinet* 2011; 50: 725-34.
107. Vaes M, Hites M, Cotton F, et al. Therapeutic drug monitoring of posaconazole in patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 6298-303.
108. Tonini J, Thiebaut A, Jourdil JF, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Posaconazole in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients Who Develop Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5247-52.
109. Andes D, Marchillo K, Conklin R, et al. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 137-42.
110. Mavridou E, Bruggemann RJ, Melchers WJ, et al. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 860-5.
111. Lebeaux D, Lanternier F, Elie C, et al. Therapeutic drug monitoring of posaconazole: a monocentric study with 54 adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5224-9.
112. Neubauer WC, Engelhardt M, König A, et al. Therapeutic drug monitoring of posaconazole in hematology patients: experience with a new high-performance liquid chromatography-based method. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4029-32.
113. Jang SH, Colangelo PM, Gobburu JV. Exposure-response of posaconazole used for prophylaxis against invasive fungal infections: evaluating the need to adjust doses based on drug concentrations in plasma. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88: 115-9.
114. Dolton MJ, Ray JE, Chen SC, et al. Multicenter study of posaconazole therapeutic drug monitoring: exposure-response relationship and factors affecting concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5503-10.
115. FDA. Accessed 17 February 2009. Posaconazole. FDA briefing document. In: 2010.
116. Krishna G, Martinho M, Chandrasekar P, et al. Pharmacokinetics of oral posaconazole in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients with graft-versus-host disease. *Pharmacotherapy* 2007; 27: 1627-36.
117. Welzen ME, Bruggemann RJ, Van Den Berg JM, et al. A Twice Daily Posaconazole Dosing Algorithm for Children With Chronic Granulomatous Disease. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 794-7.
118. Howard SJ, Felton TW, Gomez-Lopez A, et al. Posaconazole: the case for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2012; 34: 72-6.
119. Green MR, Woolery JE. Posaconazole serum level on day 2 predicts steady state posaconazole serum level. *Ther Drug Monit* 2012; 34: 118-9.

120. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347: 408-15.
121. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 327-60.
122. FDA. Voriconazole label information. NDA no 021266.2008:1-50. In: 2008.
123. Saari TI, Laine K, Leino K, et al. Voriconazole, but not terbinafine, markedly reduces alfentanil clearance and prolongs its half-life. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 502-8.
124. Tintillier M, Kirch L, Goffin E, et al. Interaction between voriconazole and tacrolimus in a kidney-transplanted patient. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 664-5.
125. Bruggemann RJ, Donnelly JP, Aarnoutse RE, et al. Therapeutic drug monitoring of voriconazole. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 403-11.
126. Jeu L, Piacenti FJ, Lyakhovetskiy AG, et al. Voriconazole. *Clin Ther* 2003; 25: 1321-81.
127. Roffey SJ, Cole S, Comby P, et al. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 731-41.
128. Pasqualotto AC, Xavier MO, Andreolla HF, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring: focus on safety. *Expert Opin Drug Saf* 2010; 9: 125-37.
129. Pasqualotto AC, Shah M, Wynn R, et al. Voriconazole plasma monitoring. *Arch Dis Child* 2008; 93: 578-81.
130. Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, et al. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med* 2002; 346: 225-34.
131. Pascual A, Csajka C, Buclin T, et al. Challenging recommended oral and intravenous voriconazole doses for improved efficacy and safety: population pharmacokinetics-based analysis of adult patients with invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 381-90.
132. Imhof A, Schaer DJ, Schanz U, et al. Neurological adverse events to voriconazole: evidence for therapeutic drug monitoring. *Swiss Med Wkly* 2006; 136: 739-42.
133. Trifilio S, Pennick G, Pi J, et al. Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer* 2007; 109: 1532-5.
134. Ueda K, Nannya Y, Kumano K, et al. Monitoring trough concentration of voriconazole is important to ensure successful antifungal therapy and to avoid hepatic damage in patients with hematological disorders. *Int J Hematol* 2009; 89: 592-9.
135. Tan K, Brayshaw N, Tomaszewski K, et al. Investigation of the potential relationships between plasma voriconazole concentrations and visual adverse events or liver function test abnormalities. *J Clin Pharmacol* 2006; 46: 235-43.
136. Berge M, Guillemain R, Boussaud V, et al. Voriconazole pharmacokinetic variability in cystic fibrosis lung transplant patients. *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 211-9.
137. Boyd AE, Modi S, Howard SJ, et al. Adverse reactions to voriconazole. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1241-4.
138. Denning DW, Griffiths CE. Muco-cutaneous retinoid-effects and facial erythema related to the novel triazole antifungal agent voriconazole. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 648-53.
139. Vanacker A, Fabre G, Van Dorpe J, et al. Aggressive cutaneous squamous cell carcinoma associated with prolonged voriconazole therapy in a renal transplant patient. *Am J Transplant* 2008; 8: 877-80.
140. Philips JA, Marty FM, Stone RM, et al. Torsades de pointes associated with voriconazole use. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 33-6.
141. Miyakis S, van Hal SJ, Ray J, et al. Voriconazole concentrations and outcome of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 927-33.
142. Smith J, Safdar N, Knasinski V, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1570-2.
143. Park WB, Kim NH, Kim KH, et al. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 1080-7.
144. Mitsani D, Nguyen MH, Shields RK, et al. A prospective, observational study of voriconazole therapeutic drug monitoring among lung transplant recipients receiving prophylaxis: Factors impacting levels and associations between serum troughs, efficacy and toxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2012.
145. Trifilio S, Ortiz R, Pennick G, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 509-13.
146. Neely M, Rushing T, Kovacs A, et al. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 27-36.
147. Bruggemann RJ, van der Linden JW, Verweij PE, et al. Impact of therapeutic drug monitoring of voriconazole in a pediatric population. *Pediatr Infect Dis J* 2010.
148. Shima H, Miharu M, Osumi T, et al. Differences in voriconazole trough plasma concentrations per oral dosages between children younger and older than 3 years of age. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54: 1050-2.
149. Mavridou E, Bruggemann RJ, Melchers WJ, et al. Impact of cyp51A mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4758-64.



## 2.- Planteamiento y objetivo.

## 2.1.- Planteamiento.

Los triazoles de uso sistémico disponibles actualmente para el uso clínico son fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol. Así mismo, actualmente está en fase de desarrollo y estudio isavuconazol. Estos fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad fúngica invasora (EFI), junto a la familia de las equinocandinas, han revolucionado tanto el tratamiento como la evolución de los pacientes con este tipo de patologías. Pero al contrario que en el caso de las equinocandinas, que han demostrado tener un perfil farmacocinético estable y no presentan variabilidad farmacocinética intraindividual y tampoco interpoblacional (Gautier-Veyret, Fonrose et al., 2015; Saini, Seki et al., 2014), los azoles presentan ciertas peculiaridades que explican que su farmacocinética varíe de unos individuos a otros (Hope, Billaud et al., 2008).

La monitorización de fármacos tiene por objetivo maximizar la probabilidad de éxito terapéutico, minimizando la probabilidad de toxicidad. Las recomendaciones específicas para la monitorización varían en función del fármaco a monitorizar y el contexto clínico en el que se produzca la administración de este.

En la actualidad, disponemos de recomendaciones de expertos y distintas sociedades médicas que apoyan la necesidad de realizar una monitorización. Cada día hay mayores evidencias de que la monitorización de azoles ayuda al ajuste de la dosis efectiva, previene la administración de dosis relacionadas con toxicidad y permite una adecuada vigilancia de la biodisponibilidad, especialmente en aquellos fármacos que se administran por vía oral (Andes, Pascual et al., 2009).

El desarrollo y validación de técnicas analíticas reproducibles y fiables permiten monitorizar la exposición de antifúngicos en el paciente tratado y constituyen una herramienta complementaria que facilita el manejo del paciente con EFI, asegurando un uso eficaz y seguro de los antifúngicos triazólicos sistémicos (Dolton, Ray et al., 2012; Hope, Billaud et al., 2008; Kintzel, Rollins et al., 1995; Park, Kim et al., 2012; Pascual, Calandra et al., 2008; Ashbee, Barnes et al., 2014; Bruggemann and Aarnoutse, 2015; Lewis, 2011).

## 2.2.- Objetivo.

De acuerdo con las necesidades actuales en el manejo de la EFI, el objetivo de esta tesis fue implementar métodos analíticos válidos basados en la cromatografía líquida de alta eficacia

(HPLC) y en métodos microbiológicos (bioensayos) para la cuantificación de concentraciones sanguíneas de antifúngicos azólicos (itraconazol, voriconazol y posaconazol). Se desarrollaron y validaron para su aplicación en monitorización de pacientes tratados, así como para el estudio de la relación exposición-respuesta en modelos animales de infección.

### 2.3.- Desarrollo del objetivo.

El desarrollo de los métodos analíticos y su validación se realizó de manera secuencial:

- Desarrollo y validación de un método cromatográfico y microbiológico (HPLC-UV) para la detección y la cuantificación de voriconazol en muestras de suero humano.
- Desarrollo y validación de un método cromatográfico, mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de fotodiodos (HPLC-UV) para la detección y cuantificación de itraconazol y su metabolito activo hidroxitraconazol en muestras de suero humano.
- Desarrollo y validación de un método cromatográfico (HPLC-UV) y microbiológico para la detección y la cuantificación de posaconazol en muestras de suero humano.
- Desarrollo y validación de un método (HPLC-UV) aplicable a estudios exposición-respuesta con posaconazol en un modelo murino de aspergilosis invasiva
- Validación de un modelo alternativo de aspergilosis en invertebrado ( larvas de *Galleria mellonella*) para estudios de virulencia.
- Estudio de la correlación *in vivo-in vitro* con azoles en el modelo de aspergilosis en invertebrado (modelo *Galleria mellonella*).
- Estudios farmacodinámicos en pacientes monitorizados en tratamiento con voriconazol. Establecimiento de relaciones dosis- eficacia, y recopilación de datos clínicos que ayuden a aclarar el papel de la monitorización en el manejo de la EFI.

### Bibliografía

Andes,D., Pascual,A., Marchetti,O., 2009. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 24-34.

Ashbee,H.R., Barnes,R.A., Johnson,E.M., Richardson,M.D., Gorton,R., Hope,W.W., 2014. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69, 1162-1176.

Bruggemann,R.J., Aarnoutse,R.E., 2015. Fundament and Prerequisites for the Application of an Antifungal TDM Service. *Curr. Fungal. Infect. Rep.*, 9, 122-129.

Dolton,M.J., Ray,J.E., Chen,S.C., Ng,K., Pont,L., McLachlan,A.J., 2012. Multicenter study of posaconazole therapeutic drug monitoring: exposure-response relationship and factors affecting concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56, 5503-5510.

Gautier-Veyret,E., Fonrose,X., Tonini,J., Thiebaut-Bertrand,A., Bartoli,M., Quesada,J.L., Bulabois,C.E., Cahn,J.Y., Stanke-Labesque,F., 2015. Variability of voriconazole plasma concentrations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of CYP450 polymorphisms and comedications on initial and subsequent trough levels. *Antimicrob. Agents Chemother.*.

Hope,W.W., Billaud,E.M., Lestner,J., Denning,D.W., 2008. Therapeutic drug monitoring for triazoles. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 21, 580-586.

Kintzel,P.E., Rollins,C.J., Yee,W.J., List,A.F., 1995. Low itraconazole serum concentrations following administration of itraconazole suspension to critically ill allogeneic bone marrow transplant recipients. *Ann. Pharmacother.*, 29, 140-143.

Lewis,R.E., 2011. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin. Proc.*, 86, 805-817.

Park,W.B., Kim,N.H., Kim,K.H., Lee,S.H., Nam,W.S., Yoon,S.H., Song,K.H., Choe,P.G., Kim,N.J., Jang,I.J., Oh,M.D., Yu,K.S., 2012. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.*, 55, 1080-1087.

Pascual,A., Calandra,T., Bolay,S., Buclin,T., Bille,J., Marchetti,O., 2008. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin. Infect. Dis.*, 46, 201-211.

Saini,L., Seki,J.T., Kumar,D., Atenafu,E.G., Cole,D.E., Wong,B.Y., Bozovic,A., Brandwein,J.M., 2014. Serum voriconazole level variability in patients with hematological malignancies receiving voriconazole therapy. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 25, 271-276.



## 3.- Desarrollo

**3.1.-Fase preanalítica: desarrollo y validación de métodos bioanalíticos para la cuantificación de antifúngicos azólicos sistémicos.**

**Artículo original: “Development and validation of a fast HPLC/photodiode array detection method for the measurement of voriconazole in human serum samples. A reference laboratory experience”.**

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2013 Jan;31(1):23-8. doi: 10.1016/j.eimc.2012.03.003. Epub 2012 Jul 8.

**Objetivos:**

- 1.-Desarrollo de un método rápido y sencillo mediante cromatografía líquida de alta eficacia para la cuantificación de voriconazol en muestras de suero humano.
- 2.-Validación del método descrito siguiendo las recomendaciones de las guías internacionales para validación de métodos bioanalíticos.
- 3.-Análisis de una manera descriptiva los resultados obtenidos de la evaluación de 141 muestras de suero humano pertenecientes a pacientes tratados con voriconazol.

**Conclusiones:**

- 1.-Es un método rápido, simple y válido para cuantificar voriconazol en muestras de suero humano.
- 2.-Cumple los criterios de validación de métodos bioanalíticos de las guías internacionales (FDA, EMEA). La precisión y la exactitud son aceptables, y el rango de concentraciones evaluadas cubre el rango terapéutico propuesto para voriconazol tanto en tratamiento como en profilaxis.
- 3.- Se observó una gran variabilidad tanto intra como interpaciente en las concentraciones de voriconazol, lo cual corrobora la necesidad de monitorización de este antifúngico.
- 4.-Este método es aplicable a la monitorización terapéutica de voriconazol en el laboratorio clínico de manera rutinaria. Debido a la rapidez del análisis y su simplicidad, este método puede ofrecer al clínico una herramienta para la individualización de la dosis y su ajuste de manera rápida y eficaz.



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

## Development and validation of a fast HPLC/photodiode array detection method for the measurement of voriconazole in human serum samples. A reference laboratory experience

Emilio Cendejas-Bueno, Juan L. Rodríguez-Tudela, Manuel Cuenca-Estrella, Alicia Gómez-López\*

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 January 2012

Accepted 7 March 2012

Available online 8 July 2012

#### Keywords:

Voriconazole

Therapeutic drug monitoring

High performance liquid chromatography

Ravuconazole

### ABSTRACT

The aim of this study was the development and validation of a fast and simple high performance liquid chromatography method for measuring voriconazole in human serum using ravuconazole as an external standard. The experience of the reference laboratory in therapeutic drug monitoring of voriconazole is also reported. This method is based on the precipitation of proteins in human serum and detection by HPLC/UV. Chromatographic separation is achieved using an isocratic solvent delivery with detection at 255 nm and a run time of 7 min. The assay was validated according to international guidelines and was also applied to the analysis of 141 trough serum samples from patients treated with voriconazole. All validation parameters met the criteria set out in FDA guidelines for bioanalytical methods. A high interpatient and inpatient variability was observed in clinical samples. This method is accurate enough to perform therapeutic drug monitoring in patients receiving voriconazole treatment.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Desarrollo y validación de un método rápido por HPLC/PDA para la cuantificación de voriconazol en muestras de suero humano. Experiencia de un laboratorio de referencia

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue el desarrollo y validación de un método rápido y sencillo mediante cromatografía líquida de alta eficacia para la cuantificación de voriconazol en muestras de suero de origen humano usando ravuconazol como estándar de extracción. Además se detalla la experiencia de un centro de referencia en la monitorización de voriconazol. El método está basado en la precipitación de proteínas con acetonitrilo para su posterior procesamiento en un aparato de HPLC/UV. La separación cromatográfica se llevo a cabo usando flujo isocrático con longitud de onda de detección a 255 nm y un tiempo de análisis de 7 minutos. En ensayo se validó de acuerdo con las guías internacionales y se aplicó al análisis de 141 muestras de pacientes tratados. Todos los parámetros de validación cumplían los criterios de la Guía de la FDA para la validación de métodos bioanalíticos. Se observó una gran variabilidad intra e interpaciente en las muestras clínicas evaluadas. El método es suficientemente preciso y exacto para la monitorización de pacientes en tratamiento con voriconazol.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

#### Palabras clave:

Voriconazol

Monitorización

Cromatografía líquida de alta eficacia

Ravuconazol

### Introduction

Voriconazole (VRC) is a triazole with broad-spectrum antifungal activity, currently considered to be the first-line agent for the treatment of invasive aspergillosis<sup>1,2</sup>. This compound is available

in both intravenous and oral formulations<sup>3–5</sup> with an activity that is influenced by both genetic (CYP polymorphisms) and clinical conditions (i.e. hepatic failure, concomitant medications, etc.). This metabolic pathway makes it prone to interactions with a large number of drugs.

In light of this pharmacodynamic and pharmacokinetic variability, many studies have attempted to correlate blood levels of the compound with the clinical response. Most of the published data has shown substantial inter- and intra-individual variability

\* Corresponding author.

E-mail address: aliciagl@isci.iii.es (A. Gómez-López).

**Artículo original: "HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples".**

Clinical Microbiology and Infection. **2012** Dec;18(12):1229-35. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03732.x. Epub 2011 Dec 22.

**Objetivos:**

- 1.-Desarrollo de un método rápido y sencillo mediante cromatografía líquida de alta eficacia para la cuantificación de posaconazol en muestras de suero humano.
- 2.-Desarrollo de un método rápido y sencillo mediante bioensayo para la cuantificación de posaconazol en muestras de suero humano
- 3.- Validación del método desarrollado mediante siguiendo las recomendaciones de las guías internacionales para validación de métodos bioanalíticos.
- 4.- Validación cruzada de ambos métodos con muestras clínicas, tomando el método cromatográfico como método de referencia.

**Conclusiones:**

- 1.-Son dos métodos rápidos, simples y válidos para cuantificar posaconazol en muestras de suero humano.
- 2.-Cumple los criterios de validación de métodos bioanalíticos de las guías internacionales (FDA, EMEA). La precisión y la exactitud son aceptables, y el rango de concentraciones evaluadas en ambos métodos cubre las concentraciones diana propuestas para posaconazol tanto en tratamiento como en profilaxis.
- 3.- Los resultados de la validación cruzada muestran muy buena correlación, resultando válidos para realizar el seguimiento de las concentraciones sanguíneas en pacientes tratados con posaconazol.
- 4.-Ambos métodos son aplicables a la monitorización terapéutica de posaconazol en el laboratorio clínico de manera rutinaria. El bioensayo ofrece una alternativa válida y fiable a los métodos cromatográficos en aquellos laboratorios clínicos que no puedan optar a la adquisición de instrumentación para el análisis cromatográfico.

## HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples

E. Cendejas-Bueno, A. Forastiero, J. L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella and A. Gomez-Lopez

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

### Abstract

In this paper we report on the development and validation of two different methods for posaconazole quantification from serum samples, HPLC/UV and bioassay. Both methods have been validated according to international guidelines and were also applied to the analysis of 61 trough serum samples from treated patients. A good correlation between both methods was observed. The HPLC method, more laborious and expensive, was demonstrated to be more accurate, precise and faster (analytical range 0.125–16 µg/mL, accuracy between –2.48 and 3.70% and precision between 2.77 and 5.93%, with an analytical run time of 11 min), making it a valuable tool for reference laboratories that centralize high numbers of samples. The microbiological method, however, is simple and offers sufficient precision and accuracy (analytical range 0.125–16 µg/mL, accuracy between –8.10 and 3.77% and a precision between 4.52 and 10.07%), to be used to monitor posaconazole. It may be a valid alternative to chromatographic methods in clinical laboratories without specialized facilities.

**Keywords:** Bioassay, chromatographic method, posaconazole, therapeutic drug monitoring

**Original Submission:** 30 June 2011; **Revised Submission:** 2 November 2011; **Accepted:** 11 November 2011

Editor: E. Roilides

**Article published online:** 18 November 2011

*Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 1229–1235

10.1111/j.1469-0691.2011.03732.x

**Corresponding author:** A. Gomez-Lopez, Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain  
E-mail: aliciagl@isciii.es

### Introduction

Posaconazole is a new triazole with broad-spectrum antifungal activity against *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* species, as well as against zygomycetes [1]. It has proven effective as a curative treatment of invasive fungal infections, mostly invasive aspergillosis and refractory mucosal candidiasis, and for antifungal prophylaxis in patients with graft-versus-host disease, as well as in patients with prolonged neutropenia in acute leukaemia [2–5]. Posaconazole is a highly lipophilic weak base structurally related to itraconazole. It belongs to class II compounds, indicating that it is well absorbed but dissolves slowly in water (high permeability/low solubility) [6]. Similar to other triazoles, marked interpatient variability (between-patient variability in blood concentration after receiving the same dose), for both healthy volunteers and patient populations has been described. Several factors can

impact posaconazole disposition: first, the only available formulation is an oral suspension that shows a great variability of absorption. Prandial state and meal composition (specifically fat), gastric pH or mucosal integrity impact significantly on posaconazole absorption [7]. Moreover, dose frequency has been proven to influence posaconazole disposition [8]. With regard to the pharmacodynamic endpoints associated with optimal treatment, certain evidence has suggested a relationship between exposure and efficacy for this compound [9]. Hence, the concept of posaconazole therapeutic drug monitoring should be explored at length in future clinical studies.

To perform therapeutic drug monitoring, several quantification methods of posaconazole in serum by HPLC and by liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods have been described in the literature [10–14]. As far as we know, only one microbiological method (bioassay) has been described for posaconazole monitoring [15]. It offers several practical advantages, such as simplicity and low costs, and is therefore a valid alternative to chromatographic methods in clinical laboratories without specialized equipment.

We aim to report on the development and validation of a rapid HPLC/UV for posaconazole detection method with

ravuconazole as the extraction standard (ES) from human serum. The chromatographic method was validated according to international guidelines in terms of stability, specificity, linearity, precision and accuracy for serum matrix [16,17]. Additionally a bioassay for posaconazole quantification was also described and validated. Our experience with both analytical methods to measure serum concentrations of posaconazole in patients under treatment or receiving prophylaxis is reported.

## Materials and Methods

### Chemicals, instruments and chromatographic conditions

Stock solutions of posaconazole (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA) and the ES, ravuconazole (Brystol Myers Squibb Company, Madrid, Spain) were prepared on dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) from authenticated analytical reference powder. Human commercial serum from human male AB Plasma, supplied by Sigma-Aldrich, was used as a matrix for solution preparation. Other antifungal drugs used were Amphotericin B (Sigma-Aldrich), flucytosine (Sigma-Aldrich), fluconazole, (Pfizer S.A., Madrid, Spain), itraconazole (Sigma-Aldrich), hydroxy-itraconazole (Janssen Pharmaceutica, Madrid, Spain), voriconazole (Pfizer S.A.), caspofungin (Merck & Co., Inc.), micafungin (Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japan) and anidulafungin (Pfizer S.A.).

Chromatographic and detection conditions are described in Table I. The mobile phase consisted of a filtered and degassed mix of acetonitrile : ultrapure water (60 : 40, v/v).

### Preparation of solutions

Two separate stock solutions of posaconazole were prepared for calibration standards (CS) and quality controls (QC), respectively, by dissolving 3.2 mg posaconazole in 2 mL DMSO for each solution yielding concentrations of 1.6 mg/mL.

**TABLE I.** Chromatographic and instrumental conditions

Instrumental parameters	Conditions
Elution mode	Isocratic (60 : 40 acetonitrile:water)
Flow rate	0.8 mL/min
Volume of injection	50 $\mu$ L
Wave length detection	262 nm
Column	Sunfire C18 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150 mm
Guard column	Sunfire C18 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 20 mm
Temperature of the column	25°C
Temperature of the auto sampler	25°C
Pressure of the system	1200–1500 Psi
Quantitative detection methodology	Peak area
Qualitative detection methodology	Time retention; UV Spectrum
Calibration mode	Calibration curve
Concentration units	$\mu$ g/mL
Analyses time retention	Posaconazole 6.50 $\pm$ 0.1 min Ravuconazole 9.95 $\pm$ 0.1 min
Run time	11 min

One solution was used to prepare eight CS at final concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16  $\mu$ g/mL by spiking adequate amounts of the posaconazole stock solution into drug-free human serum. In the same manner, an additional five QC samples were prepared using the second stock solution of posaconazole to obtain final concentrations 0.25, 0.5, 1, 4 and 8  $\mu$ g/mL. A standard stock solution of ES was prepared at 200  $\mu$ g/mL in DMSO. For the bioassay procedure, ES was not added when QC or CS solutions were prepared.

### Chromatographic assay

The CS and QC sample solutions were processed as follows: Ice-cold acetonitrile in a volume of 150  $\mu$ L was added in 1 : 1 proportion. This solution also included a volume of ES to result in a final concentration of 2  $\mu$ g/mL. The resulting mixture was then shaken for 30 s on a Vortex Shaker at maximum speed followed by centrifugation at 13 800 g at 25°C for 15 min. Fifty microlitres of the supernatant was then injected into the chromatographic system and analysed.

### Bioassay

The biological activity of posaconazole in serum samples was also measured by a diffusion assay. One hundred and fifty millilitres of medium containing 6.7 g/L yeast nitrogen base (YNB, Difco Becton Dickinson), 10 g/L glucose (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 5.9 g/L trisodium citrate and 14 g/L agar were prepared aseptically in two volumes (15 mL of filtered broth medium and 135 mL of autoclaved agar solution). A susceptible strain of *Candida kefyr* (ATCC 28838, posaconazole MIC 0.015  $\mu$ g/mL) was used as a test organism. For the assay, 1–5 CFU of the subcultured yeast were tipped and suspended in 3.0 mL sterile water. The turbidity of the suspension was adjusted to a McFarland standard of 0.5 (530 nm,  $1 \times 10^6$  to  $5 \times 10^6$  CFU/mL). One hundred and thirty-five millilitres of agar solution, 15 mL broth medium and 1.5 mL inoculum (final inoculum size  $10^4$  CFU/mL) were then mixed at a temperature of 50°C, poured into 250  $\times$  250-mm square plates (NIRCO Diagnóstico e Investigación, Madrid, Spain) and allowed to solidify on a level surface at room temperature for 45–60 min. Thereafter, 37-mm diameter wells were bored aseptically with the help of a sterile cork borer in a well-spaced pattern. Fifty microlitres of each standard, control or sample were pipetted in triplicate into individual wells of the plate. No protein precipitation pre-treatment was performed. The plates were incubated for 24 h at 37°C.

The assay was repeated over 4 days for QC, 2 days for CS and once for clinical samples. Zones of inhibition were measured to the nearest 0.1 mm using a metric calliper micrometer (Fowler, Ultra-cal II. Sylvac, Bévillard, Switzerland).

### Validation procedures

**HPLC assay.** The HPLC method was assayed for linearity, precision and accuracy, recovery rate, selectivity and stability. Linearity was assessed by linear regression (best fit obtained when plotting peak areas measured by HPLC against posaconazole concentration in the range of 0.125–16.0 µg/mL). Experiments were performed in quadruplicate on two non-consecutive days. In addition, intra-day and inter-day precision and accuracy (expressed as coefficient of variation (CV%) and relative error (RE%), respectively) were evaluated by triplicate processing and analysis of five QC samples (0.25, 0.5, 1, 4 and 8 µg/mL) on five non-consecutive days. Criteria for acceptability of data included accuracy (RE%) within ±15% deviation from the nominal values and precision within ±15% of CV%, except for the lower limit of quantification (LLOQ), for which data should not exceed 20% of CV% [16,17].

Recovery experiments (extraction efficiency) were performed by comparing results of extracted samples (0.5, 2 and 4 µg/mL,  $n = 3$ ) with the unextracted standards that represent 100% recovery.

Selectivity was investigated for potential interference by endogenous substances by using six independent batches of human serum samples. Selectivity was indicated by the absence of any endogenous interference peaks at posaconazole and ES retention times.

The specificity was evaluated with respect to all the registered antifungal agents listed above and some antibacterial drugs (amoxicillin/clavulanic acid, imipenem, ciprofloxacin, gentamicin and ceftazidime) commonly used in patients treated with posaconazole. Specificity was indicated by the absence of interference peaks at the same retention times of posaconazole.

Quality controls were also tested for stability of posaconazole under a variety of storage and handling conditions: (i) three freeze–thaw cycles (three freeze (–20°C)–thaw (room temperature) cycles), (ii) short-term storage (freeze for 24 h at –20°C and then thaw for 4 h at room temperature), (iii) long-term storage (freeze for 1 month at –20°C and then thaw for 4 h at room temperature), (iv) bench-top stability (storage at room temperature for 24 h and 90 h, and then processed), and (v) stock solution stability (evaluation of stock solution in DMSO tested at the beginning of the experiments and then after being stored at –20°C for 2 months, which is the estimated time for this validation procedure). All stability tests in serum matrix were performed using low (0.5 µg/mL), medium (2 µg/mL) and high (4.0 µg/mL) QC concentrations, and analysed in triplicate. Additionally, our laboratory participates in the international quality control programme of antifungal drugs of the Association for

Quality Assessment in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (KKGT) [18].

**Bioassay.** The bioassay was also tested for linearity, precision and accuracy. Different experiments that included eight CS, five QC, both in triplicate, and a blank matrix control were performed for the procedure validation.

Intra-day and inter-day precision and accuracy of the analytical method were evaluated by triplicate processing and analysis of five QC samples (0.25, 0.5, 1, 4 and 8 µg/mL), on three non-consecutive days. Criteria for acceptability of data were the same as previously described for HPLC methodology.

### Measurements of posaconazole in clinical samples

Sixty-one serum samples from patients who received posaconazole oral suspension for different indications were evaluated. A sample volume of 300 µL was used for sample preparation and concentration measurement, 150 µL was used for HPLC evaluation and the remaining 150 µL for the microbiological method.

Clinical samples were processed as described above for each methodology. Hospital patients signed the informed consent form, which authorized researchers to perform therapeutic drug monitoring of posaconazole and analysis thereof.

### Concordance between HPLC and bioassay

The agreement between posaconazole levels measured by HPLC and bioassay was evaluated by using the intra-class correlation coefficient (ICC, PASW STATISTICS 18, PAWS Statistics, Madrid, Spain), which was expressed to a maximum value of 1 and with a 95% CI. The ICC is a reverse measurement of the variability of the counting values. It can reach a maximum value of 1 if there is a perfect correlation and a minimum value of –1 if there is a complete absence of correlation. The ICC is a scale analysis and provides the highest statistical power for correlation studies. A  $p$  value of <0.01 was considered to be statistically significant.

Results were also compared by the least-squares linear regression using standard techniques (EViews statistics program, Quantitative Micro Software). For these calculations, HPLC was considered the reference method.

## Results

### High performance liquid chromatography

Posaconazole was correctly separated and detected following the chromatographic conditions described above, posaconazole eluted at  $6.50 \pm 0.2$  min and ES at  $9.95 \pm 0.2$  min. A linear

relationship ( $y$  (peak area) = 79174x (posaconazole concentration)) was found over a range of drug concentrations tested ( $r^2 = 0.9994$ ). The LLOQ of posaconazole was determined to be 0.125  $\mu\text{g/mL}$ . The limit of detection was found to be 0.06  $\mu\text{g/mL}$ . The within-days and between-days precision for QC samples was <15%. The method also showed an accuracy within 15% (20% for LLOQ), as is described in Table 2. Absence of carryover was detected after injection of the highest QC samples (16  $\mu\text{g/mL}$ ). In conclusion, CV% and RE% data obtained for posaconazole were within acceptable limits stated for bioanalytical method validation by the Food and Drug Administration and European Medicines Agency [16,17].

The mean recovery from human serum was in the range 91.63–104.69% for posaconazole. The mean recovery of the ES was 102.11%. Posaconazole-free serum samples did not show any interference with posaconazole signal. Interactions between most antifungal and antibacterial drugs tested, matrix components and posaconazole were not observed. It is worth noting that hydroxy-itraconazole showed a retention time close to that of posaconazole ( $6.30 \pm 0.1$  min vs.  $6.50 \pm 0.2$  min).

Results of stability conditions are listed in Table 3. Data show that posaconazole was stable under most of the conditions tested. The only factor slightly affecting posaconazole quantification was the storage of samples at room temperature (between 20.5 and 36.2% disagreement between peak areas). For this reason, the freezing of serum samples or processing them within 24 h of receipt is recommended.

#### Quality control programme results

Regarding results from the 2010 quality control programme for posaconazole, three out of four (75%) samples analysed passed the requirements defined by the programme regulations. These results were inside the 80–120% acceptable

range for the theoretical value (median 95%, range 90–100%), providing an additional external validation of the method.

#### Bioassay

Standard curve was logarithmic in the range of 0.125–16  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 1). The LLOQ and limit of detection were 0.125  $\mu\text{g/mL}$ . Inter-day and intra-day values for accuracy and precision were below –8.10, 10.07% and 7.88, 5.47% respectively (Table 2).

#### Concordance between HPLC and bioassay results

Results from clinical samples ranged from 0.00 to 1.517  $\mu\text{g/mL}$  by bioassay and from 0.00 to 1.916  $\mu\text{g/mL}$  using HPLC methodology. Data below LLOQ were coded as 0.00  $\mu\text{g/mL}$ . Overall, the correlation between results was good with an ICC value of 0.915 (0.86–0.95,  $p < 0.01$ ). Results of linear regression analysis were also acceptable as described below: Bioassay = 0.742(HPLC) + 0.026;  $R^2 = 0.871$ , with a coefficient of correlation = 0.931;  $n = 61$  runs (Fig. 2).

## Discussion

We describe and compare two different methodologies, HPLC and a bioassay, for posaconazole quantification from clinical samples. Both methods offer interesting advantages. HPLC has been described as a more accurate, precise and faster methodology, being a useful tool for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies [19]. We found in our study that the HPLC method offers superior precision and accuracy compared with the microbiological method (Table 2). Additional advantages such as a simple sample pretreatment procedure (single-step protein precipitation with acetonitrile [13]), the use of ravuconazole as ES (with similar chemical profile to ensure a comparable chromatographic

**TABLE 2.** Within-day and between-day precision (calculated as coefficient of variation, CV) and accuracy (expressed as percent of the relative error, RE) for HPLC and bioassay methodologies

C nom	HPLC			Bioassay		
	C ( $\mu\text{g/mL}$ ) Mean $\pm$ SD	CV%	RE% $\pm$ SD	C ( $\mu\text{g/mL}$ ) Mean $\pm$ SD	CV%	RE% $\pm$ SD
Within-day variability $n = 6$						
0.25	0.265 $\pm$ 0.005	1.99	6.08 $\pm$ 1.09	0.244 $\pm$ 0.012	5.06	–2.11 $\pm$ 4.96
0.5	0.537 $\pm$ 0.007	1.45	7.46 $\pm$ 0.59	0.539 $\pm$ 0.003	0.74	7.88 $\pm$ 0.80
1	1.000 $\pm$ 0.025	0.90	–3.05 $\pm$ 2.56	1.070 $\pm$ 0.031	2.90	7.03 $\pm$ 3.11
4	3.879 $\pm$ 0.023	0.61	–3.01 $\pm$ 1.56	4.12 $\pm$ 0.226	5.47	3.24 $\pm$ 5.65
8	7.722 $\pm$ 0.087	1.13	–3.46 $\pm$ 2.11	7.44 $\pm$ 0.208	2.80	–6.97 $\pm$ 2.60
Between-day variability $n = 18$						
0.25	0.250 $\pm$ 0.014	5.93	0.18 $\pm$ 2.57	0.248 $\pm$ 0.011	4.52	–0.41 $\pm$ 4.50
0.5	0.518 $\pm$ 0.015	2.99	3.70 $\pm$ 2.43	0.51 $\pm$ 0.035	6.82	2.65 $\pm$ 7.00
1	1.012 $\pm$ 0.021	2.11	1.26 $\pm$ 2.02	1.03 $\pm$ 0.084	8.14	3.77 $\pm$ 8.45
4	3.964 $\pm$ 0.102	2.59	–0.88 $\pm$ 2.43	3.90 $\pm$ 0.390	10.07	2.30 $\pm$ 9.84
8	7.801 $\pm$ 0.094	2.77	–2.48 $\pm$ 2.57	7.35 $\pm$ 0.432	5.88	–8.10 $\pm$ 5.41

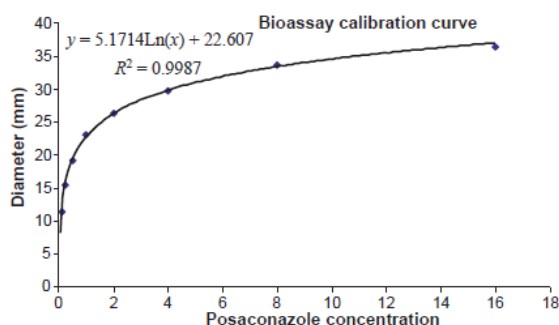
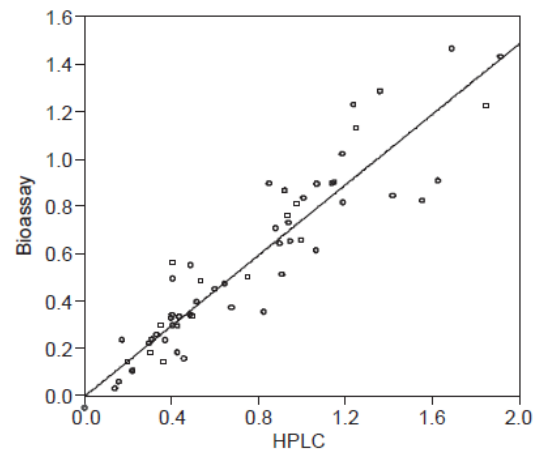
CV% = standard deviation/mean of measured values  $\times 100$ ; RE% = [(mean measured concentration – nominal concentration)/nominal concentration]  $\times 100$ .

**TABLE 3.** Stability of posaconazole solutions after a variety of storage and handling conditions

	Peak area 1 posaconazole average	Peak area 2 posaconazole average	% posaconazole average	
<b>Freeze-thaw stability</b>				
0.5	43 736	39 410	90.10	
2	151 284	150 871	99.72	
4	309 095	289 473	93.65	
<b>Short-term stability</b>				
0.5	43 736	38 439	87.88	
2	151 284	145 499	96.17	
4	309 095	303 908	98.32	
<b>Long-term stability</b>				
0.5	43 736	41 731	95.41	
2	151 284	151 100	99.87	
4	309 095	302 557	97.88	
		24 h	90 h	24 h
<b>Post-preparative stability</b>				
0.5	43 736	34 767	27903	79.49
2	151 284	139 309	93987	92.08
4	309 095	300 142	177472	97.10
<b>Stock solution stability</b>				
0.5	40 830	47 718	116.86	
2	157 453	185 252	117.65	
4	315 019	360 745	114.51	

Peak area 1: Peak area detected at the beginning of the experiment. Peak area 2: peak area at the end of the experiment. % posaconazole average. For each experimental condition posaconazole peak areas were compared with those obtained at the beginning of the study and percentage of concordance was evaluated (maximum concordance 100%). Freeze-thaw stability (three freeze-thaw cycles). Short-term storage (freeze for 24 h at  $-20^{\circ}\text{C}$  and then thaw for 4 h at room temperature), long-term storage (freeze for 1 month at  $-20^{\circ}\text{C}$  and then thaw for 4 h at room temperature); bench top stability (storage at room temperature for 24 h and 90 h, and then processed), and stock solution stability (evaluation of stock solution in dimethyl sulfoxide tested at the beginning of the experiments and then after being stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 months (estimated time for this validation procedure).

behaviour) or the use of a simple mobile phase without buffers or additives [11,13,20,21] make this a valuable method for posaconazole quantification. However, such facilities might not be available in all clinical microbiology laboratories whereas bioassay facilities are almost certainly available. The proposed bioassay has been shown to be a simple, inexpensive and reliable method for posaconazole quantification. Our data demonstrate sufficient accuracy and precision in spite of

**FIG. 1.** Posaconazole bioassay linearity and calibration curve.**FIG. 2.** Scatter plot of posaconazole (PSZ) serum concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ) measured by HPLC and bioassay. Linear regression: Bioassay =  $0.7425$  (HPLC) +  $0.026$ ;  $R^2 = 0.871$ , with a coefficient of correlation =  $0.931$ ;  $n = 61$  runs.

the intrinsic variability described for this methodology (natural antifungal serum activity [22,23] or the inhibition zones measurement bias). However, it is worth noting that bioassay has important limitations; first, bioassay quantifies the antifungal activity, but fails to identify the drug or its active metabolites. In addition, total inhibition zones can be modified by concomitant antifungal drugs, and therefore they might not represent correctly the serum antifungal concentration. In this study, we found that results are comparable using these two different methodologies (ICC value  $0.915$ ). Linear regression analysis also shows a good correlation value between bioassay and HPLC (coefficient of correlation =  $0.931$ ) and comparable results (slope  $0.742$ ). Values in the HPLC are slightly greater, probably because of the accuracy of the chromatographic method compared with that of the bioassay, where an agar diffusion procedure occurs before drug quantification.

Another point to consider is that although the lower limit of quantification ( $0.125 \mu\text{g/mL}$ ) of these two methods is relatively high compared with that of the other reported methods such as ultra-performance liquid chromatography-UV or liquid chromatography-tandem mass spectrometry [13,15,21,24], the linearity range described here effectively covers what is currently believed to be the clinically relevant range for posaconazole concentrations in serum or plasma (the Food and Drug Administration briefing document recommends a goal posaconazole average serum drug concentration of  $0.700 \mu\text{g/mL}$ ; Andes *et al.* recommends posaconazole trough values around  $0.5 \mu\text{g/mL}$  for prophylaxis and between  $0.5$  and  $1.5 \mu\text{g/mL}$  for therapy) [6,9]. Therefore it would not be a limitation with regard to their usefulness in therapeutic drug monitoring.

In summary, our study validates two methods for therapeutic drug monitoring of posaconazole and showed a good concordance between the bioassay and HPLC for the measurements of posaconazole serum levels in 61 samples. Both methods have been validated for serum samples and not for other body fluids. The HPLC method is more accurate, more precise and faster, being more appropriate for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. The microbiological method, however, is relatively simple and offers sufficient precision and accuracy to be used to monitor drug levels in patients in routine clinical laboratories, where chromatography equipment is not ordinarily available.

### Funding

The chromatographic method to detect posaconazole has been partially financed by a research Project from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, PI09/0624). E. Cendejas-Bueno has a research contract from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant CM08/0083).

### Transparency Declaration

In the past 5 years, MCE has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the ALBAN programme, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, The Spanish Health Research Fund, The Instituto de Salud Carlos III, The Ramon Areces Foundation and The Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. In the past 5 years, JLRT has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, The Spanish Health Research Fund, The Instituto de Salud Carlos III, The Ramon Areces Foundation and The Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Mycognostica, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. Other authors have no conflicts.

©2011 The Authors

*Clinical Microbiology and Infection* ©2011 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 18, 1229–1235

### References

1. Farowski F, Vehreschild JJ, Cornely OA. Posaconazole: a next-generation triazole antifungal. *Future Microbiol* 2007; 2: 231–243.
2. Cornely OA. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356: 348–359.
3. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 335–347.
4. Vazquez JA. Role of posaconazole in the management of oropharyngeal and esophageal candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* 2007; 3: 533–542.
5. Walsh TJ, Raad I, Patterson TF et al. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 2–12.
6. FDA. Posaconazole. FDA briefing document. 2010. Available at: [www.fda.gov/cder/foi/nda/2006/022003s000\\_NoxafilTOC.htm](http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2006/022003s000_NoxafilTOC.htm) (last accessed 2 November 2011).
7. Lipp HP. Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of the antifungal extended-spectrum triazole posaconazole: an overview. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 70: 471–480.
8. Gubbins PO, Krishna G, Sansone-Parsons A et al. Pharmacokinetics and safety of oral posaconazole in neutropenic stem cell transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1993–1999.
9. Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 24–34.
10. Alffenaar JW, Wessels AM, van Hateren K, Greijdanus B, Kosterink JG, Uges DR. Method for therapeutic drug monitoring of azole antifungal drugs in human serum using LC/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878: 39–44.
11. Chhun S, Rey E, Tran A, Lortholary O, Pons G, Jullien V. Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852: 223–228.
12. Cunliffe JM, Noren CF, Hayes RN, Clement RP, Shen JX. A high-throughput LC-MS/MS method for the quantitation of posaconazole in human plasma: implementing fused core silica liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50: 46–52.
13. Muller C, Arndt M, Queckenberg C, Cornely OA, Theisohn M. HPLC analysis of the antifungal agent posaconazole in patients with haematological diseases. *Mycoses* 2006; 49 (suppl 1): 17–22.
14. Neubauer W, König A, Bolek R et al. Determination of the antifungal agent posaconazole in human serum by HPLC with parallel column-switching technique. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877: 2493–2498.
15. Rochat B, Pascual A, Pesse B et al. Ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry and sensitive bioassay methods for quantification of posaconazole plasma concentrations after oral dosing. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5074–5081.
16. EMEA. *Guideline on validation of bioanalytical methods*. EMEA, 2010. Available at: [www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/scientific\\_guideline/2009/12/wc500018062.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/scientific_guideline/2009/12/wc500018062.pdf) (last accessed 2 November 2011).
17. FDA. *Guidance for industry, bioanalytical method validation*. FDA, 2001. Available at: [www.fda.gov/downloads/drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf) (last accessed 2 November 2011).
18. Bruggemann RJ, Touw DJ, Aamoutse RE, Verweij PE, Burger DM. International interlaboratory proficiency testing program for measurement of azole antifungal plasma concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 303–305.

19. Sansone-Parsons A, Krishna G, Simon J et al. Effects of age, gender, and race/ethnicity on the pharmacokinetics of posaconazole in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 495–502.
20. Kim H, Kumari P, Lin CC, Nomeir AA. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of SCH 59884 (phosphate ester prodrug of SCH 56592), SCH 207962 and SCH 56592 in dog plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 27: 295–303.
21. Storzinger D, Swoboda S, Lichtenstem C, Muller C, Weigand MA, Hoppe-Tichy T. Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for posaconazole utilizing solid-phase extraction. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 1747–1751.
22. Duvvuru S, Brummer E, Morelli R, Stevens DA. Isolation of a human serum protein that inhibits the growth of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1998; 144: 1–7.
23. Zhou ZH, Zhang Y, Hu YF, Wahl LM, Cisar JO, Notkins AL. The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe* 2007; 1: 51–61.
24. Vogeser M, Rieger C, Ostermann H, Spohrer U. A routine method for the quantification of the novel antimycotic drug posaconazole in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 579–584.

**Artículo original: “Determination of voriconazole serum concentration by bioassay, a valid method for therapeutic drug monitoring for clinical laboratories”.**

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2013 Jul;57(7):3437-40. doi: 10.1128/AAC.00323-13. Epub 2013 May 6

**Objetivos:**

- 1.- Desarrollo de un método rápido y sencillo mediante bioensayo o ensayo microbiológico para la cuantificación de voriconazol en muestras de suero humano.
- 2.-Validación de este método según los estándares de las guías internacionales para la validación de métodos bioanalíticos.
- 3.-Determinación de la reproducibilidad y la validez del método mediante la evaluación de controles de calidad de concentraciones conocidas. Se realizó una validación cruzada tomando como referencia un método por HPLC para establecer la validez del bioensayo y cómo podía afectar a la toma de decisiones clínicas las diferencias obtenidas.

**Conclusiones:**

- 1.-Es un método rápido, simple y válido para cuantificar voriconazol en muestras de suero humano en laboratorios donde no haya accesibilidad a aparatos cromatográficos.
- 2.-Cumple los criterios de validación de métodos bioanalíticos de las guías internacionales (FDA, EMEA). La precisión y la exactitud son aceptables, y el rango de concentraciones evaluadas en ambos métodos cubre las concentraciones diana propuestas para voriconazol tanto en tratamiento como en profilaxis.
- 3.- Los resultados de la validación cruzada muestran una muy buena correlación entre ambos métodos, resultando el bioensayo válido para realizar el seguimiento de las concentraciones sanguíneas en pacientes tratados con voriconazol.
- 4.-Es un método válido para la monitorización terapéutica de voriconazol en el laboratorio clínico. El bioensayo ofrece una alternativa fiable a los métodos cromatográficos en aquellos laboratorios que no puedan optar a la adquisición de instrumentación para el análisis cromatográfico.

# Determination of Voriconazole Serum Concentration by Bioassay, a Valid Method for Therapeutic Drug Monitoring for Clinical Laboratories

Emilio Cendejas-Bueno, Manuel Cuenca-Estrella, Alicia Gomez-Lopez

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

We describe here a simple, fast, and reliable bioassay method for therapeutic drug monitoring of voriconazole. Fifty-eight clinical and external quality control samples were evaluated with this microbiological assay, and results were compared with those obtained with a previously validated chromatographic method. A good correlation between both assays was observed. This particular microbiological method was demonstrated to be simple and offers enough precision and accuracy to perform voriconazole therapeutic drug monitoring in laboratories without specialized equipment.

Voriconazole is used for the treatment of invasive fungal infections. It is currently considered the first-line agent for the treatment of invasive aspergillosis (1) and a valid alternative for treating invasive candidiasis (2).

It is available as both an oral and intravenous formulation and is characterized by a saturable hepatic metabolism influenced by genetic background and specific clinical conditions. Most published data have shown substantial inter- and intraindividual variabilities of trough concentrations, and recent published data have suggested that its efficacy and tolerance could be increased with therapeutic drug monitoring (TDM), a suitable strategy to maximize the cost-effectiveness of this treatment (3–5). Several retrospective studies and also two prospective studies recently published support the usefulness of TDM with voriconazole treatment (3–7). A target blood concentration of voriconazole ranging between 1.0 and 6.0  $\mu\text{g/ml}$  (therapeutic range) has been demonstrated to have great utility for patient management (8–10). To evaluate antifungal concentrations, several quantification methods, most based on high-performance liquid chromatography (HPLC) (11–15) and microbiological assays (bioassay), have been described in the literature (16–19). Bioassays offer simplicity and lower costs and are therefore a valid alternative to chromatographic methods in clinical laboratories without specialized equipment. Nevertheless, some disadvantages have been described, such as lack of standardization and lower precision and accuracy than chromatographic methods, and also limited utility in cases of antifungal combined therapy.

The aim of this study was to develop a simple, fast, nonexpensive, and reliable bioassay for voriconazole quantification. A cross-validation between this assay and a previously validated chromatographic method was also performed (20) in order to address the effectiveness of the microbiological method for treatment follow-up.

The biological activity of voriconazole in serum samples was measured in a diffusion assay. Preparation of the media, reagents for the assay, and the test organism (*Candida kefyr* ATCC 28838; voriconazole MIC, 0.015  $\mu\text{g/ml}$ ) were previously described (21), including the following minor modifications. The turbidity of the test organism suspension was adjusted to 1.0 McFarland (optical density at 530 nm between 0.23 and 0.27; Thermospectronic, Genesis TM20). In addition, 30 wells (5.4-mm diameter) were bored

aseptically with the help of a sterile cork borer in a well-spaced pattern. Voriconazole was kindly supplied by Pfizer (Pfizer S.A., Madrid, Spain). Twenty-five-microliter aliquots of clinical samples were pipetted in triplicate into individual wells. This amount of plasma was allowed to diffuse through the agar at room temperature for 1 h, and the plates were then incubated for 20 h at 37°C.

Human commercial serum (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was used as the matrix for calibration standards (CS) and quality control samples (QC). Two separate stock solutions of voriconazole were used to prepare CS and QC.

A validation procedure was performed in different experiments including CS and QC. The concentrations evaluated are shown in Table 1.

The assay was repeated over 4 days for QC, over 2 days for CS, and for 1 day for clinical samples. Zones of inhibition were measured using a metric caliper micrometer (Fowler, Ultra-cal II; Sylvac, Bévillard, Switzerland) by two different analysts (blinded measures), taking the average of both measurements as the final result.

The bioassay results were tested for linearity, precision, and accuracy. The criteria for acceptability of data included accuracy (relative error [% RE]) within a 15% deviation from the nominal values and precision within 15% of the coefficient of variation (% CV), except for the lower limit of quantification (LLOQ), for which data should not exceed 20% of the CV (22, 23). The standard curve was logarithmic in the range of 0.25 to 8  $\mu\text{g/ml}$ . The LLOQ was 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , which was slightly better than that from other recently published assays (0.5 to 3.00  $\mu\text{g/ml}$ ) (16, 19). Between- and within-day values for accuracy and precision of the CS and the QC samples are shown in Table 1. Precision and accuracy were within the limits established by international guidelines, with coefficients of variation lower than 12%, a value comparable with

Received 15 February 2013 Returned for modification 21 March 2013  
Accepted 27 April 2013

Published ahead of print 6 May 2013

Address correspondence to Alicia Gomez-Lopez, aliciag@isci.es.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00323-13

TABLE 1 Within-day and between-day variabilities of CS and QC<sup>a</sup>

Type of variability and C <sub>nom</sub> (μg/ml)	CS			QC		
	CCS (μg/ml) (mean ± SD)	Precision (CV %)	Accuracy (RE %)	CQC (μg/ml) (mean ± SD)	Precision (CV%)	Accuracy (RE %)
<b>Within-day variability<sup>b</sup></b>						
0.25	0.25 ± 0.005	2.22	1.19	0.25 ± 0.013	5.45	0.26
0.5	0.48 ± 0.014	3.03	-2.66	0.55 ± 0.043	7.75	11.75
1	0.93 ± 0.049	5.31	-6.07	1.01 ± 0.088	8.72	1.52
2	2.08 ± 0.111	5.36	4.16			
3	3.03 ± 0.055	1.82	1.06	3.24 ± 0.083	2.57	8.32
4	4.08 ± 0.256	6.27	2.23			
6	6.02 ± 0.106	1.77	0.43	6.12 ± 0.21	3.58	6.18
8	7.89 ± 0.827	10.50	-1.50			
<b>Between-day variability<sup>c</sup></b>						
0.25	0.25 ± 0.015	5.88	3.34	0.24 ± 0.023	9.67	-2.47
0.5	0.48 ± 0.032	6.70	-2.37	0.50 ± 0.060	12.05	0.832
1	0.94 ± 0.053	5.65	-5.23	1.00 ± 0.105	10.49	0.149
2	2.11 ± 0.257	7.45	5.54			
3	3.07 ± 0.150	4.90	2.49	3.32 ± 0.269	8.10	10.96
4	4.23 ± 0.312	7.39	5.78			
6	5.98 ± 0.355	5.94	-0.20	6.38 ± 0.703	11.02	6.37
8	7.73 ± 0.849	10.98	-3.32			

<sup>a</sup> C<sub>nom</sub>, nominal or theoretical concentration; CCS, experimental concentration of the calibration standards; CQC, experimental concentration of the quality controls.

<sup>b</sup> n = 3 for CS and n = 6 for QC for within-day variability calculations.

<sup>c</sup> n = 9 for CS and n = 24 for QC for between-day variability calculations.

that for other published bioassays (17–19). Bioassay variability has been reported to be associated with the natural antimicrobial serum activity or biases in the measurements of the inhibition zones (24, 25). Although natural antifungal serum activity is difficult to determine, no zones of inhibition were obtained from any of the blank commercial serum samples included in each sample set performed. In addition, the dynamic range defined for this bioassay (0.25 to 8.00 μg/ml) included the therapeutic range considered for clinical decisions (from 1.0 to 6.0 μg/ml).

A cross-validation was also performed, using a total of 58 human serum trough samples. Samples belong to 11 patients (46 samples) and 12 external QC samples received from an international interlaboratory proficiency testing program for antifungal drug quantifications. Agreement between measurements was evaluated by using the intraclass correlation coefficient (ICC; Paws 18.0; Paws Statistics, Madrid, Spain). A *P* value of <0.01 was considered statistically significant. Results were also compared by using least-squares linear regression standard techniques (Prism 4; GraphPad, La Jolla, CA). For these calculations, the chromatographic method was considered the reference method. The correlation between chromatographic and bioassay methodologies in clinical samples was statistically significant, as indicated by the ICC value (0.965; range, 0.941 to 0.979; *P* < 0.01) and the linear regression analysis [bioassay: 1.1347(HPLC result) + 0.0543; *R*<sup>2</sup> = 0.899; coefficient of correlation, 0.9481; *n* = 58 runs] (Fig. 1). Several practical advantages for this bioassay could be enumerated compared to others previously described. One of them was the number of samples that could be evaluated (10 samples in triplicate). This fact reduced costs, working time, and biases in the measuring of the inhibition zones. Another benefit to add is the small volume of serum required to perform this bioassay (75 μl), which indicates it is a good alternative when the amount of serum is not adequate (e.g., pediatric patients). One more practical ad-

vantage is the flexibility of the assay. Concerning the test organism, several strains have been used (17–19), but a standard microorganism has not been defined for performing this methodology, and theoretically any strain of *Candida* showing a voriconazole susceptibility profile might be suitable as the test organism if it provided reliable and symmetric zones of growth inhibition.

In contrast, bioassay-based techniques show some limitations. This method quantifies the antifungal activity but fails to identify the drug or its active metabolites, and inhibition zones can be modified by concomitant antifungal drugs. Combined antifungal therapy should be taken into account, and a bioassay is not adequate for use for TDM in those patients.

Plots representing sequential serum drug concentrations measured by HPLC and bioassay were created for each patient with

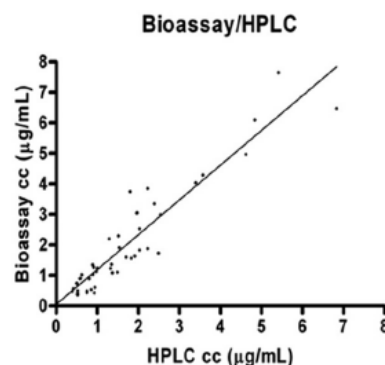


FIG 1 Scatter plot of voriconazole serum concentrations (in μg/ml) as measured by HPLC and bioassay. Linear regression results: bioassay result = 1.1347(HPLC result) + 0.053; *R*<sup>2</sup> = 0.899; coefficient of correlation, 0.948; *n* = 58 samples.

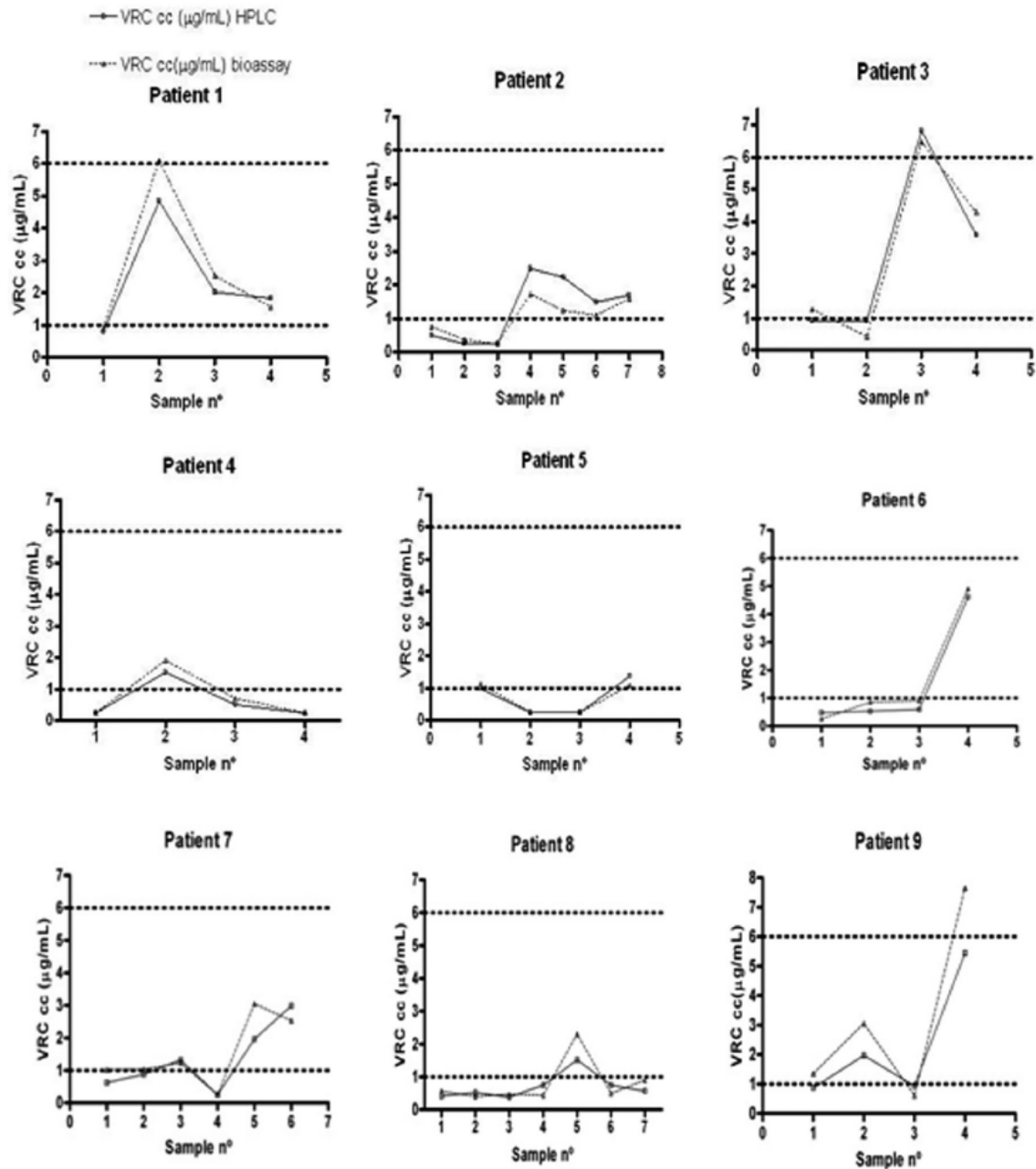


FIG 2 Plots of voriconazole (VRC) measurements for the nine patients included in the validation of the voriconazole bioassay.

two or more samples (GraphPad Prism 4), keeping in consideration the target therapeutic range of 1 to 6  $\mu\text{g/mL}$  (8–10) (Fig. 2). The graphical representation was intended to allow easy detection of discordant results that might affect clinical decisions, knowing that values out of the therapeutic range would imply a dose change. Concordance between individual data was checked, scoring as agreement (AgM) those cases in which both measurements were within the therapeutic range and differences were less than 20%; the classification minor error (MiE) was assigned when both of the measurements were in the same region of the therapeutic range but differences were more than 20%; a major error (MaE) classification was assigned when measurements were in different

regions of the therapeutic range and the differences were less than 20%; a very major error (VmE) classification was assigned when results were in different regions of the therapeutic range and differences were more than 20%. The overall percentages of the AgM and MiE were close to 90.00% (41.37% and 48.72%, respectively). Six results were coded as MaE or VmE (Table 2), and values reported from the bioassay were slightly higher (HPLC concentration average, 1.388  $\mu\text{g/mL}$ , versus bioassay concentration average, 1.636  $\mu\text{g/mL}$ ). In our cohort of patients, good and reliable monitoring of voriconazole levels could be performed by bioassay. The main drawback in the evaluation of the clinical samples was the limited access to clinical records. In general, a more exhaustive

TABLE 2 Sample results coded as MaE and VmE

Patient no.	Sample no.	Concn ( $\mu\text{g/ml}$ ) based on:		% difference between values
		HPLC	Bioassay	
5	1	0.98	1.13	13.27
9	1	0.88	1.35	34.81
9	4	5.41	7.65	29.28
3	1	0.91	1.28	28.90
7	1	0.62	1.02	39.21
7	2	0.88	1.03	14.56

follow-up should be recommended in those cases for which bioassay results are close to the upper and lower limits of the therapeutic range (1.00 and 6.00  $\mu\text{g/ml}$ ).

According to the high concordance values found, this bioassay is a reliable and nonexpensive tool to perform TDM of voriconazole, especially for clinical laboratories where chromatography facilities are not available.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pfizer for supply of the voriconazole powder.

This study has been partially financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI09/0624). E. Cendejas-Bueno received a predoctoral fund from Instituto de Salud Carlos III (AFTDOC 11/02, Spain).

In the past 5 years, M.C.E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, and Soria Melguizo SA. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. The other authors have no conflicts to declare.

#### REFERENCES

- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, de Pauw B. 2002. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* 347:408–415.
- Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE. 2000. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis.* 30:662–678.
- Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. 2008. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 46:201–211.
- Trifilio S, Ortiz R, Pennick G, Verma A, Pi J, Stosor V, Zembower T, Mehta J. 2005. Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 35:509–513.
- Trifilio SM, Yarnold PR, Scheetz MH, Pi J, Pennick G, Mehta J. 2009. Serial plasma voriconazole concentrations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1793–1796.
- Park WB, Kim NH, Kim KH, Lee SH, Nam WS, Yoon SH, Song KH, Choe PG, Kim NJ, Jang JJ, Oh MD, Yu KS. 2012. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 55:1080–1087.
- Pascual A, Csajka C, Buclin T, Bolay S, Bille J, Calandra T, Marchetti O. 2012. Challenging recommended oral and intravenous voriconazole doses for improved efficacy and safety: population pharmacokinetics-based analysis of adult patients with invasive fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 55:381–390.
- Andes D, Pascual A, Marchetti O. 2009. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:24–34.
- Bruggemann RJ, Donnelly JP, Aarnoutse RE, Warris A, Blijlevens NM, Mouton JW, Verweij PE, Burger DM. 2008. Therapeutic drug monitoring of voriconazole. *Ther. Drug Monit.* 30:403–411.
- Lewis RE. 2007. Pharmacodynamic implications for use of antifungal agents. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7:491–497.
- Chhun S, Rey E, Tran A, Lortholary O, Pons G, Jullien V. 2007. Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 852:223–228.
- Gage R, Stopher DA. 1998. A rapid HPLC assay for voriconazole in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17:1449–1453.
- Gordien JB, Pigneux A, Vigouroux S, Tabrizi R, Accoceberry I, Bernadou JM, Rouault A, Saux MC, Breilh D. 2009. Simultaneous determination of five systemic azoles in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50:932–938.
- Kahle K, Langmann P, Schirmer D, Lenker U, Keller D, Helle A, Klinker H, Heinz WJ. 2009. Simultaneous determination of voriconazole and posaconazole concentrations in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3140–3142.
- Langman LJ, Boakye-Agyeman F. 2007. Measurement of voriconazole in serum and plasma. *Clin. Biochem.* 40:1378–1385.
- Adams AI, Steppe M, Froehlich PE, Bergold AM. 2006. Comparison of microbiological and UV-spectrophotometric assays for determination of voriconazole in tablets. *J. AOAC Int.* 89:960–965.
- Pascual A, Nieth V, Calandra T, Bille J, Bolay S, Decosterd LA, Buclin T, Majcherczyk PA, Sanglard D, Marchetti O. 2007. Variability of voriconazole plasma levels measured by new high-performance liquid chromatography and bioassay methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:137–143.
- Perea S, Pennick GJ, Modak A, Fothergill AW, Sutton DA, Sheehan DJ, Rinaldi MG. 2000. Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1209–1213.
- Steinmann J, Huelsewede J, Buer J, Rath PM. 2011. Comparison and evaluation of a novel bioassay and high-performance liquid chromatography for the clinical measurement of serum voriconazole concentrations. *Mycoses* 54:e421–e428.
- Cendejas-Bueno E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A. 2013. Development and validation of a fast HPLC/photodiode array detection method for the measurement of voriconazole in human serum samples. A reference laboratory experience. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31:23–28.
- Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A. 2012. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:1229–1235.
- EMA. 2010. Guideline on validation of bioanalytical method validation. European Medicines Agency, London, England.
- FDA. 2001. Guidance for industry: bioanalytical method validation. FDA, Rockville, MD.
- Duvvuru S, Brummer E, Morelli R, Stevens DA. 1998. Isolation of a human serum protein that inhibits the growth of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 144:1–7.
- Zhou ZH, Zhang Y, Hu YF, Wahl LM, Cisar JO, Notkins AL. 2007. The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe* 1:51–61.

**Artículo original: "A simple, sensitive HPLC-PDA method for the quantification of itraconazole and hydroxy itraconazole in human serum: a reference laboratory experience"**.

Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. 2013 Jul;76(3):314-20. doi: 0.1016/j.diagmicrobio.2013.03.012. Epub 2013 Apr 12.

**Objetivos:**

- 1.-Desarrollo de un método rápido y sencillo mediante cromatografía líquida de alta eficacia para la cuantificación de itraconazol y de su metabolito hidroxiiitraconazol en muestras de suero humano.
- 2.- Validación de este método según los estándares de las guías internacionales para la validación de métodos bioanalíticos.
- 3.-Se analizaron de una manera descriptiva los resultados obtenidos de la evaluación de 104 muestras de suero humano pertenecientes a pacientes tratados con Itraconazol.

**Conclusiones:**

- 1.-Es un método rápido, simple y válido para cuantificar itraconazol e hidroxiiitraconazol en muestras de suero humano.
- 2.-Cumple los criterios de validación de métodos bioanalíticos de las guías internacionales (FDA, EMEA). La precisión y la exactitud son aceptables, y el rango de concentraciones evaluadas cubre las concentraciones diana propuestas para Itraconazol tanto en tratamiento como en profilaxis.
- 3.- Se observó una gran variabilidad tanto interpaciente en las concentraciones de itraconazol, lo cual corrobora la necesidad de monitorización de este antifúngico. Así mismo también se observó variabilidad en la proporción de hidroxiiitraconazol en las muestras evaluadas. Por lo general, las concentraciones presentes de hidroxiiitraconazol en las muestras evaluadas eran de media dos veces mayor que la de itraconazol.
- 4.-Este método es aplicable a la monitorización terapéutica de Itraconazol en el laboratorio clínico de manera rutinaria. Debido a la rapidez del análisis y su simplicidad, este método puede ofrecer al clínico una herramienta para la individualización de la dosis y su ajuste. Así mismo queda por esclarecer la importancia de la monitorización de hidroxiiitraconazol en el tratamiento y en la profilaxis cuando los pacientes son tratados con Itraconazol.



## Mycology

## A simple, sensitive HPLC-PDA method for the quantification of itraconazole and hydroxy itraconazole in human serum: a reference laboratory experience

Emilio Cendejas-Bueno, Manuel Cuenca-Estrella, Alicia Gomez-Lopez \*

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 January 2013

Received in revised form 5 March 2013

Accepted 6 March 2013

Available online 12 April 2013

## Keywords:

High performance liquid chromatography

Itraconazole

Hydroxy itraconazole

Therapeutic drug monitoring

Ravuconazole

## ABSTRACT

A chromatographic method (high-performance liquid chromatography/photodiode array detection) for the simultaneous determination of itraconazole and its major metabolite, hydroxy itraconazole, was developed. The validation data demonstrated acceptable values for linearity (dynamic range between 0.25–16 µg/mL for hydroxy itraconazole, 0.125–4 µg/mL for itraconazole), precision (Coefficient of Variation, 2.23–4.28% and 1.61–9.52% respectively), accuracy (Relative Error, –2.89 to –17.26% and –3.11 to 14.44%), selectivity, sensitivity (Lower limit of Quantification, 0.125 and 0.25 µg/mL), and recovery (97.30–105.82%) for both compounds. Its clinical suitability was also investigated in 104 trough human serum samples. The assay resulted to be rapid, sensitive, and simple for simultaneously quantification of these azole compounds in serum samples and should make a positive contribution to optimize therapies on an individual basis.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Itraconazole (ITC), a classical member of the triazole class of antifungal, is a broad-spectrum triazole anti-fungal drug used to treat and prevent infections caused by dermatophytes, yeasts, dimorphic and dematiaceous fungi and molds (Hostetler et al., 1993; Lacroix et al., 1995). Also it is used in prophylaxis of fungal infections in some immunosuppressive pathologies as chronic granulomatous disease (Gallin and Zarembek, 2007).

The mechanism of action for this antifungal compound involves efficient inhibition of the fungal cytochrome P450 (CYP) enzyme known as 14- $\alpha$ -demethylase. This inhibition results in the blockade of the synthesis of ergosterol (Saag and Dismukes, 1988), an essential component of fungal cell membranes.

ITC is extensively metabolized in the liver. The metabolism of ITC via the CYP3A4 enzymatic system (liver and gastrointestinal tract) results in the formation of a hydroxylated metabolite known as hydroxy itraconazole (OHITC). It is an active metabolite which is present at equal or higher concentrations than ITC in the systemic circulation (Templeton et al., 2008). In vitro, ITC is metabolized by CYP3A4 and forms three compounds: OHITC, keto-itraconazole (keto-ITC), and N-desalkyl-itraconazole (ND-ITC). Circulating amounts of keto-ITC, OHITC and ND-ITC following ITC dosing have been detected in human plasma samples (Templeton et al., 2008). These metabolites have been predicted to contribute to in vivo CYP3A4 inhibition

observed after ITC dosing. The amounts of keto-ITC and ND-ITC are negligible compared to OHITC (Templeton et al., 2008) and is therefore considered the main metabolite (de Beule and Van Gestel, 2001).

In the clinical setting, reports have emerged on the relationship between plasma concentrations and efficacy or toxicity for selected azoles, suggesting the usefulness of therapeutic drug monitoring (TDM) (Andes et al., 2009). In some cases such as voriconazole or posaconazole therapy, TDM has been considered a standard of care (FDA, 2010; Pascual et al., 2008). Although there are not enough conclusive clinical studies for ITC, this compound has enough arguments to justify its monitoring to assist clinical decision in cases such as lack of response, gastrointestinal disturbances, concomitant administration of antacids that hampers the absorption, and special pharmacokinetic profile. It is worthy of note that little is known about the contribution of the above mentioned metabolites of ITC to its clinical efficacy. Therefore, a reliable simultaneous analysis of ITC and its main metabolite, OHITC could be useful for patient management equally in prophylaxis (Shimoeda et al., 2010) as much as treatment to ensure efficacy and decrease the incidence of adverse events (Lestner et al., 2009).

Several mass spectrometry methods (Bharathi et al., 2008; Jia et al., 2009; Vogeser et al., 2003) have been reported for determining serum levels of ITC and OHITC. These methods are superior to LC-UV methods but are expensive and not generally available. ITC and its active metabolite can also be measured by biological methods (Hostetler et al., 1993; Law et al., 1994), but the chromatographic methods are more specific and sensitive than bioassays (Hostetler et al., 1993). Only one high-performance liquid chromatography (HPLC)–photodiode array detection (PDA) method has been

\* Corresponding author. Tel.: +34-91-8223661; fax: +34-91-5097966.  
E-mail address: [aliciagl@isciii.es](mailto:aliciagl@isciii.es) (A. Gomez-Lopez).

published that allows simultaneous determination of ITC and OHITC (Lacroix et al., 1995).

In the present study, we describe a simple high performance liquid chromatography coupled to a PDA method for the simultaneous determination of ITC and OHITC using ravuconazole (RVC) as an extraction standard (ES). This method has been validated base on the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA, 2010; FDA, 2001) bioanalytical assays guidelines.

This study was partially presented at the annual meeting of the Spanish Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC, 2010, Barcelona, Spain).

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

ITC and OHITC pure drug substances were kindly supplied by Sigma-Aldrich Quimica (Madrid, Spain) and Janssen-Cilag, S.A (Madrid, Spain), respectively. The extraction standard (ES) ravuconazole (RVC) was purchased from Bristol Myers Squibb Company (Madrid, Spain). Other antifungal drugs used were amphotericin B, (AMB, Sigma-Aldrich), flucytosine, 5FC (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), fluconazole, (FLC, Pfizer S.A., Madrid, Spain), voriconazole, (VRC, Pfizer, Madrid, Spain), posaconazole, POS (Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA), caspofungin, CAS (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA), micafungin, MCF (Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japan) and anidulafungin, AND (Pfizer, Madrid, Spain). Antibacterial drugs used in the specificity assay (imipenem, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, ceftazidime and gentamicin) were supplied by Oxoid S.A (Oxoid SA, Madrid, Spain).

Acetonitrile HPLC gradient grade was supplied by Panreac Química SAV (Castellar Del Vallés, España). Ultrapure water was obtained from Milli-Q water purification system.

Stock solutions of ITC, OHITC and the ES solution of RVC were prepared on Dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain). Authenticated analytical reference standards of known identity and purity were used to prepare solutions of known concentrations.

Human commercial serum from human male AB Plasma was supplied by Sigma-Aldrich Quimica (Madrid, Spain), product reference H1388.

### 2.2. Instruments and Chromatographic conditions

The HPLC system consisted of a Waters 2695 separation module system with column heater and degasser coupled with a Waters 2996 Photodiode array detector (Waters Cromatografía, S.A., Cerdanyola del Vallés, Spain). The Empower Software (version 2.0, Waters Corporation, MA, USA) enabled HPLC system control, acquisition and processing of data. Chromatographic and detection conditions are described in Table 1. The mobile phase consisted of a filtered and degassed mix of acetonitrile: ultrapure water (70:30, v/v).

The chromatographic separation was accomplished on a Sunfire C18 5  $\mu\text{m}$  4.6  $\times$  150 mm column, protected by a guard column Sunfire C18 5  $\mu\text{m}$  4.6  $\times$  20 mm (Waters Corporation). Chromatography was performed isocratically at 25 °C using a flow rate of 0.8 mL/min. Detection was achieved by monitoring the absorbance at 262 nm. ITC eluted at 8.40  $\pm$  0.1 min, OHITC eluted at 4.40  $\pm$  0.1 min and ES at 5.90  $\pm$  0.1 min Fig. 1.

### 2.3. Preparation of stock solutions, working solutions, quality control samples and Extraction Standards

Two stock solutions were separately prepared for calibration and quality control (QC) samples, respectively, by dissolving 3.2 mg of ITC

**Table 1**  
Chromatographic and instrumental conditions.

Instrumental parameters	Conditions
Elution mode	Isocratic
Flow rate	0.8 mL/min
Volume of injection	50 $\mu\text{l}$
Wave length detection	262 nm
Column	Sunfire C18 5 $\mu\text{m}$ 4.6 $\times$ 150 mm
Guard column	Sunfire C18 5 $\mu\text{m}$ 4.6 $\times$ 20 mm
Temperature of the column	25°C
Temperature of the autosampler	25°C
Pressure of the system	900–1200 Psi
Quantitative detection methodology	Peak area ( $\mu\text{V}^{\circ}\text{sec}$ )
Qualitative detection methodology	Time retention; U.V. Spectrum
Calibration mode	Calibration curve
Concentration units	$\mu\text{g}/\text{mL}$
Analytes time retention	Itraconazole 8.40 min
	Ravuconazole 5.90 min
	OH-itraconazole 4.40 min
Run time	10 min

and OHITC in 2 mL of DMSO for each solution yielding concentrations of 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for both analytes.

One solution was used to prepare seven and six calibration standards (CS) of OHITC and ITC respectively at final concentration ranged between 0.125–16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.25–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  by spiking adequate amounts of both stock solutions into drug-free human serum. In the same manner, another 5 QC samples for OHITC and 4 QC samples for ITC were prepared using the second stock solution of OHITC and ITC to obtain final concentrations between 0.125 and 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Standard stock solution of ES was prepared at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in DMSO.

CS, QC and clinical samples were processed as follows: Ice cold acetonitrile in volume of 150  $\mu\text{L}$  was added in 1:1 proportion to CS and QC. Both solutions also included 1.5  $\mu\text{L}$  of ES resulting in a final concentration of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The final mixture was then shaken for 30 seconds on a Vortex Shaker at maximum speed followed by centrifugation at 13800 $\times$ g at 25 °C for 15 minutes. The supernatant was transferred into the chromatographic vials and then injected in the HPLC instrument.

### 2.4. Validation procedures

#### 2.4.1. Linearity

Linearity (response function) was evaluated by analyzing calibration standard solutions (CS) in the range of 0.125–4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ITC or 0.25–16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for OHITC. Experiments were performed in quadruplicate and triplicate on two non-consecutive days and linearity was assessed by linear regression (best fit obtained when plotting peak areas measured by HPLC against OHITC or ITC concentration).

#### 2.4.2. Accuracy and precision

The accuracy and the precision of the method were evaluated based on the QC response throughout multiple experiments. In order to study the intraday accuracy and precision, the QC samples were consecutively measured in one single day. This procedure was repeated on four different days to test the inter-day accuracy and precision.

Between- and within-day precision and accuracy of the analytical method were shown by processing and following analysis of QC samples (0.125, 0.5, 2, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ITC and 0.25, 1, 2, 8, 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for OHITC). Precision was expressed as coefficient of variation calculated as follows:  $[\text{CV} \% = (\text{standard deviation}/\text{mean of measured values}) \times 100]$ , whereas accuracy was expressed as percentage of the relative error, RE %, determined with the formula  $[(\text{mean measured concentration}-\text{nominal concentration})/\text{nominal concentration}] \times 100$ . The criteria for acceptability of the data included accuracy within  $\pm 15\%$  deviation from the nominal values and precision within

$\pm 15\%$  CV%, except for the lower limit of quantification (LLOQ), where it should not exceed 20% of CV% (EMEA, 2010; FDA, 2001).

Our laboratory participates in the international quality control program of antifungal drugs of the Association for Quality Assessment in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. The participation in this program has contributed to optimize the therapeutic drug monitoring performance of ITC and OHITC.

#### 2.4.3. Limit of detection and quantification

Limit of detection (LOD) is defined as the concentration at which the analyte can be distinguished from background signal. This was determined by measuring the peak area that is greater than or equal to the average of the blanks  $+3$  SD. Five replicates of the blank and incrementally increasing amounts of ITC and OHITC were used in the determination.

The LLOQ was defined as the analyte response that is at least five times the response of a blank sample and whose precision and accuracy is within 20% (EMEA, 2010; FDA, 2001).

#### 2.4.4. Recovery

Recovery experiments (extraction efficiency) were performed by comparing the analytical results from extracted samples (0.5, 2, and 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $n = 3$  for ITC and 1, 4, and 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $n = 3$  for OHITC) to non-extracted standards that represent 100% of recovery.

#### 2.4.5. Selectivity and specificity

The selectivity of the method was investigated for potential interferences of endogenous substances by using six independent batches of human serum samples. Selectivity was indicated by the absence of any endogenous interference at retention times of peaks of interest evaluated by chromatograms.

The specificity has been evaluated with respect to several registered anti-fungal drugs, antibacterial drugs commonly used by immunocompromised patients and was tested by comparing chromatographic signal with that of serum spiked with ITC, OHITC and ES.

Other drugs tested were AND, VRC, POS, MCF, AMB, CSP, 5FC, FLC, amoxicilina/clavulanic acid, ciprofloxacin, ceftazidime, gentamicin and imipenem. As a complementary study of specificity, absence/presence of interfering peaks was also checked in the 104 clinical samples included.

#### 2.4.6. Stability

QC samples were tested for stability in a variety of storage and handling conditions:

a) Three freeze–thaw cycles; b) Short-term storage (freeze for 24 hours at  $-20^\circ\text{C}$  and then thaw for 4 hours at room temperature); c) long-term storage (freeze for 1 month at  $-20^\circ\text{C}$  and then thaw for 4 hours at room temperature); d) bench top stability (firstly pre-processed, then stored at room temperature during 24 hours and 96 hours, and then processed); and e) stock solution stability (evaluation of stock solution in dimethyl sulfoxide tested at the beginning of the experiments and then after being stored) at  $-20^\circ\text{C}$  for 2 months (estimated time for this validation procedure).

For each experiment percentage deviations of measured peak areas were compared with those obtained from QC samples at the beginning of the study. All stability tests in serum matrix were performed using low, medium and high QC concentrations, and analyzed in triplicate.

To determine the stock solution stability, stock solutions were stored at  $-20^\circ\text{C}$ , kept at this temperature until the end of the validation period and retested.

#### 2.4.7. Clinical application

The method described here was also applied to the analysis of 104 trough human serum samples from adults and children treated with ITC over a two-year period (2009–2010). A small volume of serum (150  $\mu\text{L}$ ) was required for the analysis. Clinical samples were processed as described above (see CS and QC sample preparation).

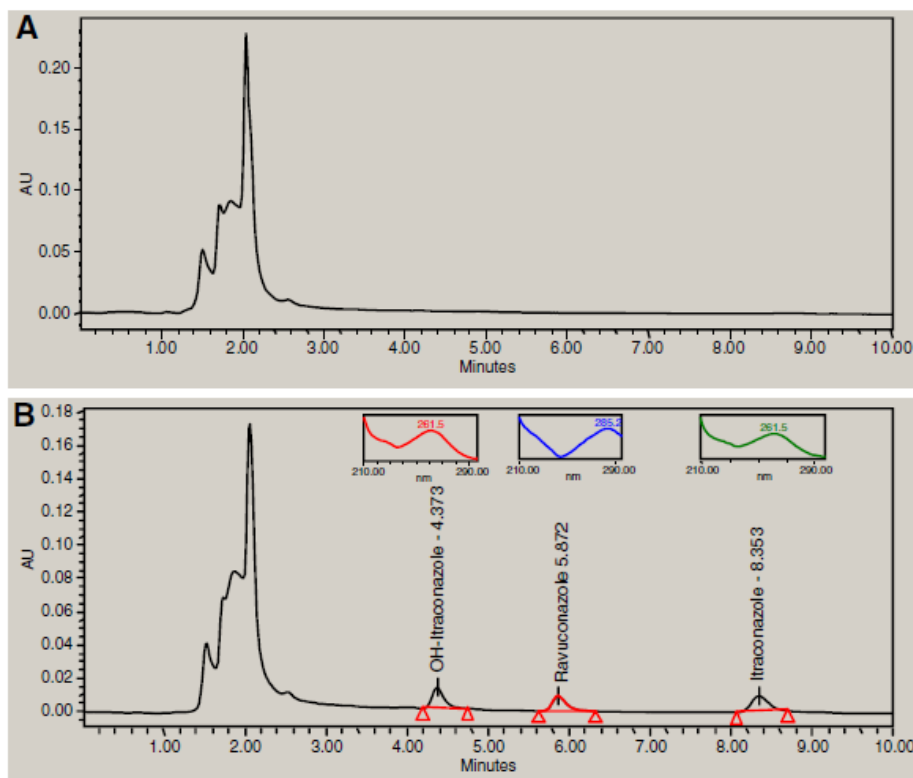


Fig. 1. Representative chromatograms of ITC, OHITC and the ES (8.40, 4.40, and 5.90 min retention times, respectively) in human commercial serum. Panels: A) blank pooled human plasma; B) pooled human plasma spiked with the ES at ITC and OHITC (concentration, 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Table 2**  
ITC and OHITC calibration curves calculated according to the area of chromatographic peaks ( $\mu\text{V}^2\text{sec}$ ).

CC [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Day 1				Day 2				Peak area (mean) N = 8
	1	2	3	4	5	6	7	8	
16	1086109	1086487	1088783	1088588	1142921	1146424	1147518	1148698	1116941
8	558330	559475	557640	557957	552847	549755	552752	549503	554782.375
4	279559	280562	280396	280205	280928	279259	278364	281273	280068.25
2	137225	136976	137758	137192	138439	138925	138989	140322	138228.25
1	66614	66532	67358	67547	65755	65063	65351	65380	66200
0.5	33553	33199	33546	33088	32531	32836	31483	31846	32760.25
0.25	16387	16164	16520	16081	15535	15439	14422	15482	15753.75
Calibration curve	$y = 69708x$								
Average correlation coefficient	$r^2 = 0.9999$								

CC [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Day 1				Day 2			Peak area (mean) N = 7
	1	2	3	4	5	6	7	
4	352209	350899	340625	347632	314862	314925	318181	334190.4
2	175657	178202	175250	168348	155418	153120	152357	165478.8
1	84048	82861	85255	85457	76136	77710	77590	81293.8
0.5	40411	36878	43207	40519	37726	36099	37436	38896.5
0.25	20230	20130	22176	23126	18533	18585	18013	20113.2
0.125	11448	11759	12261	11998	9038	8842	9587	10704.7
Calibration curve	$y = 83215x$							
Average correlation coefficient	$r^2 = 0.9998$							

CC = theoretical concentration. Day 1: replicates done the first day of experiment; Day 2: replicates done the second non consecutive day of experiment; Peak area: mean of all the replicates done the first and the second day.

### 3. Results

The validation established that the calibration standards were proportional to the nominal itraconazole or hydroxy itraconazole concentrations ranging from 0.125–4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.25–16.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The correlation coefficient was higher than 0.999 for both compounds (see Table 2).

The LLOQ was determined to be 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ITC and OHITC respectively. Precision and accuracy values for CS are shown in Table 3. On the other hand, the LOD was found to be 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ITC and OHITC, respectively.

QC within day precision was assessed by extracting six replicates of four or five different concentrations (four for ITC and five for OHITC). Precision was less than 4% for all the concentrations tested. The between-day precision was assessed by running four or five

different concentrations in four separate runs. Each concentration was evaluated in quadruplicate. The mean, SD, CV% and RE% are shown in Table 4.

In conclusion, CV% and RE% data obtained for ITC and OHITC were all within acceptable limits stated for bioanalytical method validation (EMA, 2010; FDA, 2001).

The mean recovery from spiked samples were close to 100% (between 97.30–103.93% for ITC, 98.25–105.82% for OH-ITC and 100.32–104.51% for ES). Drug-free serum samples did not show any interference with ITC and OHITC signals. Interactions with RVC and matrix components were not detected.

No substantial interferences have been detected between the compounds studied (ITC, OHITC and RVC) and the rest of anti-fungal and antibacterial drugs checked (AMB, 5FC, FLC, VRC, POS, CAS, MCF, AND, amoxicillin/clavulanic acid, imipenem, ciprofloxacin, gentamicin

**Table 3**  
Within-day and between-day precision (expressed as coefficient of variation, CV (%)) and accuracy (as mean percentage deviation, RE (%)) of OHITC and ITC based on calibration standards.

Cnom ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	C ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )-(mean $\pm$ SD)		Precision (CV%)		Accuracy (RE %)	
	OHITC	ITC	OHITC	ITC	OHITC	ITC
<b>Within-day variability (n = 4)</b>						
16	15.60 $\pm$ 0.019		0.12		-2.49	
8	8.00 $\pm$ 0.011		0.14		0.12	
4	4.01 $\pm$ 0.006	4.18 $\pm$ 0.062	0.15	1.48	0.48	4.61
2	1.96 $\pm$ 0.004	2.09 $\pm$ 0.050	0.24	2.41	-1.52	4.88
1	0.96 $\pm$ 0.007	1.01 $\pm$ 0.014	0.76	1.42	-3.86	1.54
0.5	0.47 $\pm$ 0.003	0.48 $\pm$ 0.031	0.71	6.44	-4.32	-3.14
0.25	0.23 $\pm$ 0.002	0.25 $\pm$ 0.017	1.23	6.90	-6.53	3.05
0.125		0.14 $\pm$ 0.004		2.91		14.20
<b>Between-day variability (ITC, n = 7; OHITC n = 8)</b>						
16	16.02 $\pm$ 0.452		2.82		0.14	
8	7.95 $\pm$ 0.057		0.72		-0.51	
4	4.01 $\pm$ 0.013	3.94 $\pm$ 0.21	0.34	5.32	0.44	-1.28
2	1.98 $\pm$ 0.016	1.95 $\pm$ 0.131	0.83	6.70	-0.85	-2.23
1	0.94 $\pm$ 0.013	0.96 $\pm$ 0.048	1.43	5.01	-5.03	-3.9
0.5	0.46 $\pm$ 0.010	0.459 $\pm$ 0.032	2.32	7.06	-6.00	-8.07
0.25	0.22 $\pm$ 0.009	0.237 $\pm$ 0.022	4.33	9.45	-9.60	-4.93
0.125		0.126 $\pm$ 0.018		14.60		1.18

Cnom = nominal concentration; C = measured concentration; CV% = standard deviation/mean of measured values  $\times$  100; RE% = [(mean measured concentration-nominal concentration)/nominal concentration]  $\times$  100.

**Table 4**

Within-day and between-day precision (expressed as coefficient of variation, CV (%)) and accuracy (as mean percentage deviation, RE (%)) of determined ITC and OHITC concentrations in serum quality controls.

Cnom ( $\mu\text{g/mL}$ )		C ( $\mu\text{g/mL}$ ) (mean $\pm$ SD)		Precision (CV %)		Accuracy (RE %)	
ITC	OHITC	ITC	OHITC	ITC	OHITC	ITC	OHITC
Within-day variability ( $n = 6$ )							
0.125	0.25	$0.14 \pm 0.005$	$0.201 \pm 0.002$	3.64	1.48	16.29	-19.49
0.5	1	$0.52 \pm 0.013$	$0.87 \pm 0.005$	2.53	0.63	4.27	-12.67
2	2	$1.93 \pm 0.012$	$1.86 \pm 0.008$	0.62	0.46	-3.02	-6.97
4	8	$4.24 \pm 0.025$	$7.54 \pm 0.028$	0.59	0.37	6.04	-5.74
	16		$15.00 \pm 0.073$		0.48		-6.24
Between-day variability ( $n = 18$ )							
0.125	0.25	$0.13 \pm 0.005$	$0.206 \pm 0.007$	9.52	3.74	14.44	-17.26
0.5	1	$0.53 \pm 0.03$	$0.85 \pm 0.036$	4.62	4.28	3.39	-14.61
2	2	$1.91 \pm 0.052$	$1.82 \pm 0.071$	1.61	3.93	-3.11	-8.61
4	8	$3.96 \pm 0.04$	$7.57 \pm 0.169$	2.87	2.23	4.43	-5.37
	16		$15.53 \pm 0.59$		3.80		-2.89

Cnom: nominal concentration; C: measured concentration  $\text{CV}\% = \text{standard deviation/mean of measured values} \times 100$ ;  $\text{RE}\% = [(\text{mean measured concentration} - \text{nominal concentration})/\text{nominal concentration}] \times 100$ .

and ceftazidime). However, it is worth mentioning that hydroxyitraconazole showed a retention time close to that of posaconazole ( $4.40 \pm 0.1$  min vs.  $4.06 \pm 0.2$  min). A chromatogram that shows typical peaks of azole compounds is shown in Fig. 2.

Notably, this study did not test all of the other possible multiple-drug cocktails that patients may receive; however, no interference by the aforementioned drugs was observed. In addition, no interfering peaks were observed at the same retention time of the evaluated compounds when the clinical samples (104) were evaluated.

Results of stability conditions are listed in Table 5. Data show that ITC and OHITC were stable under most of the conditions tested here. Low and medium concentrations of OHITC (0.5 and 2  $\mu\text{g/mL}$ ) degraded more than 15% after long-term and post preparative condition (96 h). Nevertheless, the rest of concentrations tested remain stable.

In addition, we investigated the suitability of this analytical method to determine ITC and OHITC concentrations in a total of 104 trough serum samples. These samples belonged to 56 patients, with an average of 1.82 samples per patient (range 1–9). Thirty seven out of 56 patients were male (66%). Twenty five out of 56 patients (43.85%) were in prophylaxis therapy with ITC, whereas 11 of them were in

treatment (19.29%). Most of the patients following prophylaxis suffered from hematological diseases or bone marrow transplant, as well as chronic granulomatous disease.

In 77 out of 104 samples evaluated (74.03%), both compounds were quantified with no interference peaks in the chromatogram and a correct quantification of the ES. The remaining twenty six samples (25.00%) showed ITC and OHITC concentrations below the limit of detection (0.125  $\mu\text{g/mL}$  for ITC and 0.25 for OHITC). Only in one out of the 104 samples, ITC were not detected whereas OHITC were 0.77  $\mu\text{g/mL}$ . The average of ITC concentrations in these 77 samples were 0.7  $\mu\text{g/mL}$  (interquartile range 0.35–1.18) and 1.33  $\mu\text{g/mL}$  (IR 0.68–2.08  $\mu\text{g/mL}$ ) for OHITC. The OHITC/ITC ratio ranged between 0.75–4.14, with an average of 1.99.

#### 4. Discussion

A simple and fast analytical method was developed to quantify ITC using a small volume of human serum. This method provides a result available for making clinical decisions in less than one hour (45 min), included extraction and chromatographic procedures. The use of a straightforward protein precipitation in a small volume of serum

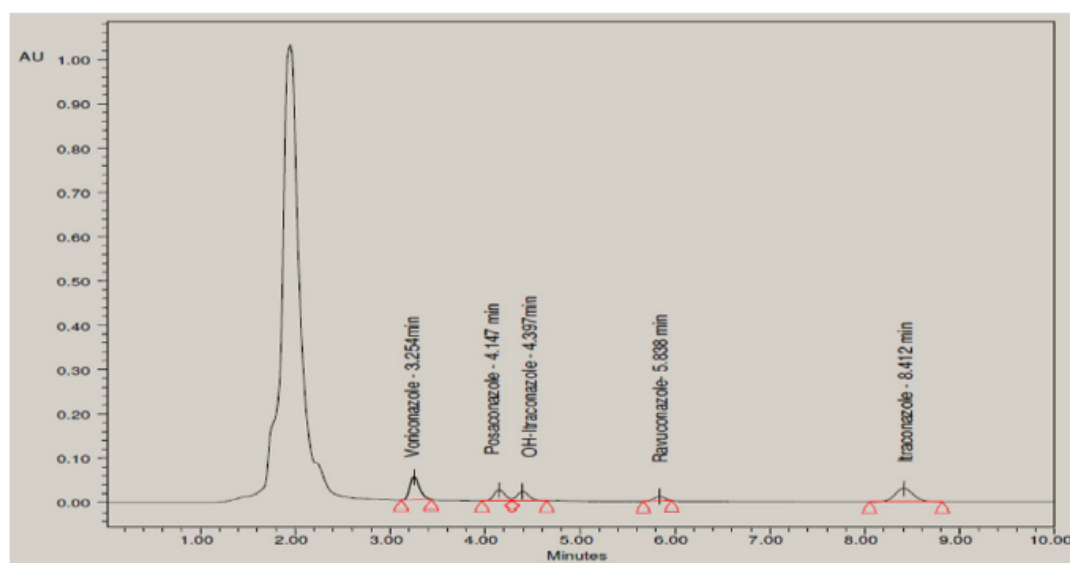


Fig. 2. Typical chromatogram of blank plasma spiked with a mix of azole compounds.

**Table 5**  
Stability of ITC and OHITC.

CC [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] n = 3	Peak area 1 ITC average	Peak area 2 ITC average	% ITC average		Peak area 1 OHITC average	Peak area 2 OHITC average	% OHITC average			
<i>Freeze–thaw stability</i>										
0.5	45281	51194	<b>113.05</b>		30075	28135	<b>93.54</b>			
2	174078	179171	<b>102.92</b>		124786	121767	<b>97.58</b>			
4	343752	351227	<b>102.17</b>		254826	252702	<b>99.16</b>			
<i>Short-term stability</i>										
0.5	45281	47820	<b>105.60</b>		30075	29069	<b>96.65</b>			
2	174078	179630	<b>103.18</b>		124786	121421	<b>97.30</b>			
4	343752	349831	<b>101.76</b>		254826	244961	<b>96.12</b>			
<i>Long-term stability</i>										
0.5	45281	41665	<b>92.01</b>		30075	25243	<b>83.93</b>			
2	174078	146597	<b>84.21</b>		124786	109411	<b>87.67</b>			
4	343752	326996	<b>91.09</b>		254826	237213	<b>93.08</b>			
<i>Post-preparative stability</i>										
		24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h	
0.5	36945	35531	35036	96.17	94.83	30075	28424	24758	94.50	82.32
2	162704	170227	158914	104.6	97.67	124786	119920	118125	96.10	94.66
4	319833	334351	310697	104.5	97.14	254826	253774	249284	98.58	97.82
<i>Stock solution stability</i>										
ITC	OHITC									
0.5	1	37492	34079	90.90		58361	53555	91.76		
2	4	151329	151763	100.28		240063	218300	90.93		
4	8	307930	304189	98.78		463499	474499	102.73		

Peak area 1: Peak area detected at the beginning of the experiment. Peak area 2: peak area at the end of the experiment. For each experimental condition peak areas were compared with those obtained at the beginning of the study and percentage of concordance was evaluated (maximum concordance 100%). i) Freeze–thaw stability (three freeze–thaw cycles). ii) Short-term storage (freeze for 24 h at  $-20^{\circ}\text{C}$  and then thaw for 4 h at room temperature), iii) long-term storage (freeze for 1 month at  $-20^{\circ}\text{C}$  and then thaw for 4 h at room temperature); iv) bench top stability (storage at room temperature for 24 h and 96 h, and then processed), and v) stock solution stability (evaluation of stock solution in dimethyl sulfoxide tested at the beginning of the experiments and then after being stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) for 2 months (estimated time for this validation procedure).

makes the method easier and faster than other previously reported that required large volumes of sample or long time to complete the assay (Gubbins et al., 1998; Jia et al., 2009; Khoshsorur et al., 2005; Uno et al., 2006; Vogeser et al., 2003). We must emphasize that another important advantage is the use of a simple mobile phase with no buffers or additives, in contrast with other methods previously published (Khoshsorur et al., 2005; Law et al., 1994; Poirier and Cheymol, 1997). Because the acetonitrile–water mobile phase contains no buffer salts or any other additive, it could be left in the column when the system was shut down, thereby permitting more rapid equilibration, which obviated the need for intermediate solvent flushing. In contrast with other published methods, the ES is used for checking the extraction procedure. The use of RVC as ES (with similar chemical profile) ensures a comparable chromatographic behaviour (Bohme et al., 1996; Gubbins et al., 1998; Poirier and Cheymol, 1997; Poirier et al., 1994). The efficacy of extraction method resulted to be higher than 97%. In addition, the PDA offers several advantages with respect to conventional UV and fluorescence detectors. It is capable of providing characteristic UV spectra as well as data on peak purity, ensuring the identity and homogeneity of the compounds analysed. In contrast with LC–MS or LC–MS/MS (Decosterd et al., 2010; Jia et al., 2009), HPLC–PDA method results to be more economical, and its equipment is available in most of the clinical laboratories.

Our HPLC–PDA method has enough sensitivity, precision and accuracy to make a reliable result available for clinical decisions. The method is able to provide a result within the range of concentrations that are usually found in clinical practice (Andes et al., 2009).

With regard to results from monitored patients, we have found a high interpatient variability as has been previously published (interquartile range 0.35–1.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ITC and 0.68–2.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for OHITC) (Poirier et al., 1994; Shimoeda et al., 2010; Bohme et al., 1996). This variability has been reported to be dependent on many circumstances, which can decrease the absorption of the compound in

the gastrointestinal tract (Andes et al., 2009). However, we cannot confirm these hypotheses because our clinical data collection is limited due to the retrospective origin of the study. The absence of good clinical records is the main limitation of our study.

This method is also useful to characterize and quantify the main and active metabolite of ITC in the same chromatographic run. As it has been described before, OHITC has been suggested to contribute to therapeutic efficacy and its simultaneous quantification with the parent compound could be relevant for the clinical interpretation of antifungal exposure (Decosterd et al., 2010). It is well known that OHITC has in vitro activity against yeasts and molds species, but it is not well known the importance of serum levels of OHITC in the therapeutic drug monitoring of ITC. As far as we know, there are not prospective or retrospective studies that evaluated the influence of OHITC serum concentrations in the clinical success of the antifungal treatment and prophylaxis with ITC. Characterization of metabolites has been suggested to be useful for dose adjustment of voriconazole (Hassan et al., 2011; Yamada et al., 2012). This claim has not been described for OHITC yet, but considering the proven activity of this metabolite it would be interesting to quantify it for ITC dosage optimization.

It is worth of note that in our study, the average ratio OHITC/ITC was 1.99, lower or higher values might be related with some kind of metabolism alteration (drug interactions, genetic background). This ratio estimation could be an additional tool for optimizing therapy. The antifungal in vitro activity of the OHITC is demonstrated, therefore it is important to clarify the role that OHITC serum levels may play in treatment or prophylaxis with ITC.

In conclusion, the present method is valid for simultaneously determining the plasma concentrations of ITC and OHITC, and should make a positive contribution in clinical settings in order to optimize drug dosage on an individual basis, and the estimation of pharmacokinetic parameters of both compounds.

#### 4.1. Funding

The chromatographic method to detect itraconazole and hydroxy itraconazole has been partially financed by an intramural Project from ISCIII (MPY 1354/10). E. Cendejas-Bueno has a Predoctoral Contract from Instituto de Salud Carlos III (AFTDOC 11/02).

#### 4.2. Transparency declarations

In the past 5 years, M.C.E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMerieux, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the ALBAN program, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, The Spanish Health Research Fund, The Instituto de Salud Carlos III, The Ramon Areces Foundation, The Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough.

Other authors: No conflicts.

#### References

- Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:24–34.
- Bharathi DV, Hotha KK, Sagar PV, Kumar SS, Reddy PR, Naidu A, et al. Development and validation of a highly sensitive and robust LC-MS/MS with electrospray ionization method for simultaneous quantitation of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma: application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;868:70–6.
- Bohme A, Just-Nubling G, Bergmann L, Shah PM, Stille W, Hoelzer D. Itraconazole for prophylaxis of systemic mycoses in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:953–61.
- de Beule K, Van Gestel J. Pharmacology of itraconazole. *Drugs* 2001;61(Suppl 1):27–37.
- Decosterd LA, Rochat B, Pesse B, Mercier T, Tissot F, Widmer N, et al. Multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of fluconazole, itraconazole, hydroxyitraconazole, posaconazole, voriconazole, voriconazole-N-oxide, anidulafungin, and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5303–15.
- EMA. Guideline on validation of bioanalytical methods; 2010.
- FDA. Guidance for industry, bioanalytical method validation. FDA; 2001.
- FDA. Posaconazole. Accessed 17 February 2009 FDA briefing document; 2010.
- Gallin JI, Zarembek K. Lessons about the pathogenesis and management of aspergillosis from studies in chronic granulomatous disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007;118:175–85.
- Gubbins PO, Gurley BJ, Bowman J. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of itraconazole and its hydroxy-metabolite in human serum. *J Pharm Biomed Anal* 1998;16:1005–12.
- Hassan A, Burhenne J, Riedel KD, Weiss J, Mikus G, Haefeli WE, et al. Modulators of very low voriconazole concentrations in routine therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2011;33:86–93.
- Hostedler JS, Heykants J, Clemons KV, Woestenborghs R, Hanson LH, Stevens DA. Discrepancies in bioassay and chromatography determinations explained by metabolism of itraconazole to hydroxyitraconazole: studies of interpatient variations in concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2224–7.
- Jia JY, Lu C, Liu GY, Zhang MQ, Liu YM, Wang W, et al. Simultaneous determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma by liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry method. *Biomed Chromatogr* 2009.
- Khoschsorur G, Fruehwirth F, Zelzer S. Isocratic high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for simultaneous determination of levels of voriconazole and itraconazole and its hydroxy metabolite in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3569–71.
- Lacroix C, Wojciechowski F, Danger P. Simultaneous determination of itraconazole, hydroxy-itraconazole and amphotericin B in human plasma by HPLC with photodiode array detection. *Ann Biol Clin (Paris)* 1995;53:293–7.
- Law D, Moore CB, Denning DW. Bioassay for serum itraconazole concentrations using hydroxyitraconazole standards. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1561–6.
- Lestner JM, Roberts SA, Moore CB, Howard SJ, Denning DW, Hope WW. Toxicodynamics of itraconazole: implications for therapeutic drug monitoring. *Clin Infect Dis* 2009;49:928–30.
- Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008;46:201–11.
- Poirier JM, Cheymol G. A rapid and specific liquid chromatographic assay for the determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma. *Ther Drug Monit* 1997;19:247–8.
- Poirier JM, Lebot M, Descamps P, Levy M, Cheymol G. Determination of itraconazole and its active metabolite in plasma by column liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 1994;16:596–601.
- Saag MS, Dismukes WE. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1–8.
- Shimoeda S, Nakagawa S, Kobayashi H, Yamato S, Kawano K, Ohta S. Clinical significance of measuring the blood concentration of itraconazole oral solution in the field of hematology. *Biol Pharm Bull* 2010;33:1861–6.
- Templeton IE, Thummel KE, Kharasch ED, Kunze KL, Hoffer C, Nelson WL, et al. Contribution of itraconazole metabolites to inhibition of CYP3A4 in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:77–85.
- Uno T, Shimizu M, Sugawara K, Tateishi T. Sensitive determination of itraconazole and its active metabolite in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit* 2006;28:526–31.
- Vogeser M, Spohrer U, Schiel X. Determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma by use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:915–20.
- Yamada T, Mino Y, Yagi T, Naito T, Kawakami J. Rapid simultaneous determination of voriconazole and its N-oxide in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography method and its clinical application. *Clin Biochem* 2012;45:134–8.

**3.2.- Utilidad de la determinación de concentraciones sanguíneas y tisulares en modelos animales. Relaciones dosis exposición, establecimiento de parámetros farmacocinéticos. Relaciones entre concentraciones séricas y respuesta, evaluación de métodos de diagnóstico y seguimiento.**

**Artículo original: “An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: The role of azole resistance”.**

Medical Mycology. 2014 Apr;52(3):311-9. doi: 10.1093/mmy/myt022. Epub 2014 Feb 4

**Objetivos:**

- 1.- Investigar el impacto de las mutaciones en el CYP51A, diana de los azoles, en la patogénesis de *Aspergillus fumigatus* usando un modelo de hospedador invertebrado con larvas de la polilla de la miel (*Galleria mellonella*).
2. - Evaluación de los patrones de crecimiento *in vitro* de las diferentes cepas.

**Conclusiones:**

- 1.- Todas las cepas demostraron un patrón de crecimiento *in vitro* similar y fueron igual de virulentas en las larvas del insecto.
- 2.- Estos resultados sugieren que en *A. fumigatus* la adquisición de este mecanismo de resistencia no implica cambios significativos en la virulencia.
- 3.- *Galleria mellonella* proporciona un modelo adecuado y barato para el precribado *in vivo* de mutantes de *Aspergillus fumigatus*, contribuyendo a la generación de hipótesis que pueden ser evaluadas en experimentos con modelos animales de mamíferos.
- 4.-El modelo ofrece en este sentido interesantes aplicaciones al estudio de relaciones exposición-respuesta con antifúngicos por su fácil manejo y versatilidad.



Original Article

## An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: The role of azole resistance

A. Gomez-Lopez<sup>1,\*</sup>, A. Forastiero<sup>1</sup>, E. Cendejas-Bueno<sup>1</sup>, L. Gregson<sup>2</sup>, E. Mellado<sup>1</sup>, S.J. Howard<sup>2</sup>, J.L. Livermore<sup>2</sup>, W.W. Hope<sup>2</sup> and M. Cuenca-Estrella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain and <sup>2</sup>Department of Molecular and Clinical Pharmacology, University of Liverpool, United Kingdom

\*To whom correspondence should be addressed. Mailing address: A. Gomez-Lopez, Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra Majadahonda a Pozuelo, Km 2. 28220, Majadahonda, Madrid, Spain. Tel: +34-91-8223661; Fax: +34-91-5097966; E-mail: [aliciagl@isciii.es](mailto:aliciagl@isciii.es)

Received 9 April 2013; Revised 24 June 2013; Accepted 29 July 2013

### Abstract

The impact of different mutations in the *Aspergillus fumigatus* ergosterol biosynthesis pathway on pathogenesis has been evaluated using a simple invertebrate mini host, the caterpillar *Galleria mellonella*. A set of strains that includes clinical isolates and isogenic mutants with mutations at the *cyp51A* gene conferring azole resistance were studied. All strains demonstrated a similar *in vitro* growth pattern and are equally virulent against the insect larvae. These results suggest that in *A. fumigatus* acquisition of this particular azole-resistance mechanism would not imply any significant change in virulence. *G. mellonella* may provide a convenient and inexpensive model for the *in vivo* pre-screening of mutants of *A. fumigatus*, contributing to the generation of a hypotheses that can be further tested in refined experiments in mammalian models.

**Key words:** nonmammalian model, isogenic mutants, *cyp51A* gene.

### Introduction

The impact of acquired resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* in terms of virulence and fitness is not yet understood. In fact, it has been noted that persistence of drug-resistant organisms in nature depends on the relative fitness of resistant and susceptible genotypes [1].

The main mechanism of azole resistance in *A. fumigatus* is via alterations, either point mutations or overexpression, of the target enzyme Cyp51A [2–7]. Evidence that isolates with acquired resistance mechanisms are just as pathogenic

as wild-type strains is growing [8]. However, there are few comparative analyses of the pathogenic potential of different *Aspergillus* species and drug-resistant mutants [9]. In this context, Mellado et al. found that a *cyp51A* gene knockout strain (lacking the azole target gene) was morphologically indistinguishable from the wild type and also was able to retain the ability to cause pulmonary disease in a neutropenic mice model [5].

Different aspects of pathogenesis, innate and acquired host responses, and therapy have been extensively

**Table 1.** Azoles susceptibility results (MIC in mg/L) obtained by EUCAST methodology for wild type (Wt) strain and derived mutants.

Strain identification	Oorigin	Cyp51A protein	Itraconazole, MIC in mg/l	Voriconazole, MIC in mg/l	Posaconazole, MIC in mg/l
CNM <sup>a</sup> CM-237	Clinical strain	Wt	0.25–0.5	0.12–0.25	0.06–0.12
CNM CM-2266	Clinical strain (sputum)	G54W	>8	0.5	>8
CR056	Isogenic strain	G54E	>8	0.25	1
CR061	Isogenic strain	G54R	>8	0.25	1
CR058	Isogenic strain	M220K	>8	1	1
CR059	Isogenic strain	M220V	>8	1	0.5
CR060	Isogenic strain	M220T	>8	1	0.12–2
CR019	Isogenic strain	TR/L98H	>8	4	0.5
CM-A8	Isogenic strain	$\Delta_{cyp51A}$	0.06	0.25	0.03

MIC, minimal inhibitory concentration.

<sup>a</sup>CNM-CM. Filamentous Fungi Collection of the Spanish National Center for Microbiology.

investigated using laboratory animal models of invasive aspergillosis. These models have been important for the advancement of therapy and for expanding our understanding of pathogenesis and host resistance. Rodent models of aspergillosis, particularly murine models, are often used, and there is particular interest in developing nonmammalian host models in order to address the bioethical impact of the classic animal experimentation [10]. Alternative invertebrate hosts, such as *Galleria mellonella* (Lepidoptera; commonly known as the greater wax moth), may also be useful.

Recent evidence suggests that innate immune responses involved in the defense against most pathogens are phylogenetically ancient and are present in both higher and lower animals [11,12]. For these reasons, analysis of the immunological responses of insects may provide relevant insights into defense mechanisms against fungi [13]. The caterpillar *G. mellonella* has several favorable attributes for assessing fungal virulence and antifungal activity including ease in handling, low cost, and low maintenance [14,15]. Several recent studies have suggested that *G. mellonella* infection models can be used in *A. fumigatus* pathogenesis studies [16,17]. *A. fumigatus* can proliferate in *G. mellonella*, leading to the eventual death of the caterpillar.

Here, we explore the impact of different *Cyp51A* mutations, which are the azole target, on the pathogenesis of *A. fumigatus* using a simple invertebrate minihost, the caterpillar *G. mellonella*. Further investigations focused on the *in vitro* growth patterns of the isolates were also performed.

## Material and methods

### Strains

Nine *A. fumigatus* strains were used in this work. They included an azole-susceptible CNM CM-237 strain (wild-type *cyp51A* gene) and seven azole-resistant (isogenic strains

with altered *cyp51A* alleles introduced into the CM-237 wild-type strain by electroporation). In addition, a clinical strain isolated from the sputum of a patient with aspergillosis that showed a point mutation in the target *cyp51A* was included. Descriptions of the strains are provided in Table 1. Briefly, two mutants (CR056, CR061) and one clinical strain (CNM CM-2266) had one mutation at position glycine 54 including amino acid changes G54E, G54R, and G54W [3]. A second group of mutants (CR058, CR059, CR060) included a point mutation at methionine 220 and the following amino acid changes: M220K, M220V, and M220T [4]. Two additional strains included CR019 (gene replacement of the TR/L98H fragment from strain CM-2627 into azole-susceptible strain CM-237) [6] and the *cyp51A*-deleted strain (CM-A8) [5]. *In vitro* susceptibility testing was performed following the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) methodology [18]. The minimal inhibitory concentrations to itraconazole, voriconazole, and posaconazole are summarized in Table 1.

### Growth kinetic assay

Growth kinetics using a fixed inoculum size ( $2.5 \times 10^6$  conidia/ml) on two solid media, potato dextrose agar (PDA; Becton Dickinson, Madrid, Spain) and minimal essential medium (Sigma Aldrich, Madrid, Spain), were estimated. A single spot (0.1 ml,  $2.5 \times 10^5$  conidia/spot) was dispensed on each agar plate and incubated for 3 days at 37°C; the zone diameter was measured after 24, 48, and 72 h. Experiments were repeated at least two times on different days. The average diameter was used to determine the radial growth rate (Kr), which is calculated using the linear regression of the diameter vs. time. Differences of Kr were assessed among strains.

### Fungal growth rate in liquid medium

Fungal growth in a microbroth kinetic system (iEMS Reader MF spectrophotometer; LabSystems, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) was measured in order to evaluate differences in the growth curves of strains. These studies were conducted in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 2% glucose (Sigma Aldrich) in 96-well microdilution plates inoculated with  $10^5$  conidia/ml and incubated at 37°C. The optical density (OD) of each well in the plate was monitored at 405 nm ( $OD_{405}$ ) every 30 min over a 24-h period [19]. Several experiments were performed in order to study the reproducibility of growth curves.

For each time point,  $t$ , the average OD of two consecutive measurements until the  $t = +2$  time point was calculated and subtracted from the average OD of the previous two measurements from the  $t = -2$  time point. Lag phase of growth (defined as a delay in OD changes due to germination of spores) was calculated as time during which  $OD_{405}$  does not increase. The beginning of the growth phase was defined as a change in  $OD_{405} > 0.001$  U (the lower detectable OD). Exponential-phase broth cultures were marked by a specific growth change of  $>0.002$  U/h.

Data were exported to GraphPad Prism (Graph Pad v5 for Windows, La Jolla, CA, USA); parameters related to growth patterns were evaluated for all strains. For each curve, the coefficient of determination ( $r^2$ ) for the adjustment of the curve to the model was obtained.

### Experimental model

Larvae of *G. mellonella*, approximately 0.3–0.5 g body weight (Vanderhorst Wholesale, Inc., St. Marys, OH, USA, and Mous Livebait R.J., The Netherlands) were used (10 per group). Each larva was infected with conidia of wild-type *A. fumigatus* or mutant strains. Preliminary experiments were performed with the wild-type strain in order to determine the appropriate range for the inoculum that would cause median survival (50% mortality) at 72–96 h post infection (data not shown). An inoculum of  $2 \times 10^5$  conidia per larva was established to cause 50% death 3–4 days post infection.

Then, 10  $\mu$ l of both wild-type *A. fumigatus* and mutant strain conidia ( $2 \times 10^7$  conidia/ml) prepared in phosphate-buffered saline (PBS) + 0.01% Tween 20 were injected into the hemocoel of each larva via the last left proleg using a 26-gauge, 16-mm needle with Hamilton syringes (Teknokroma, S.C.C.L., Barcelona, Spain). Before injection, the proleg area was cleaned with a swap soaked in 70% ethanol. The inoculum was verified with quantitative counts. In addition, a group of larvae inoculated with conidia of *A. fumigatus* wild-type strain killed with heat (a suspension of  $2 \times 10^7$  conidia/ml boiled at 90°C for 1 h, in-

jected 10  $\mu$ l) were included as negative control of infection. These conidia are not able to grow on solid media and are intended to demonstrate nonvirulent behavior in the model used.

Larvae were incubated in 90-mm plastic petri dishes (Soria Genlab, S.A., Madrid, Spain) at 37°C in a humidified chamber and monitored daily. Caterpillars showing signs of severe morbidity (e.g., no response to touch or change of body color) were sacrificed using cold treatment at  $-20^\circ\text{C}$  or water immersion. Three additional types of controls were used in each assay to ensure that neither the injection procedure nor the incubation period were responsible for observed mortality. In the untouched control, the larvae were not handled and were incubated at the same temperature as infected larvae. The second set of controls consisted of larvae that were injected with a sterile syringe into the last left proleg, but no conidia (or PBS) were inoculated. A third PBS control consisted of larvae injected with 10  $\mu$ l of sterile PBS to monitor killing due to physical injury. Three independently conducted experiments were performed for each strain. Survival curves were plotted, and differences between groups were analyzed with Kaplan-Meier statistics using the program Graph Pad Prism (version 5).

### Estimation of fungal burden

In order to investigate the time course of fungal infection, we quantified fungal burden after infection using a specific real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Three whole inoculated larvae were homogenized in 5 ml of sterile PBS. Then 200  $\mu$ l were processed for DNA extraction using the QiAmp Tissue DNA Mini Kit (Qiagen, Izasa, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. A specific and validated RT-PCR assay was performed with each extracted sample to quantify the fungal density at selected time intervals (1 h and 72 h after infection). Fungal burden data were expressed as nanograms of fungal DNA per gram of larva. All samples were tested in duplicate, and an average of fungal burden was evaluated. Controls were used throughout the process (for both DNA extraction and PCR amplification). Larvae inoculated with heat-killed conidia were also included as control for RT-PCR assay. In addition, at different time points after infection, selected larva were formalin-fixed and embedded in paraffin. Sections approximately 5  $\mu$ m in size were prepared, stained with periodic acid-Schiff and methenamine silver staining, and examined by light microscopy.

The ability of conidia to germinate into larva was also determined using injected spores (10  $\mu$ l,  $2 \times 10^7$  conidia/ml) previously stained with 10  $\mu$ g/ml of calcofluor-white (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. Hemolymph was collected after 2 h and 72 h of incubation. Conidia were then

**Table 2.** Growth characteristics of strains included in the study.

Strains	Growth parameters (solid media) <sup>a</sup>				Growth parameters (liquid media) <sup>b</sup>		
	Colony growth rate Kr (slope log <sub>10</sub> mm/h)		Maximal growth (diameter size in log <sub>10</sub> )		Parameters of growth in liquid media after 24 hour of incubation (best fit values)		
	PDA	MM	PDA	MM	Preferred model (R <sup>2</sup> )	Lag (hour)	Mue (OD <sub>450</sub> /per h)
CNM CM-237	0.014	0.016	1.843	1.594	Gompertz (0.997)	6.138	0.0061
CNM CM-2266	0.011	0.009	1.886	1.556	Gompertz (0.996)	7.471	0.0059
CR056	0.013	0.014	1.782	1.526	Gompertz (0.995)	8.163	0.0068
CR061	0.014	0.013	1.846	1.559	Gompertz (0.997)	8.176	0.0093
CR058	0.014	0.014	1.840	1.604	Gompertz (0.996)	6.697	0.0069
CR059	0.011	0.013	1.688	1.453	Gompertz (0.996)	6.959	0.0079
CR060	0.013	0.011	1.833	1.515	Gompertz (0.999)	4.722	0.0063
CR019	0.014	0.017	1.843	1.627	Gompertz (0.996)	8.583	0.0080
CM-A8	0.014	0.014	1.819	1.491	Gompertz (0.997)	5.508	0.0053

Kr, radial growth rate; MM, minimal essential medium; PDA, potato dextrose agar.

<sup>a</sup> Solid media includes MM and PDA.

<sup>b</sup> The Gompertz model is a type of mathematical model [ $Y = N_0 + C \cdot \exp(-\exp((2.718 \cdot \mu_{\max}/C) \cdot (\text{Lag} - X) + 1))$ ] for a time series, where growth is slowest at the start and end of a time period (sigmoidal). Lag, delay before growth, time units;  $\mu_{\max}$ , maximum specific growth rate.

microscopically examined using a Leica DMI 3000B fluorescence microscope (Leica Microsystem, Barcelona, Spain) to check formation or extension of germ tubes.

#### Hemocytometry

Additional experiments were performed to better characterize the interaction between *G. mellonella* and *A. fumigatus* strains. Fluctuations in hemocyte numbers have been shown to occur after infections with a range of microorganisms. Consequently, checking hemocyte numbers after infection may provide clues on differential virulence. Hemocyte density was assessed by counting the number of cells. Groups of larvae (three per time point) were infected with  $2 \times 10^5$  conidia/larvae of each strain studied. At different time points (2 h, 4 h, and 24 h), yellow hemolymph was collected (this was done by bleeding larvae with a sterile needle) and diluted in PBS containing 0.37% 2-mercaptoethanol (v/v); hemocyte density was assessed by counting the number of cells using a hemacytometer. All determinations were performed on three independent experiments. An untouched group of larvae was included in order to determine whether a change in circulating hemocyte density can be an indication of the protective effect observed in infected larvae vs. those left untouched. Results were expressed as cells per milliliter hemolymph.

#### Statistical analysis

All data analyses were performed by using the software package GraphPad Prism software (v. 5). The level of statistical significance was set at a  $P < 0.05$ .

## Results

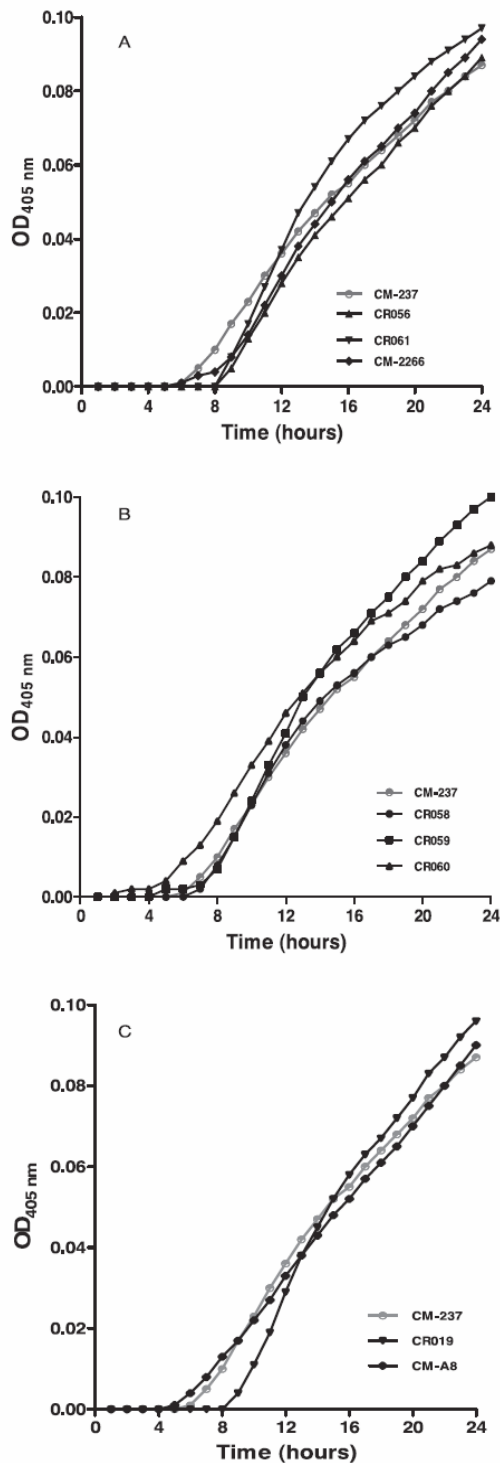
### Fungal growth rate in liquid and solid media

There were only small and statistically insignificant differences ( $P > 0.8$ ) between the Kr on solid media among strains (Table 2). Monitoring of fungal growth in the microbroth kinetic system showed a sigmoid-shaped pattern, with the length of the lag phase largely independent of the strain (Fig. 1). Differences in the duration of this lag phase were less than 4 h (range, 4.7–8.5 h) [19]. All data fit a Gompertz model curve with a  $R^2 > 0.99\%$ . Characteristic growth parameters are shown in Table 2.

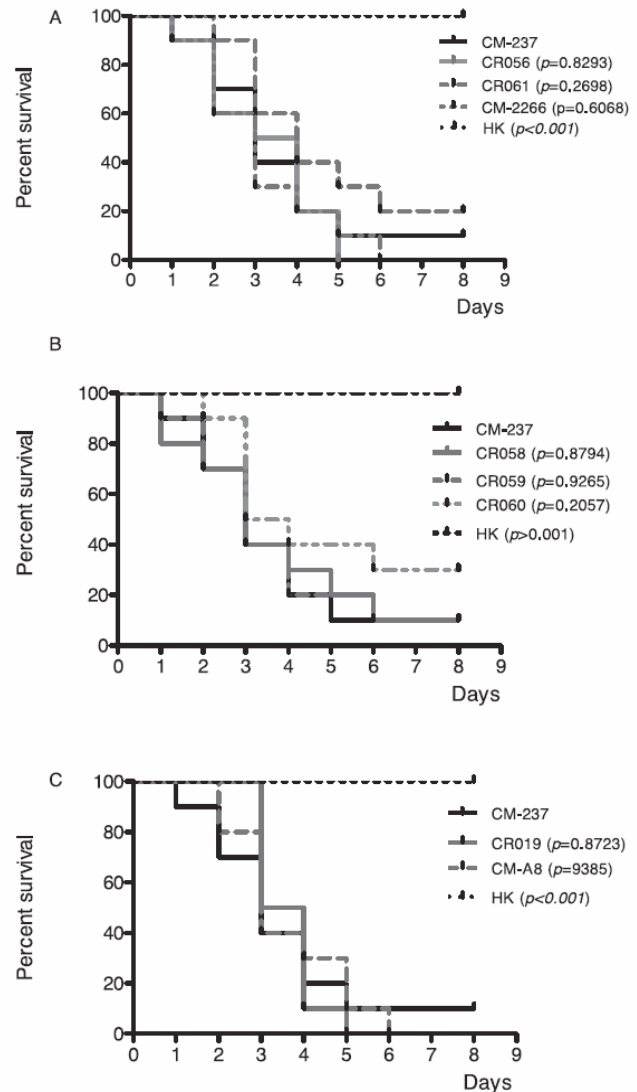
### In vivo evaluation of pathogenic potential of *A. fumigatus* strains and fungal burden estimation

Using the experimental conditions described in this study, all *A. fumigatus* strains (wild type and mutants) were able to kill *G. mellonella* larvae. Based on these data, the 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) was  $2 \times 10^5$  conidia per larva (Fig. 2). There was no significant difference in mean survival between larvae infected with the wild-type strain and those infected with any of the isogenic strains (Mantel-Cox test,  $P > 0.2$ ) regardless of the *cyp51A* mutations (G54, M220, TR/L98, or *cyp51A* deleted strain). We also found that the heat-killed *A. fumigatus* wild-type strain was not lethal (Fig. 2).

The RT-PCR results demonstrate progressive increases in the *Aspergillus* burden during the time of infection. Immediately after infection (1 h post infection), the estimated fungal burden from larval homogenate was low

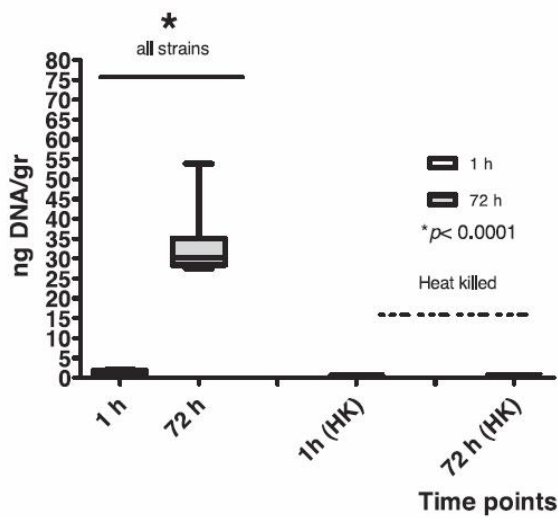


**Figure 1.** Growth rate of *Aspergillus fumigatus* strains expressed as optical densities (ODs) in liquid media. ODs were normalized for each growth curve by subtracting the background OD at the beginning of measurement. The wild-type strain CM-237 is included as a comparator. (A) Isogenic and clinical strains including *cyp51A* mutation at position glycine 54; (B) isogenic strains including *cyp51A* mutation at methionine 220; and (C) additional strains including TR/L98H strain and *cyp51A* deleted strain.



**Figure 2.** Survival curves of *Galleria mellonella* infected with  $2 \times 10^5$  spores per larva of each strain included in the study. The survival data were grouped taking into account Cyp51A protein characteristics. (A) Isogenic and clinical strains including *cyp51A* mutation at position glycine 54; (B) isogenic strains including *cyp51A* mutation at methionine 220; and (C) additional strains including TR/L98H strain and *cyp51A* deleted strain. Wild-type strain (CM-237) was included in all analyses as a comparator. Differences in survival were analyzed using the Kaplan-Meier test.

(range, 0.8–2.1 ng DNA/g), whereas the burden obtained after 72 h was significantly higher for all strains studied (one-way analysis of variance,  $P < 0.05$ ; Fig. 3). Fungal burden at this time point ranged from 27.7 to 53.9 ng DNA/g, with no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) among strains (mutants and wild type). The exception was larvae infected with heat-killed conidia for which fungal burden remained low throughout the study ( $P > 0.05$ ).



**Figure 3.** Estimated fungal burden from larval homogenate by a specific real time-polymerase chain reaction. All infected larvae were evaluated together. Larvae infected with heat-killed CM-237 conidia were used as a comparator.

Conidia were observed to be engulfed by hemocytes after injection and proliferated in the insect hemolymph after incubation (Fig. 4).

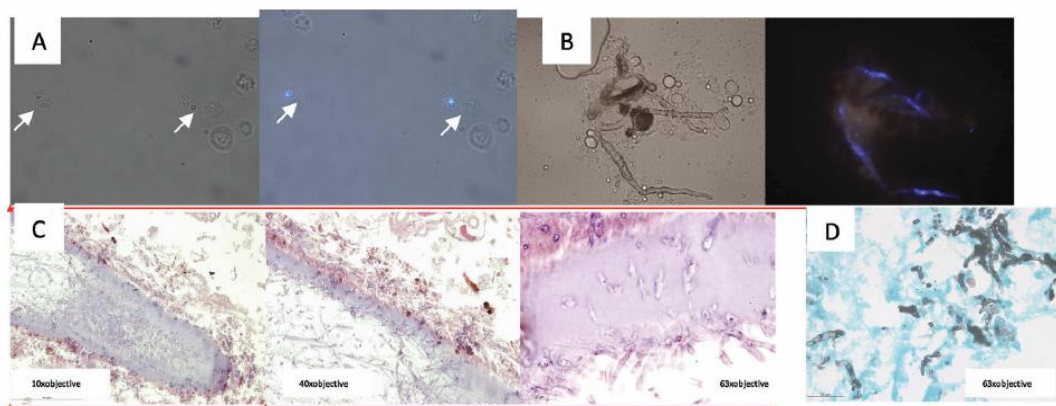
#### Hemocyte density after *A. conidia* injection

The magnitude of larval immune response to *Aspergillus* infection was also quantified for all strains. Fluctuations in hemocyte numbers have been shown to occur following infections with a range of microorganisms. At an early time point (4 h post infection), the number of hemocytes increased in the infected larvae (mutants and wild type) compared with those that were untouched (Fig. 5), denoting an early response in the larva against invading microorganism. However, at later time points, these differences were not as

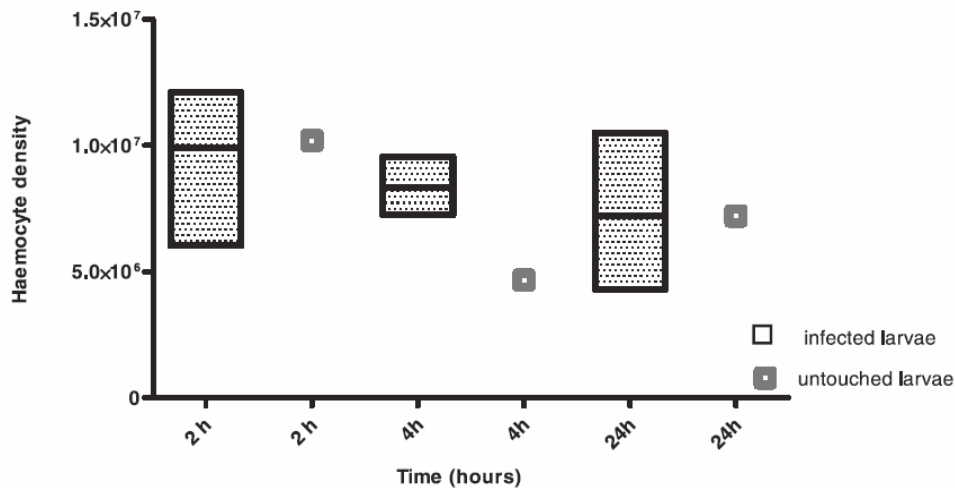
evident, probably because the infection had overcome the activated immune response. Of note, no statistically significant differences among mutants or wild-type-infected larvae on immune response (hemocyte count) were found at any of the time points evaluated.

#### Discussion

Although the molecular mechanisms of *A. fumigatus* azole resistance is well characterized (*cyp51A* point mutations), there are few measurements of the impacts these mechanisms have on pathogen fitness in different environments. The most commonly reported mechanism of azole resistance is modification of the target site encoded by the *cyp51A* gene, which leads to the impaired interaction between the azole and the target enzyme [20,21]. These modifications have been demonstrated to be advantageous in the presence of the drug since the mutants are able to grow while the wild type is not. Results presented here demonstrate that in the absence of antifungal exposure, *A. fumigatus* mutant strains (isogenic and clinical isolates) have a pattern of growth that is comparable to that of the wild type in a range of environments (solid media, liquid media, and *in vivo* mini host). Consequently, the acquisition of these particular resistance mechanisms does not appear to have an impact on growth or virulence. For CM-A8 strain, which lacks the target gene (*cyp51A*), virulence assessment in *G. mellonella* has been found to correlate closely with historic data generated using a neutropenic mice model. The mutant was morphologically indistinguishable from the wild-type strain and demonstrated an infection rate that was comparable to that in neutropenic mice [5]. Also, Mavridou et al. suggested that the virulence of *A. fumigatus* isolates with an azole-resistant phenotype due to mutations in the *cyp51A* gene was not diminished compared with



**Figure 4.** Light microscopy (A, left; B, left) and fluorescence examination (A, right; B, right) of homogenized larvae demonstrated the ability of *Aspergillus* spores to be engulfed (A) and proliferate (B) in the larvae. Histological sections demonstrating hyphal growth into the larvae: periodic acid-Schiff (C) and methenamine silver staining (D). This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.



**Figure 5.** Hemocyte fluctuation following infections with strains included in the study. A group of untouched larvae (not handled and incubated at the same temperature as infected larvae) was included as a comparator (data point represents average density from three experiments). All infected larvae were evaluated together (floating bars represent data from mutant and wild type from three independent experiments).

wild-type isolates [22] in a nonneutropenic murine model of disseminated aspergillosis. In contrast, other investigators have suggested that the acquisition of azole resistance in *A. fumigatus* may be associated with a significant change of virulence [9]. Concerning this controversy, Anderson et al. suggested that the fitness impact of a resistance mechanism could be attributed to several complex changes in gene expression that accompany single mutations. The totality of these changes may explain the contradictory results that have been published concerning this issue [1].

Our study includes a set of strains (isogenic isolates and wild-type and clinical strains) with different azole susceptibility profiles, providing a unique opportunity to investigate the impact of azole resistance on growth and virulence of *A. fumigatus*. In general, the acquisition of a specific resistance mechanism may result in an alteration of phenotypic characteristics such as germination rate, hyphal growth, or growth rate of the resistant isolates. These changes, in turn, may result in a significant loss of virulence. Relative to this particular point, our results demonstrated that all *A. fumigatus* strains, both wild type and mutant (isogenic strains and clinical isolates differing in their azole resistance mechanism and antifungal susceptibility pattern), had comparable *in vitro* growth profiles in different environments. Therefore, a common *in vivo* pathogenic pattern might be expected. Supporting these results are data from molecular epidemiology of *Aspergillus* azole resistance that show that this phenomenon evolved in infecting strains within the lung, confirming that the ability of mutant strains to cause infection is maintained even after resistance is developed [8].

On the other hand, the possibility of using insect models instead of mammalian models for *in vivo* pathogenicity

testing and screening offers a number of advantages. Invertebrates have highly efficient innate immune responses against an array of pathogens that are present in their natural environment. The *G. mellonella* model of invasive aspergillosis appears to be a useful tool for studying pathogenicity, especially because there appears to be a clear correlation with findings from mammals [23]. Conserved aspects of the innate immune response to microbial infection in insects and mammals may explain this correlation [24,25]. As a result of data presented here, the model is capable of showing either no virulence (heat-killed conidia) or equal virulence, as shown in wild-type and mutant strains. However, it is reasonable to think that the described experimental model is unable to predict reduced virulence since no strain with any kind of virulence defect was included throughout the experiments. Reports have shown the ability of a model like this to demonstrate difference in virulence. Slater et al. demonstrated that this model is also applicable when detecting differences in virulence in a wide range of *A. fumigatus* mutant strains [23].

Another point to consider is the experimental conditions selected for our study (37°C of incubation); we attempted to reproduce conditions that naturally exist during human infections, with the intention of bridging the results to the latter hosts. Therefore, other conditions were not considered in this particular work, although experimental temperature has been found critical in defining the pathogenic potential of several fungi [26–28]. In addition, an impairment of the immune response of the larvae at physiological temperatures have been suggested [29]. Concerning results found in the present study, the use of alternative experimental conditions may not have had a serious impact on the final results, since both *in vitro* and

*in vivo* data strongly suggest comparable behavior among strains.

In other terms, measuring changes in hemocyte density and fungal load have provided useful information on the immune response of the invertebrate to *Aspergillus* spp. [30]. The number of hemocytes appears to be a marker of the extent of the response of *G. mellonella* to fungal infections. The initial increase in the hemocyte number (compared with untouched larva) may be the result of an early response to the invading microorganism. The subsequent decline in the number of hemocytes (observed in all infected larvae) may be associated with the ability of the fungus to evade hemocyte neutralization and thus proliferate and cause larval death, as has been demonstrated by means of the fungal burden quantification (specific RT-PCR). These results have been described previously, since pathogenic isolates overcome immune response leading to a decline in hemocyte numbers and an increase in fungal cells in the hemolymph [30].

Our results suggest that acquisition of these particular azole-resistance mechanisms in *A. fumigatus* does not appear to have any impact in terms of virulence. The results also highlight the fact that insects may provide valuable early insights into virulence and pathogenicity and, in particular, may contribute to the generation of hypotheses that can be further tested in refined experiments in mammalian models.

### Funding

This study was financed by the Research Project from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS\_ISCIII (exp number PI09/0624).

A.F. is funded by a fellowship from Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (MAEC-AECID, Convocatoria 2011–2012, 0000557290). E.C.B. is funded by a fellowship from Instituto de Salud Carlos III (AFTDOC 11/02). E.M. was supported by the European Science Foundation: Fuminomics 06-RNP-132 and the Research Projects from the Spanish Ministry of Science and Innovation: SAF2008–04143 and ERA-NET Pathogenomics (7th FP), BFU2008–04709-E/BMC.

### Acknowledgments

This work was presented, in part, at the 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (abstract number R2273), 7 May–10 May 2011, Milan, Italy. (<http://www.eccmid-icc2011.org/>).

### Declaration of interest

In the past 5 years, M.C.E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, MSD, Pfizer, Schering Plough,

Soria Melguizo SA, European Union, the ALBAN Program, Spanish Agency for International Cooperation, Spanish Ministry of Culture and Education, Spanish Health Research Fund, Instituto de Salud Carlos III, Ramon Areces Foundation, and the Mutua Madrileña Foundation. M.C.E. has also been an advisor/consultant to the Pan-American Health Organization, Gilead Sciences, MSD, Pfizer, and Schering Plough and has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, MSD, Pfizer, and Schering Plough. S.J.H. has received research grants from Astellas; support grants from Gilead, Pfizer, and the Fungal Research Trust; travel grants from Astellas and Schering-Plough; equipment grants from the Fungal Research Trust; and has been paid for talks on behalf of Pfizer and Astellas. W.H. has received research support and acted as a consultant for Astellas, Pfizer, Gilead, Merck, and F2G. S.H. has received research grants from Astellas; support grants from Gilead, Pfizer, and the Fungal Research Trust; travel grants from Astellas and Schering-Plough; equipment grants from the Fungal Research Trust; and has been paid for talks on behalf of Pfizer and Astellas. Other authors report no conflicts.

### References

1. Anderson JB. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 547–556.
2. Chen J, Li H, Li R, Bu D, Wan Z. Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 31–37.
3. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1120–1124.
4. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance *in vitro* to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2747–2750.
5. Mellado E, Garcia-Effron G, Buitrago MJ et al. Targeted gene disruption of the 14- $\alpha$  sterol demethylase (*cyp51A*) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2536–2538.
6. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring *in vitro* cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1897–1904.
7. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1481–1483.
8. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1068–1076.
9. Arendrup MC, Mavridou E, Mortensen KL et al. Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS One* 2010; 5: e10080.
10. Clemons KV, Stevens DA. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Med Mycol* 2005; 43 (Suppl 1): S101–S110.

11. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28: 101–112.
12. Salzet M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol* 2001; 22: 285–288.
13. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34: 153–157.
14. Mylonakis E, Aballay A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infect Immun* 2005; 73: 3833–3841.
15. Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia* 2008; 165: 1–3.
16. Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 2004; 158: 73–79.
17. Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. *Mycopathologia* 2006; 161: 377–384.
18. Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arikian S et al. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. 2008. Available at [http://www.eucast.org/antifungal\\_susceptibility\\_testing\\_afst](http://www.eucast.org/antifungal_susceptibility_testing_afst).
19. Meletiadi J, te Dorsthorst DT, Verweij PE. Use of turbidimetric growth curves for early determination of antifungal drug resistance of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4718–4725.
20. Bowyer P, Moore CB, Rautema R, Denning DW, Richardson MD. Azole antifungal resistance today: focus on *Aspergillus*. *Curr Infect Dis Rep* 2011; 13: 485–491.
21. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C et al. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4545–4549.
22. Mavridou E, Bruggemann RJ, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the cyp51A gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 860–865.
23. Slater JL, Gregson L, Denning DW, Warn PA. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Med Mycol* 2011; 49 (Suppl 1): S107–S113.
24. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 588–593.
25. Wittwer D, Franchini A, Ottaviani E, Wiesner A. Presence of IL-1- and TNF-like molecules in *Galleria mellonella* (Lepidoptera) haemocytes and in an insect cell line *Fromestigmene acraea* (Lepidoptera). *Cytokine* 1999; 11: 637–642.
26. Garcia-Rodas R, Casadevall A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One* 2011; 6: e24485.
27. Garcia-Solache MA, Izquierdo-Garcia D, Smith C, Bergman A, Casadevall A. Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features. *MBio* 2013; 4: e00100–e00113.
28. Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martinez L et al. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol* 2013; 51: 461–472.
29. Ratcliffe NA. Invertebrate immunity—a primer for the non-specialist. *Immunol Lett* 1985; 10: 253–270.
30. Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect* 2003; 5: 1389–1395.

**Artículo original: “In vivo efficacy of voriconazole and posaconazole therapy in a novel invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection”.**

International Journal of Antimicrobial Agents **2015** Aug 17. pii: S0924-8579(15)00275-7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.07.007. [Epub ahead of print]

**Objetivos:**

- 1.- Investigar como alternativa experimental un modelo invertebrado en larvas de *Galleria mellonella* para comprobar la eficacia *in vivo* de voriconazol y posaconazol en cepas con diferente sensibilidad antifúngica de *Aspergillus fumigatus*.
2. - Análisis de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos obtenidos y su utilidad para la predicción de la respuesta antifúngica.
- 3.- Demostrar la utilidad en la correlación *in vitro*- *in vivo* de cepas resistentes a los azoles.

**Conclusiones:**

- 1.- La administración de los dos azoles mejoraban la supervivencia de las larvas infectadas con las cepas susceptibles, mostrando voriconazol mayor eficacia que posaconazol.
- 2.- Las larvas infectadas con las cepas resistentes no respondieron al tratamiento.
- 3.- Se producía un aumento en la supervivencia de las larvas cuando se asociaban valores de  $AUC_{0-24}/MIC > 63$  y  $AUC_{0-24}/MIC > 477$  para voriconazol y posaconazol, respectivamente.
- 4.- El fenotipo observado *in vitro* se correlaciona bien con la eficacia observada *in vivo*. El parámetro farmacocinético/farmacodinámico predictor de éxito terapéutico ( $AUC_{0-24}/MIC$ ) evaluado en el modelo demuestra ser comparable al descrito en otros modelos de infección, lo que valida este *modelo alternativo* para predecir el perfil sensibilidad antifúngica y la resistencia de cepas de *Aspergillus fumigatus*.



## In vivo efficacy of voriconazole and posaconazole therapy in a novel invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection

A. Forastiero<sup>1</sup>, L. Bernal-Martínez, E. Mellado, E. Cendejas, A. Gomez-Lopez\*

Mycology Reference Laboratory, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda–Pozuelo km 2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 January 2015

Accepted 7 July 2015

#### Keywords:

Non-mammalian model  
*Aspergillus fumigatus* cyp51A mutants  
Azole exposure/efficacy  
*Galleria mellonella*

### ABSTRACT

The emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* is a clinically important issue in the management of invasive aspergillosis as it could limit therapeutic options. Accurate measurement of in vitro antifungal activity in terms of minimum inhibitory concentration (MIC) is considered of clinical relevance and often gives useful therapeutic information for physicians. However, the lack of in vitro–in vivo correlation is frequent and the observed in vitro phenotype does not always correlate with the in vivo response. In this regard, a wild-type strain and five *A. fumigatus* cyp51A mutated strains showing different azole susceptibility profiles were used to investigate whether the greater wax moth (*Galleria mellonella*) is an alternative model to assess the in vivo efficacy of voriconazole and posaconazole. Administration of both azoles improved the survival of larvae infected with susceptible strains. However, those larvae infected with resistant strains did not respond to treatment. The phenotype observed in vitro was found to correlate with the efficacy observed in vivo. Moreover, using this in vivo model, the pharmacodynamic target predicting therapeutic success ( $AUC_{0-24}/MIC$ ) was in the same range as previously described, allowing the use of the *G. mellonella* model to predict the azole susceptibility profile of *A. fumigatus* strains.

© 2015 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Aspergillus fumigatus* is an opportunistic fungus and is the most common cause of invasive fungal disease in severely immunocompromised patients, particularly in haematopoietic stem cell transplant recipients. The incidence of invasive aspergillosis (IA) is difficult to estimate and mainly depends on the patient's underlying disease, diagnostic tools and clinical procedures [1]. Management of these infections includes early treatment with an appropriate antifungal agent at a suitable therapeutic dosage. The introduction of voriconazole (VRC) as first-line therapy for all types of IA, and the use of posaconazole (PSC) as prophylaxis and as salvage therapy in refractory aspergillosis, have been shown to be effective in reducing the prevalence of this infection [2,3].

However, the extensive use of azole drugs in the management of fungal disease, along with environmental factors such as the use of azole fungicides in agriculture, has led to an increase in the isolation

of strains with elevated minimum inhibitory concentrations (MICs) to one or more clinically used azoles [4].

The emergence of azole resistance in *Aspergillus* spp. is a medically important problem in the management of IA as it limits therapeutic options [5]. Therefore, adequate measurement of in vitro antifungal activity in terms of MIC is considered of clinical relevance and often gives useful therapeutic information for physicians [5]. Nevertheless, the lack of in vitro–in vivo correlation is frequent and the observed in vitro phenotype does not always correlate with the in vivo response. However, several previously published case series, including both patients with azole-resistant chronic *Aspergillus* diseases and azole-resistant IA, have been associated with a high probability of treatment failure [6,7].

The correlation between in vitro and in vivo data using different experimental models of fungal infection has contributed to a better understanding of exposure–response relationships following antifungal treatment. In fact, they are accepted tools to evaluate whether clinical success is potentially limited by the susceptibility of the causative strain or whether it also depends on the drug exposure [5,8–12]. Murine models are still considered the gold standard to measure in vivo drug efficacy, however they have certain disadvantages such as the large number of animals required and the elevated cost, apart from the ethical issues involved in animal experimentation. To overcome these problems, alternative

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 822 3426; fax: +34 91 509 7966.

E-mail address: [aliciag@isci.es](mailto:aliciag@isci.es) (A. Gomez-Lopez).

<sup>1</sup> Present address: Laboratorio de Micología, Hospital Británico de Buenos Aires, Calle Perdriel 74, Ciudad Autónoma de Buenos Aires 1280, Argentina.

**Artículo original: “Exposure and response after prophylaxis with a high dose of posaconazole in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis”.**

**(en revisión de correcciones por la Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica)**

**Objetivos:**

- 1.-Establecer la validez de un modelo experimental de aspergilosis pulmonar en rata. Evaluación de la exposición al fármaco y la eficacia de la profilaxis utilizando dos cepas de *Aspergillus fumigatus* con perfiles de sensibilidad muy distintos.
- 2.- devaluación de la exposición a posaconazol en el animal tras un régimen de profilaxis.
- 3.- Se evaluó la respuesta mediante dos herramientas diagnósticas, una ya validada para el seguimiento del tratamiento como es el ELISA para la cuantificación del galactomanano en suero. La otra una PCR cuantitativa a tiempo real para determinación de DNA de *Aspergillus fumigatus* en tejido.

**Conclusiones:**

- 1.-No hubo diferencias en la exposición a posaconazol en ambos grupos de animales infectados con ambas cepas.
- 2.- Los niveles de galactomanano decrecieron en aquellos animales en profilaxis con posaconazol y que fueron infectados con la cepa salvaje. Por el contrario, los niveles de galactomanano en la cepa resistente aumentaron con el tiempo a pesar la profilaxis.
- 3.- En cuanto a las cargas fúngicas, se observó un aumento de estas en los animales infectados con la cepa resistente.
- 4.- Este modelo animal es válido para evaluar nuevas herramientas de seguimiento de tratamiento y de diagnóstico, así como para observar la eficacia de nuevos compuestos antifúngicos y establecer relaciones exposición-respuesta.

**Title: Galactomannan enzymoinmunoassay and quantitative Real Time PCR as tools to connect exposure and response in a rat model of aspergillosis after posaconazole prophylaxis.**

**Running title: Fungal biomarkers to assess posaconazole exposure- response relationship.**

**E. Cendejas-Bueno<sup>1,3</sup>, A. Forastiero<sup>1</sup>, I. Ruiz<sup>2</sup>, E. Mellado<sup>1</sup>, M.J. Buitrago <sup>1</sup>., J.Gavaldà<sup>2‡</sup> and A. Gomez-Lopez[\*]<sup>1‡</sup>.**

<sup>1</sup>Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain;

<sup>2</sup>Hospital Vall d´Hebrón. Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.

<sup>‡</sup> These authors have contributed equally to the development of the research.

**Keywords: steroid-immunosuppressed rat model, antifungal prophylaxis, galactomannan, fungal burden.**

**[\*] Corresponding author. Mailing address: [aliciagl@isciii.es](mailto:aliciagl@isciii.es)**

**Ctra Majadahonda-Pozuelo Km 2. 28220 Majadahonda [Madrid], Spain.**

**Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III,**

**Phone: + 34-91-8223661. Fax: + 34-91-5097966. E-mail: [aliciagl@isciii.es](mailto:aliciagl@isciii.es)**

## Abstract

We used a steroid-immunosuppressed rat model of invasive pulmonary aspergillosis to explore the utility of galactomannan enzyme immunoassay (GM) and quantitative real time PCR (RT-PCR) to evaluate the association between response and exposure after a high dose of prophylactic posaconazole. Two different strains of *Aspergillus fumigatus* with different *in vitro* posaconazole susceptibility were used. Results demonstrated similar posaconazole exposure for all treated animals. However, response to posaconazole relied on *in vitro* susceptibility of infecting strain. After prophylaxis, galactomannan index and fungal burden decreased only in those animals infected with the most susceptible strain. This study demonstrated that both biomarkers may be useful tools for predicting efficacy of antifungal compounds in prophylaxis.

## Resumen

Se evaluaron en un modelo de aspergilosis pulmonar invasiva en rata inmunodeprimida la utilidad del galactomanano sérico y de la PCR cuantitativa a tiempo real y su relación con la respuesta y la exposición después de altas dosis profilácticas de posaconazol. Para ello diferentes grupos de animales se infectaron con una cepa sensible *in vitro* y otra resistente de *Aspergillus fumigatus*. Después de la profilaxis, el índice de galactomanano y la carga fúngica disminuyó en aquellos animales infectados con la cepa sensible. Los resultados mostraron similar exposición en todos los animales tratados, sin embargo la respuesta a posaconazol, medida como aumento de la carga fúngica y el índice de galactomanano, fue peor en aquellos infectados con la cepa resistente. Este estudio demuestra la utilidad de ambos biomarcadores en la evaluación de la respuesta a antifúngicos.

## Introduction

Invasive aspergillosis (IA) remains a leading cause of infectious disease related to deaths in patients with hematologic malignancies and undergoing hematopoietic stem cell transplantation despite advances in diagnostic tools and treatment options<sup>1</sup>.

Early diagnosis is critical for rapid treatment, but the lack of sensitive and specific clinical symptoms and radiological patterns is a hindrance. Traditional histopathological examination and fungal culture rely on invasive procedures, are relatively insensitive, and are not commonly used in clinical diagnosis owing to the challenges of sampling pulmonary fluids or tissues from critically ill patients<sup>2</sup>. As a consequence of this, the high morbidity and mortality still related to fungal infection has made the use of prophylaxis, or empiric treatment regimens, the main alternative for clinicians to better manage these patients.

Several antifungal drugs have been used for both regimens in recent years, basically conditioned by epidemiological reasons and availability of individual compounds, as well as cost, efficacy, drug-drug interaction and resistance prevalence<sup>3</sup>. Before the incorporation of posaconazole to the antifungal therapeutic arsenal, itraconazole and fluconazole had been most frequently used to prevent fungal infections in at-risk populations<sup>4</sup>. Itraconazole was associated with a lower incidence of invasive fungal infections in heart transplants, and fluconazole demonstrated efficacy in the prevention of invasive candidiasis<sup>3,5</sup>.

Posaconazole (PSC) is a broad-spectrum triazole with activity against many filamentous fungal pathogens, including mucorales. In the last few years, some reported cases confirmed the efficacy of posaconazole prophylaxis in clinical settings<sup>6-8</sup>. The recommended dosage for prophylaxis is 600 mg or 8.6 mg/Kg per day (200 mg three times per day, t.i.d.). As with voriconazole and itraconazole, pharmacokinetic studies indicate marked interpatient variability in both healthy volunteers and patient populations<sup>6</sup>, especially for digestive diseases (mucositis and diarrhea), resulting in lower posaconazole serum concentrations and loss of efficacy<sup>9</sup>. In the context of antifungal prophylaxis, exposure-response relationships need to be clarified, although in the particular case of posaconazole, several studies facilitate the assessment of a relationship between blood concentration (exposure) and prophylactic regimen efficacy (response)<sup>10</sup>.

Since the 1930s, experimental models of infection have allowed the *in vivo* evaluation of antimicrobial agents for the treatment of experimentally induced infection. In this context, experimental models of fungal infection have contributed to better explain exposure-response relationships after antifungal treatment, making them useful tools to evaluate whether clinical success is potentially limited to exposure to the drug or dependent on the susceptibility of the causative strain. Regarding posaconazole exposure and fungal infection, very little data has been

published until now<sup>10-15</sup>. In our case, we used a steroid-immunosuppressed rat model of invasive pulmonary aspergillosis to connect exposure and efficacy of posaconazole in a prophylaxis regimen. For this purpose, two different strains of *Aspergillus fumigatus*, differing in posaconazole *in vitro* susceptibility, were included. The evolution of infection and the effectiveness of prophylaxis were evaluated using two different methodologies, detection of fungal DNA by quantitative real-time PCR (RT-PCR) in conjunction with measurement of galactomannan antigen (GM). Serum levels of posaconazole were also determined and compared.

**This work was presented in part at 23<sup>rd</sup>ECCMID: [E. Cendejas-Bueno et al.] Exposure-response relationship after prophylaxis with posaconazole in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis. Abstract number P1085 in the 23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 27-30April 2013.**

## **Materials and methods.**

**Isolates.** Two *Aspergillus fumigatus* clinical strains differing in posaconazole susceptibility were used in this work. Susceptibility testing was performed based on the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)<sup>16</sup>. They included a posaconazole susceptible strain (CNM CM-237, MIC<sub>PSC</sub>=0.12 mg/L; wild type *cyp51A* gene) and a clinical strain (CNM CM-2266), isolated from the sputum of a patient with aspergillosis, that showed a point mutation in the target *cyp51A* gene (MIC<sub>PSC</sub>≥8 mg/L; G54W)<sup>17</sup>.

**Animals and infection.** The study was carried out on an animal model of invasive pulmonary aspergillosis, described previously<sup>18</sup>. All animal research procedures were approved by the Ethics Committee of Animal Research of the Vall D'Hebron Hospital (exp. Number PI081206). Briefly, animals were immunosuppressed with subcutaneous cortisone acetate 125 mg/kg (Sigma, St Louis, MO, USA) three times/week, starting 14 days before the fungal challenge and continuing to the end of the experiment. To avoid bacterial superinfection during immunosuppression, rats were given colistine 2500 IU/mL in drinking water and cefepime 150 mg/kg twice-daily subcutaneously. After six doses of steroids (day 0), a fresh conidial suspension was prepared from a subculture of the *A. fumigatus* strain grown in Saboraud Dextrose Agar (SDA) plates. Conidia were harvested with a sterile pipette by flooding the plates with sterile saline containing Tween-20 0.025% v/v. The resulting suspension was washed in sterile phosphate-buffered saline, counted in a haemocytometer, and adjusted in sterile saline to a final concentration of 8 x10<sup>6</sup> conidia /mL. Serial ten-fold dilutions were plated on SDA plates

for assessment of purity, size and viability of the inoculum<sup>18</sup>. At least 95% of conidia in the inoculum were viable as assessed by colony counts. Rats were then anesthetized with a combination of ketamine and xylazine (ketamine 100 mg/kg plus xylazine 10 mg/kg, intramuscularly). Three hundred microliters of the prepared inoculum (2 to 3 x 10<sup>6</sup> conidia) were then administered to each animal via tracheotomy.

**Posaconazole dosage.** Posaconazole (Noxafil 40 mg/ml, Merck Sharp & Dohme, Spain) was administered orally by gavage. Lower posaconazole efficacy has been detected in those isolates harboring *cyp51A* substitutions<sup>19</sup>. This loss of efficacy was completely or partly compensated for by increasing the posaconazole dose. A high dose was then chosen to evaluate its efficacy against mutant strains.

A prophylactic dose of 24 mg/kg (three times higher than recommended dosage for humans, 600mg/day-8.6 mg/kg day) was initiated by oral gavage beginning 3 days prior to inoculation (-3) and was subsequently administered at -2, -1, 0, 1, 2 and 3 days postchallenge (seven doses). The dose was administered once daily. Two control groups (including 6 untreated but infected rats) for both strains were included. Seven other groups of three treated and infected rats were sacrificed at prefixed time points (2, 6, 8, 24 hours after the fourth dose, coinciding with the challenge day; and 2, 6 and 8 h after the seventh dose, three days post-challenge).

**Posaconazole serum concentration:** Serum samples were prepared for chromatographic analysis by the addition of 2.4 µl of an extraction standard (ravuconazole, final concentration 2 mg/L) in 77.6 µl of rat serum sample. After mixing, 160 µl of acetonitrile (1:3 v/v) were added and the final mixture was vortexed at maximum speed for 30 seconds followed by centrifugation (13800×g, 25°C, 15 min). The supernatant was then filtered through 4 mm PTFE 0.45 µm filters (Waters Corporation, Massachusetts, USA) and transferred to glass vial to be directly injected into the HPLC instrument. The method was cross validated in all matrices studied prior to sample analysis. Within each analytical run, a blank sample, a zero sample (sample with extraction standard at 2 mg/L) and a control sample (sample with extraction standard and posaconazole at 2 mg/L) were analyzed. Rat serum samples used for these run controls were obtained from infected but untreated animals. Total posaconazole serum concentrations were measured using a validated high-performance liquid chromatographic method (HPLC-PDA)<sup>20</sup>. Some modifications from the original method were performed (70:30 acetonitrile/water instead of 60:40). A partial validation was made, including new linearity, accuracy and precision studies (data not shown). Posaconazole concentrations were expressed in mg/L. Data were processed using Empower Software (version 2.0, Waters Corporation, Massachusetts, USA). Several Pharmacokinetic parameters were evaluated and compared: the Area Under the concentration-time Curves from time zero (0 h) to 24 h (AUC<sub>0-24</sub>) and to the time of the endpoint (AUC<sub>0-80</sub>); maximum serum concentration of the antifungal agent

( $C_{max}$ ); and time to  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ). All calculations were performed with Microsoft (MS) Excel® spreadsheet, using the PK solver add-in program, which has demonstrated equivalence calculating PK/PD parameters compared to others specific pharmacokinetic programs<sup>21</sup>.

**Estimation of fungal progression.** At pre-determined time points (see below) blood samples were obtained and rats were humanely sacrificed, and immediately dissected. Lungs were aseptically removed, weighed, and separated serum and lungs were frozen until processed.

Representative samples (lungs and serum) were collected after the fourth (2 and 24 hours post challenge) and seventh doses (8 hours, corresponding to the end of the experiment). To assess the evolution of *Aspergillus* infection and the effectiveness of prophylaxis, two different methodologies were performed.

**RT-PCR assay:** Fungal DNA was extracted from the lung homogenates using the Qiaamp DNA mini kit (Qiagen, Izasa, Madrid, Spain), following manufacturer instructions. The description, development and validation of the RT-PCR assay were described previously with slight modifications. Briefly, a PCR assay was designed to detect *Aspergillus fumigatus* strains by using specific molecular beacon probes labeled with a fluorescent dye (FAM) and directed to the ITS1 region of ribosomal DNA<sup>22, 23</sup>. Results were expressed as pg/gr of tissue.

**Galactomannan quantification.** Platelia *Aspergillus* Galactomannan enzyme immunoassay (GM EIA, BioRad) was used to quantify galactomannan index in serum samples in accordance with manufacturer instructions. Index higher than 0.5 was determined to be positive.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test (Graph Pad Software v 5.0, Inc., San Diego, CA). Statistical significance was defined by a P value of  $\leq 0.05$ .

## Results

**Antifungal prophylaxis.** Posaconazole exposure, expressed as  $AUC_{0-24h}$  after the fourth dose, remained similar in all treated animals regardless of infecting strains (82 vs. 74 mg.h/L for CM-2266 and CM-237 respectively, table1). In addition  $C_{max}$  (5.56 mg/L vs. 4.79 mg/L), average concentration (3.76 mg/L vs. 3.85 mg/L) values were similar in both groups.  $T_{max}$  was 6h in both groups of animals (6h after the 4<sup>th</sup> dose and 6 h after the 7<sup>th</sup> dose). Slightly higher serum concentrations were observed after the 7<sup>th</sup> dose of posaconazole (PSC average 4<sup>th</sup> dose, 3.66 mg/L, PSC avg 7<sup>th</sup> dose, 3.99 mg/L).  $AUC_{0-80h}$  also remained equal in both groups (269 vs. 266

mg.h/L for CM-2266 and CM-237 , table1).The AUC for each strain was used to calculate the  $AUC_{0-24}/MIC$  which resulted in 5.13 for CM-2266 strain and 1235.16 for CM-237 strain.  $AUC_{0-80}/MIC$  ratio was also calculated, resulting 16.86 for CM-2266 strain and 4437.50 for CM-237 strain.

**Tissue fungal burden and galactomannan index.** Fungal DNA was detected in all lung samples evaluated (table 1 and figure 1b).Differences in fungal burden were observed between groups of animals.

Fungal burden tissue in treated rats infected with the susceptible strain (CM-237) decreased from 1.70 pg/gr to 0.45 pg/gr of lung tissue ( $P$  value 0.100). This lack of progression of infection was also indirectly demonstrated by galactomannan index comparison (Figure 1b). This biomarker remained constant and negative (below 0.51) in these groups of animals.

Regarding treated but infected animals with less susceptible strain (CM-2266), tissue fungal burden showed a progressive increase from 5.87 pg/gr to 20.00pg/gr of lung tissue. This progression of infection was also demonstrated by galactomannan index (Figure 1b) which increase from 0.46 to 6.96 at the end of the experiment.

Fungal burden and GM values detected in treated animals infected with less susceptible strain were numerically higher than in those infected with susceptible strain throughout the period of study (average 20.00vs0.45 pg/gr and 6.96 vs. 0.34). These differences were not statistically significant ( $P>0.05$ ), probably due to the low number of samples evaluated and the variability of reported data.

In the untreated control group, a higher index of galactomannan was observed at the first sampling time (2h post challenge, 4.39 and 6.60) compared to treated animals (0.46 and 0.51 at the same time point),suggesting a rapid release of antigens from fungal cells in the untreated animals (table1), as has been described for human patients<sup>24,25</sup>.

## Discussion

Animal model research has proven to be useful for designing optimal regimens and defining susceptibility or resistance in the context of antimicrobial treatment. For the particular case of filamentous fungi and posaconazole results from recent studies demonstrated that  $AUC_{0-24}/MIC$  ratio provided a useful measure of exposure-response relationship. More posaconazole exposure was suggested for efficacy against organisms with reduced *in-vitro* susceptibility. Although the strength of such a relationship has not been well elucidated yet, an  $AUC_{0-24}/MIC$  ratio ranging from 167 to 178 was estimated recently as predictive of success associated with half-maximal efficacy or higher<sup>19, 26, 27</sup>.

In this study, a prophylactic dose of posaconazole showed potent *in vivo* antifungal activity against susceptible *Aspergillus fumigatus* strains (MIC<0.125mg/L) for which the AUC<sub>0-24</sub>/MIC was calculated to be 1235.16. Efficacy was demonstrated by decreasing fungal burden (76% reduction, from 1.70 to 0.45 pg/gr) and also GM index (34% reduction, from 0.51 to 0.34). Of note, in those animals infected with the “susceptible strain”, posaconazole blood concentration (average= 3.76 mg/L) was more than optimal as it was above the amount required for growth inhibition. The effect of such a drug environment could explain the negative results achieved for the two biomarkers. Several studies highlighted the ability of posaconazole to suppress serum galactomannan expression<sup>28,29</sup>. Concentrations of the GM antigen and DNA have been reported to be affected by antifungal drugs that are active against molds, probably because of the failure of the fungal cells to grow and in consequence to release antigen into blood<sup>30</sup>, confirming the treatment effect. The values of both biomarkers found in the group of rats infected with the susceptible strain and treated suggest the absence of infection progression. Therefore, they may be valid indicators of efficacy as no standard measure that best predicts the outcome has been defined yet. Of note, posaconazole concentration average was also higher than the MIC value of most of the *A. fumigatus* strains (PSC MIC<sub>90</sub>= 0.125mg/L), and the PK/PD index (AUC/MIC ratio) associated with efficacy was in the range of previous studies<sup>19</sup>. However, posaconazole showed poor prophylaxis efficacy with less susceptible strains of *A. fumigatus* (AUC<sub>0-24</sub>/MIC ratio=5.13).

Additionally, a new pharmacodynamics index AUC<sub>0-80</sub>/MIC, was calculated in the study, and showed great differences between susceptible and resistant strains (AUC<sub>0-80</sub>/MIC=4437.5 vs AUC<sub>0-80</sub>/MIC=16.86), demonstrating that PSC MICs affected exposure-response relationships. Those strains with higher MICs required higher exposure (AUC<sub>0-24</sub> or AUC<sub>0-80</sub>) to achieve any effect.

One of the main challenges to evaluate drug effect is the way to assess progression of infection. Diagnostic tests such as galactomannan enzyme immunoassay and PCR, have been widely employed to assess infection progression. As previously published, these two biomarkers increase significantly during progression of infection<sup>31</sup>, and combined have even better diagnostic applicability.

Our results showed a clear progression of infection in those groups of treated animals infected with the less susceptible strain compared to those animals infected with the susceptible *Aspergillus* strain. Bearing this data in mind, our study supports those previously described for other resistant molds<sup>14, 15</sup>.

As shown in this study, quantification of fungal burden by RT-PCR and GM-EIA are both valid strategies for evaluating the progression of infection and the effectiveness of prophylaxis. Nevertheless, the lack of validated methods for PCR could raise doubts about the validity of this

technique for evaluating the prophylaxis and treatment efficacy in animal models. GM-EIA assessment in serum remains the most practical and valuable method in the clinical setting and the obtained results certify that GM-EIA is a valid and reliable technique for evaluating efficacy of posaconazole prophylaxis in animal models, although because of its high cost we can consider their use only in some specific cases, as was previously published<sup>13, 31</sup>. A combination of both biomarkers has been considered a good alternative for a better monitoring of fungal infection.

A drawback of this experiment was the limited number of animals used per time point and the evaluation of only one time matched point in non-treated controls. Worth of mention is the limited number of *Aspergillus fumigatus* evaluated and the lack of isolates with other cyp51A mutations different from the G54. Further studies are warranted including more strains differing in PSC susceptibility profile. Nevertheless, the results obtained by both methodologies confirmed the efficacy of the prophylactic regimen in animals infected with the susceptible strain and the failure in those infected with the resistant strain. These results also corroborate the utility of this experimental model to evaluate novel diagnostic tools such as biomarkers to assess efficacy of antifungal compounds and exposure-response relationships.

## Transparency declarations

None of the authors declare conflicts.

## Reference List

1. Herbrecht R, Caillot D, Cordonnier C, et al. Indications and outcomes of antifungal therapy in French patients with haematological conditions or recipients of haematopoietic stem cell transplantation. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2731-8.
2. Lin JC, Xing YL, Xu WM, et al. Evaluation of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in a rat model. *J Microbiol Biotechnol* 2014; **24**: 1044-50.
3. Ruiz-Camps I, Aguado JM, Almirante B, et al. [Recommendations of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) on the prevention of

invasive fungal infection due to filamentous fungi]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; **28**: 172.

4. Lass-Flörl C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs* 2011; **71**: 2405-19.
5. Koh LP, Kurup A, Goh YT, et al. Randomized trial of fluconazole versus low-dose amphotericin B in prophylaxis against fungal infections in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2002; **71**: 260-7.
6. Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 24-34.
7. Pagano L, Caira M. The role of primary antifungal prophylaxis in patients with haematological malignancies. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20 Suppl 6**: 19-26.
8. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007; **356**: 335-47.
9. Lebeaux D, Lanternier F, Elie C, et al. Therapeutic drug monitoring of posaconazole: a monocentric study with 54 adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 5224-9.
10. Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 2011; **86**: 805-17.
11. Barchiesi F, Spreghini E, Santinelli A, et al. Posaconazole prophylaxis in experimental systemic zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 73-7.
12. Mavridou E, Bruggemann RJ, Melchers WJ, et al. Impact of cyp51A mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4758-64.
13. Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, et al. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 857-69.
14. Rodriguez MM, Pastor FJ, Sutton DA, et al. Correlation between in vitro activity of posaconazole and in vivo efficacy against *Rhizopus oryzae* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1665-9.
15. Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, et al. Efficacy of posaconazole as treatment and prophylaxis against *Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1055-9.
16. Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Arendrup MC, et al. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 982-4.

17. Gomez-Lopez A, Forastiero A, Cendejas-Bueno E, et al. An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: the role of azole resistance. *Med Mycol* 2014; **52**: 311-9.
18. Gavalda J, Martin T, Lopez P, et al. Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 999-1004.
19. Mavridou E, Bruggemann RJ, Melchers WJ, et al. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the cyp51A gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 860-5.
20. Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodriguez-Tudela JL, et al. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin Microbiol Infect* 2011.
21. Zhang Y, Huo M, Zhou J, et al. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* 2010; **99**: 306-14.
22. Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, et al. Performance of panfungal--and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 1737-40.
23. Cuenca-Estrella M, Meije Y, Diaz-Pedroche C, et al. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 379-84.
24. Hoenigl M, Seeber K, Koidl C, et al. Sensitivity of galactomannan enzyme immunoassay for diagnosing breakthrough invasive aspergillosis under antifungal prophylaxis and empirical therapy. *Mycoses* 2013; **56**: 471-6.
25. Kargar M, Ahmadvand A, Ahmadvand M, et al. The prevalence of antifungal agents administration in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2013; **7**: 1-8.
26. Howard SJ, Lestner JM, Sharp A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of posaconazole for invasive pulmonary aspergillosis: clinical implications for antifungal therapy. *J Infect Dis* 2011; **203**: 1324-32.
27. Lepak AJ, Marchillo K, Vanhecker J, et al. Posaconazole pharmacodynamic target determination against wild-type and Cyp51 mutant isolates of *Aspergillus fumigatus* in an in vivo model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 579-85.
28. De Pauw BE, Donnelly JP. Prophylaxis and aspergillosis--has the principle been proven? *N Engl J Med* 2007; **356**: 409-11.

29. Racil Z, Kocmanova I, Toskova M, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis* 2011; **15**: e874-e881.
30. McCulloch E, Ramage G, Rajendran R, et al. Antifungal treatment affects the laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Pathol* 2012; **65**: 83-6.
31. Vallor AC, Kirkpatrick WR, Najvar LK, et al. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2593-8.

Table1: Comparison of diagnostic markers at selected time points.

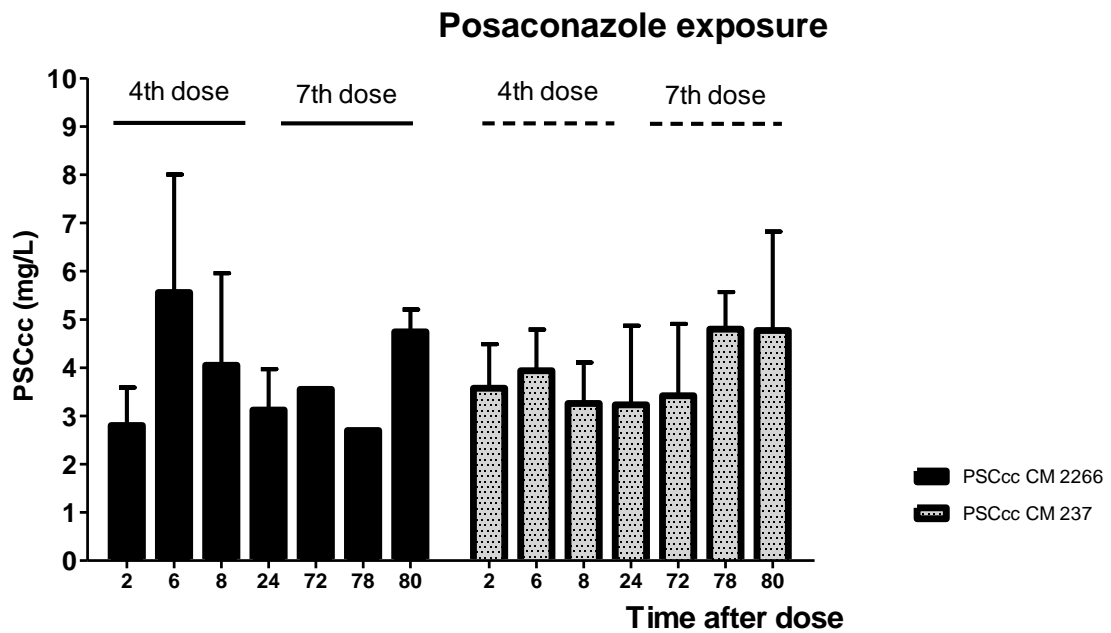
	Sampling time (hours after infection)	Posaconazole serum levels mg/L (average±SD)	RT-PCR fungal burden pg/gr (average±SD)	Galactomannan. (average±SD)	AUC <sub>0-24</sub> mg.h/L after 4 <sup>th</sup> dose	AUC <sub>0-80</sub> mg.h/L
<b>CM-2266 Treated</b>	2 h	2.80±0.75	5.86±1.22	0.46±0.05		
	6h	5.56±1.93	NE	NE		
	8h	3.84±1.39	NE	NE		
	24 h	3.16±0.95	6.67±4.06	6.80±0.01		
	74 h	3.55±0.27	NE	NE		
	78 h	2.70±0.29	NE	NE		
	80 h	4.74±0.49	20.00±19.21	6.96±0.08	82	269
<b>CM-2266 non Treated (Control)</b>	2h	NE	2.28±1.76	4.39±3.83		
<b>CM-237 Treated</b>	2 h	3.57±1.35	1.70±0.10	0.51±0.40		
	6 h	3.93±2.57	NE	NE		
	8 h	3.26±0.99	NE	NE		
	24 h	3.23±1.38	0.57±0.12	0.23±0.00		
	74 h	3.41±1.18	NE	NE		
	78 h	4.79±0.97	NE	NE		
	80 h	4.77±1.89	0.45±0.20	0.34±0.04	74	266
<b>CM-237 non Treated (Control)</b>	2h	NE	1.76±0.20	6.60±0.38		

SD: standard deviation; RT-PCR: real time quantitative PCR; h: time in hours. NE: not evaluated.

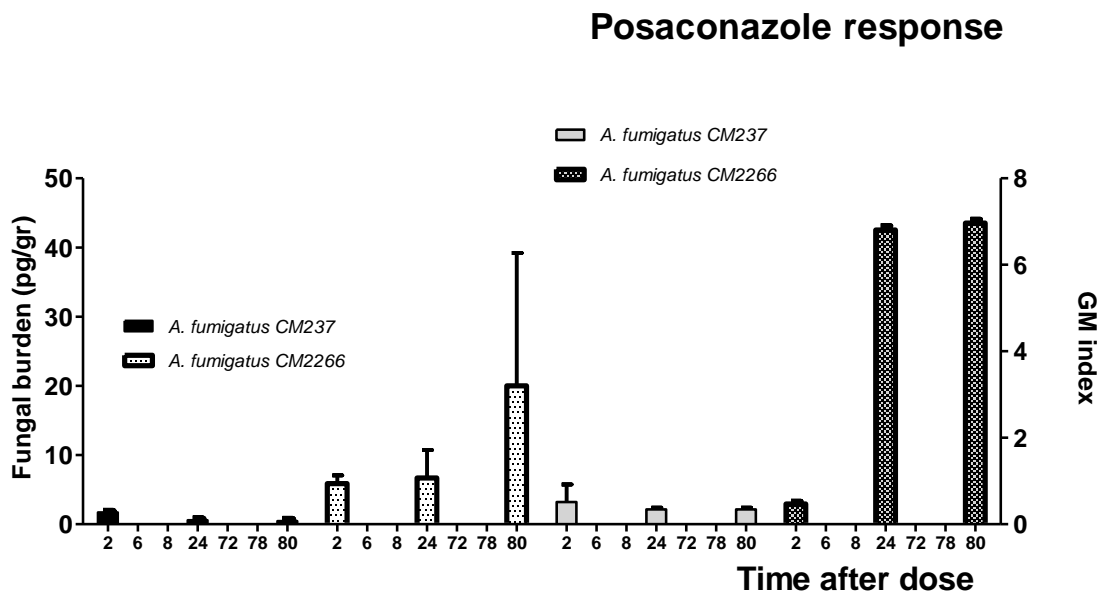
~: not applicable

Figure 1: Posaconazole exposure (1a) and response (1b) relationship measured by tissue fungal burden and by galactomannan index.

1a)



1b)



1a) PSCcc : average posaconazole concentration at fourth and seventh dose in rats infected with two *A. fumigatus* strains differing in PSC susceptibility, CNM CM-237, MIC<sub>PSC</sub>=0.125 mg/L and CNM CM-2266, MIC<sub>PSC</sub>≥8 mg/L 1b) F Burden (pg/g) and galactomannan index by infecting species.

**Artículo original: "Blood and tissue distribution of posaconazole in a rat model of Invasive Pulmonary Aspergillosis"**

(en revisión por la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*)

**Objetivos:**

- 1.- Recoger datos farmacocinéticos relacionados con la distribución de posaconazol en un modelo experimental de aspergillosis pulmonar invasiva. Para ello se evaluaron los datos farmacocinéticos después de una dosis única y después de dosis múltiples.
- 2.- Como objetivo secundario, se establece la validez de este modelo animal para el estudio de relaciones dosis-exposición-respuesta.

**Conclusiones:**

- 1.- Se calcularon parámetros farmacocinéticos que permiten verificar similitudes entre los parámetros farmacocinéticos calculados para modelos animales y el ser humano. Permite validar este modelo para realizar futuros trabajos y su transferencia al ser humano.
- 2.- Las altas concentraciones de posaconazol en pulmones, permiten inferir que el posaconazol se acumula en estos órganos más que en suero. Se acumula en grandes cantidades donde se establece la infección por *Aspergillus fumigatus*.
- 3.- Este modelo animal aumenta las alternativas para evaluar la farmacocinética y la farmacodinamia, y estos resultados podrían utilizarse para optimizar el tratamiento en seres humanos en infecciones causadas por cepas resistentes.

## **Blood and tissue distribution of posaconazole in a rat model of Invasive Pulmonary Aspergilosis**

**Running title: pharmacokinetic properties of Posaconazole in rats.**

**E. Cendejas-Bueno<sup>1,3</sup>, A. Forastiero<sup>1</sup>, I. Ruiz<sup>2</sup>, E. Mellado<sup>1</sup>, J. Gavaldà<sup>2</sup> and A. Gomez-Lopez [\*]<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain;

<sup>2</sup>Hospital Vall d'Hebrón. Barcelona, Spain;

<sup>3</sup>Clinical Microbiology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.

**Keywords: posaconazole exposure, *Aspergillus fumigatus*, tissue concentration.**

[\*] Corresponding author. Mailing address: [aliciagl@isciii.es](mailto:aliciagl@isciii.es)

**Ctra Majadahonda-Pozuelo Km 2. 28220 Majadahonda [Madrid], Spain.**

**Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III,**

**Phone: + 34-91-8223661. Fax: + 34-91-5097966. E-mail: [aliciagl@isciii.es](mailto:aliciagl@isciii.es)**

## **Abstract**

Posaconazole is the recommended drug for prophylaxis and treatment in patients at high risk for invasive fungal infection, since it appears to achieve adequate amount on target sites despite the relative low levels detected in blood. The objective of this study was to collect pharmacokinetic (PK) information related to blood and tissue distribution of posaconazole in a particular animal model of invasive pulmonary aspergillosis. Pharmacokinetic parameters described in lung samples were systematically higher than those described in serum. After multiple-dose administration of posaconazole a significant accumulation of the drug was evident in lung tissue. Pharmacokinetic behavior of posaconazole in this particular experimental model reflected human exposures, concluding that it might be a valid tool to evaluate posaconazole exposure-response relationship.

## 1.- Introduction

Invasive aspergillosis remains a major cause of morbidity and mortality, particularly among immunocompromised patients [1]. Management of these infections includes early treatment and administration of the appropriate antifungal agent and the adequate dosage.

Posaconazole is a new generation triazole antifungal agent with activity against a large number of medically important fungal pathogens, including *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Zygomycetes* and *Fusarium* spp [2]. Current marketed formulations of posaconazole include an oral suspension or recently pills, tablets and intravenous (iv) formulation [3-5]. This drug is indicated for its use in prophylaxis in high risk haematological neutropenic patients and in severe graft-versus-host disease [6;7], as well as for treatment of oropharyngeal candidiasis. The European Medicines Agency has also approved the use of posaconazole as salvage therapy in refractory aspergillosis and infections due to *Zygomycetes* [8;9]. The recommended dose for treatment of established infection is 800 mg/day, distributed in several doses to provide the best exposure. Two randomized clinical trials have shown posaconazole to be more efficacious than other systemic antifungals, and to have a safer profile in high-risk patients, both reporting a significant reduction in breakthrough invasive fungal infection [6;10;11].

Several characteristics make posaconazole to be superior compared to other available antifungal agents. Its pharmacokinetic profile is basically characterized by a strong influence of food on the absorption process and a minor metabolism by cytochrome P450 isoforms, also it has a long elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) and a large apparent volume of distribution after oral administration ( $V_d/F$ ) suggesting a prolonged and extensive tissue distribution. This profile has been broadly studied in animal models, in phase I, rising-single- and multiple-dose studies with healthy subjects over a broad range of doses [12;13]. In addition, dose-related increases in plasma concentrations have been demonstrated [14-17].

The knowledge of drug penetration into the tissues could assist in re-evaluating and designing specific dosing regimens to use against potential fungal pathogens. The importance of tissue concentration for antibacterial agents has been reviewed extensively, although poor attention has been paid to the currently available antifungal agents. Most data related to tissue distribution of antimycotics have been described in animal models of infection, although human data from case studies through autopsies and small clinical studies have also been detailed [18]. It is worth to mention that lipophilic drugs have been reported to concentrate to high levels within cells contributing to alter the initiation of infection. Different lipid formulations of nystatin and anidulafungin have demonstrated a good tissue distribution, showing higher concentrations in tissues than in plasma and higher efficacy. Also, a recently published study observed significant posaconazole accumulation in human biopsy specimens [19].

In general terms preclinical infection models have been successfully used to evaluate pharmacokinetic (PK) and also pharmacodynamic (PD) properties of antifungals. In fact, experimental PK/PD studies in humans have increasingly demonstrated to be predictive of therapeutic outcomes [20]. Partitioning of the antifungal to different compartments could assist in the understanding of its exposure and help to explain the mechanism that lead to the progression of fungal infection [21].

In this study, we aim to evaluate the pharmacokinetic (PK) behaviour of posaconazole in serum and tissue samples, using a murine model of aspergillosis, in order to estimate its usefulness to establish exposure-response relationships and help to provide a valid tool that allows the experimental findings to be bridged to humans.

## **2.- Material and methods**

**2.1.- Animals and infection.** The study was carried out in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis, described previously [22]. All animal research procedures were approved by the Ethics Committee of Animal Research of the Vall d'Hebron Hospital (exp. Number PI081206). Briefly, animals were immunosuppressed with subcutaneous cortisone acetate 125 mg / kg (Sigma, St Louis, MO, USA) three times/week, starting 14 days before the fungal challenge and continuing to the end of the experiment. To avoid bacterial superinfection during immunosuppression, rats were given colistin 2500 IU/mL in drinking water, and cefepime 150 mg/kg twice-daily subcutaneously. After six doses of steroids (day 0), rats were infected via a tracheotomy with 0.3 mL of a freshly prepared conidial suspension harvested from a subculture of the *Aspergillus fumigatus* strain (CNM-CM 237) grown on SDA plates. Procedure was performed under general anesthesia (ketamine 100 mg / kg plus xylazine 10 mg / kg, intramuscularly). Conidia were harvested with a sterile pipette by flooding the plates with sterile saline containing Tween-20 0.025% v/v. The resulting suspension was washed in sterile phosphate-buffered saline, counted in a haemocytometer, and adjusted in sterile saline to a final concentration of  $8 \times 10^6$  conidia/mL. Serial ten-fold dilutions were plated on to SDA plates for assessment of purity, size and viability of the inoculum. At least 95% of conidia in the inoculum were viable as assessed by colony counts.

### **2.2.- Pharmacokinetic study.**

Posaconazole (Noxafil 40 mg/ml, Merck Sharp & Dohme, Spain) was administered orally by gavage. Therapy was initiated 24 h post-challenge (Dose 1, D1) and was subsequently administered daily at 24 (D2), 48 (D3) and 72 h (D4) (four doses). Groups of rats (at least three rats per time point) received 8, 12, 24 and 64mg/kg. These dosages were chosen on the basis of

human therapeutic dose (800 mg per day results in a dose of about 12 mg/kg/day for a typical 70Kg individual). The end point of each experiment was 80 hours post first dose. At pre-determined time points (five time points at least after first and fourth dose), rats were humanely sacrificed, blood samples obtained by cardiac puncture after terminal anaesthesia with 5% isoflurane (Baxter), and immediately dissected after death. Lungs were aseptically removed, weighed and then, separated serum and lungs were frozen until processed.

Posaconazole concentrations in serum and tissue samples were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) method with ultraviolet (UV) detection. Details of the analytical assay are described elsewhere [23]. Some modifications were included (acetonitrile:water proportion for rat serum matrix was stabilised as 70:30 v/v). A partial validation was performed, including new linearity, accuracy and precision studies. Posaconazole concentrations were expressed in  $\mu\text{g/mL}$  for serum samples and in  $\mu\text{g/g}$  of tissue for lung homogenates.

### **2.3.- Samples preparation**

Serum samples were prepared for analysis by the addition of 2.4  $\mu\text{L}$  of ravuconazole as extraction standard (RVC, final concentration of 2  $\mu\text{g/mL}$ ;) in 77.6  $\mu\text{L}$  of rat serum sample and then mixed for about 1 min. Later, 160  $\mu\text{L}$  of acetonitrile (1:3 v/v) were added to the rat serum plus the extraction standard and the final mixture was then shaken for 30s on a Vortex Shaker at maximum speed followed by centrifugation at 13800 $\times$ g at 25°C for 15 min. The supernatant was then filtered through 4 mm PTFE 0.45  $\mu\text{m}$  filters (Waters Cromatografia, S.A., Cerdanyola del vallés, Spain) and transferred to glass vial to directly be injected into the HPLC instrument. The method was cross validated in all matrix studied prior to sample analysis. Within each analytical run, a blank sample, a zero sample (sample with extraction standard at 2 $\mu\text{g/mL}$  but not with posaconazole) and a control sample (sample with extraction standard and posaconazole at 2 $\mu\text{g/mL}$ ) were analyzed. Rat serum samples used for these run controls were obtained from infected but untreated animals.

Lung samples were processed for analysis as it is described below: 0.5 grams of lung tissue were weighed (mix of the right and the left lung). In sterile petri dish weighed pieces of lung were manually homogenized and then deposited in 25 ml tube containing 1 mL of sterile miliQ water. To facilitate the homogenization a spoon of glassbeads of 4 mm (Merk KGaA, Darmstadt, Germany) were added and the mix vortexed at high speed for 3-4 minutes. This step was repeated until complete 5 mL of homogenate. Finally, 77.6  $\mu\text{L}$  of homogenate were then processed as has been previously described for serum samples.

**2.4.- Pharmacokinetic evaluation.** Data were processed using Empower Software (version 2.0, Waters Cromatografia, S.A., Cerdanyola del Valles, Barcelona, Spain). Posaconazole

concentrations equal to or above the limit of quantitation were used for pharmacokinetic analysis using a noncompartmental model. All calculations were performed with Microsoft (MS) Excel<sup>®</sup> spreadsheet, using the PK solver add-in program, which has demonstrated equivalence calculating PK/PD parameters compared to others specific pharmacokinetic programs [24]. Plots were performed with GraphPad Prism 4, (Lajolla, CA, USA). The primary pharmacokinetic parameters evaluated were the area under the concentration-time curves from 0 to 24 h ( $AUC_{0-24}$ ), the AUC from 0 to the time of the endpoint ( $AUC_{0-80}$ ), maximum concentration,  $C_{max}$  and time to  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ). A regression analysis was conducted to determine the linearity between posaconazole exposure and doses. The goodness of fit was checked by use of the  $r^2$  value and visual inspection.

### **3.- Results**

#### **3.1.- Chromatographic method**

A partial method validation was performed. Linearity was assessed by linear regression (best fit obtained when plotting peak areas measured by HPLC against posaconazole concentration).

For both matrices (serum and lung tissue) the standard curve was linear over a concentration range of 0.125–16.0  $\mu\text{g/mL}$ , with a correlation coefficient of 0.99. The lower limit of quantification (LLOQ) and the limit of detection (LOD) were determined to be 0.125  $\mu\text{g/mL}$  and 0.06  $\mu\text{g/mL}$  respectively. In addition, the upper limit of quantification (ULOQ) was established as 16  $\mu\text{g/mL}$ . The between day precision and accuracy for the serum matrix was in a range between 5.86 and 1.36%, and -0.81 and 5.53% respectively. On the other hand, the between day precision and accuracy established in lung samples was between 7.19 and 1.80%, and -0.41 and 8.21%, respectively.

For both matrices, precision and accuracy data were all within acceptable limits established for bioanalytical method validation [25].

#### **3.2.- Pharmacokinetics in serum samples**

The time course of posaconazole serum concentration in infected animals following four daily doses of 8, 12, 24 and 64 mg/kg is shown in Figure 1. Pharmacokinetic parameters described in serum varied in a dose-dependent manner (Table 1).

After administration of a therapeutic dose (12 mg/kg once daily) the posaconazole exposure varied between 19.85 ( $AUC_{0-24}$ ) and 103.85 ( $AUC_{0-80}$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . Peak serum ( $C_{max}$ ) 0.98  $\mu\text{g/mL}$

was achieved after 8 hours of a single dose and increases up to 3.10 $\mu$ g/mL after the fourth dose. Minimum concentration  $C_{\min}$  ranged between 0.24 and 1.51 $\mu$ g/mL through the dosage interval (four days). In the multiple dose profile an evident increase of the drug exposure was detected after the last dose (Table 1). The accumulation ratio upon multiple doses appeared to decrease with highest one.

Higher doses of posaconazole showed higher PK parameters. Of note, both serum  $C_{\max}$  and  $AUC_{0-80}$  after the fourth dose increased in a linear fashion with dose escalation ( $C_{\max}=0.21 \times \text{Dose} + 1.3$ ;  $r^2=0.969$  and  $AUC_{0-80}=7.8 \times \text{Dose} + 68.3$ ;  $r^2=0.922$  respectively) as it is shown in Figure 2.

The time to peak concentration ( $T_{\max}$ ) was about 8 h, however, this time significantly increase (24h) after the administration of the highest dose (64 mg/kg/day).

### **3.3.- Pharmacokinetics in lung tissue**

As it is shown in Figure 1, posaconazole lung concentrations were higher than those in serum samples for all doses tested, suggesting accumulation in this tissue. Posaconazole exposure varied from 71.31 ( $AUC_{0-24}$ ) to 276.84 ( $AUC_{0-80}$ )  $\mu$ g $\cdot$ h/mL when a therapeutic dose was administered. A peak of lung tissue concentration ( $C_{\max}=7.33\mu$ g/mL) was detected after 3 h of this first therapeutic dose and lung  $C_{\min}$  changed from 2.37 to 5.63  $\mu$ g/mL through the dosage interval (four days), achieving concentration that encompass the  $MIC_{90}$  of most filamentous and yeast strains from the beginning of treatment [26;27]. Even when a subtherapeutic dose was administered (8 mg/Kg/day), lung  $C_{\min}$  (1.8-5.38 $\mu$ g/mL) was higher than the MIC values previously referred. After the fourth dose, the minimal concentration ranged from 5.38 to 10.50 $\mu$ g/mL. As much as the dose increased, this did not lead to proportional increase in evaluated PK parameters measured in lung tissues (Figure 2).

### **3.4.- Lung tissue and serum pharmacokinetic parameters relationships.**

Of note, pharmacokinetic parameters calculated in the model varied differently with increasing doses (Table 1). The  $AUC_{0-24}$  and  $AUC_{0-80}$  were always higher in lung tissue than in serum, which demonstrates lung accumulation of posaconazole and a higher exposure in this tissue. This effect was even observed after the first dose.

The rate of posaconazole tissue accumulation during multiple-dose therapy, representing the ratio between parameters ( $C_{\max}$ ,  $AUC_{0-80}$ ) achieved in lung and serum samples, varied in the model studied from 1.43 to 3.23.

Our results indicated that lung/serum ratio posaconazole exposure ( $AUC_{0-80}$ ) was higher at 8, 12, 24  $\mu\text{g/mL}$ . At higher dose 64  $\mu\text{g/mL}$ , the ratio decreased to 1.43 and 1.78 respectively.

#### 4.- Discussion

In the present study, we investigated the posaconazole distribution in an immunosuppressed rat model of invasive pulmonary aspergillosis receiving oral posaconazole therapy. Our results show that posaconazole exposure (expressed as posaconazole concentration in blood) was linear with respect to daily dosage, up to the highest dose tested in the model (64 mg/Kg/day), allowing the AUC to be estimated by linear extrapolation. Previous studies using similar models reported comparable results concerning posaconazole exposure after oral dosage [13;28-31]. Given that the pharmacokinetic profile of posaconazole in both humans and mice was demonstrated to be nearly linear, the model tested here could be an adequate tool for establishing posaconazole exposure details. In addition, we investigated posaconazole exposure into lung tissue, in order to understand differences between blood exposure and efficacy for this active azole. Understanding posaconazole penetration is critical for a proper appreciation of its efficacy in animals and also in humans. Concentration into tissues may differ from those detected in blood stream as it has been previously demonstrated for several antimicrobial agents. In many cases these differences are highly significant [18]. The results presented here suggest that posaconazole distributes well into lungs. However, few data have been reported regarding posaconazole exposure measured in sites different from blood. Several authors have reported intrapulmonary concentrations of posaconazole in a number of other respiratory fluids and cells such as epithelial lining fluids [32], alveolar macrophages , epithelial cells [33], peripheral blood mononuclear cells, polymorphonuclear leukocytes [34], bronchial secretions, sputum, pleural fluids or pulmonary lymph [18]. *Krishna et al.* also reported posaconazole levels in human skin following oral administration [35]. In most of these cases posaconazole exposure was several times higher than those measured in plasma. After distribution, posaconazole concentrates within the host cell membranes and rapidly transfers to fungal cells where it accumulates to high concentrations and persists, with alveolar cell/plasma ratios cells ranging from 27.3 to 44.3 [34]. Our results indicated that lung tissue posaconazole exposure was high and also increased in a dose-related manner. However, the increase was less than dose proportional, ranging between 1.43 and 3.53 of that in serum, achieving higher exposure in this tissue. The increase was less evident when the highest dose was administered, suggesting the beginning of a balance between serum and lung concentrations (saturation at the site of infection).

With respect to the data detailed above, one particular issue should be note of our methodology. Tissue homogenates were used to quantify posaconazole concentration in the model. Although

tissue homogenates are frequently used to estimate drug tissue concentration several authors consider that they may provide inaccurate information for drawing conclusions related to efficacy. However for treatment of established invasive infection, drug concentration in the lung parenchyma may be relevant [18]. Lung concentrations of posaconazole quantified in lung homogenates can be an approach of drug exposures that are useful for treatment of fungal infection [18]. The lung posaconazole exposure reached after four consecutive doses, even administering the lower one, 8 mg/kg ( $C_{\min}$ - $C_{\max}$ , 5.38-13.53,  $AUC_{0-80}$ , 414.29) were above the exposure achieved in the in vitro setting to most yeasts and molds strains.

Another point to consider is that while the distribution data presented here are supportive of posaconazole penetration into lungs, it is also important to consider that these data do not quantitatively reflect total drug concentrations at sites of infection. Little is known about how extensively bound drugs engage with their targets to induce a pharmacological effect. This is the case of posaconazole, which binds in more than 95% to plasma proteins and show high efficacy. Total concentrations can provide an approximation of free drug available to engage with the target [36], and considering the high degree of posaconazole protein binding in plasma and the concentrations reached in tissue, the results of the current study indicated that effective local concentrations might be achieved even using the lower equivalent dosage in mg/day for 70 Kg person (8 and 12 mg/kg/day) for susceptible fungal strains.

We can conclude that our model is supported by previous pharmacokinetic data published and it could be an alternative to evaluate pharmacokinetics and pharmacodynamics of azole compounds. In addition it could be used to evaluate efficacy and PK/ PD properties of posaconazole against susceptible and resistant strains in order to progress in the establishment of valid breakpoints establishment.

## **Funding**

This study has been financed by the Research Project from the Fondo de

Investigaciones Sanitarias, FIS\_ISCIII (Exp. number PI09/0624). E. Cendejas-Bueno had a predoctoral fund from Instituto de Salud Carlos III (Grant AFTDOC 11/02,Spain), Currently, E. Cendejas Bueno has a Juan Rodés contract from Instituto de Salud Carlos III (JR 14/00027), which is being developed at the Hospital Universitario La Paz.

A. Forastiero was founded by a fellowship from Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (MAEC-AECID, Convocatoria 2011-2012, 0000557290).

## **Transparency declarations**

None of the authors declare conflicts.

## Reference List

1. Chandrasekar P. Invasive mold infections: recent advances in management approaches. *Leuk.Lymphoma* 2009; 50: 703-715.
2. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL.. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2006; 50: 917-921.
3. Duarte RF, López-Jiménez J, Cornely OA, Laverdiere M, Helfgott D5, Haider S, Chandrasekar P, Langston A, Perfect J, Ma L, van Iersel ML, Connelly N, Kartsonis N, Waskin H. Phase 1b study of new posaconazole tablet for prevention of invasive fungal infections in high-risk patients with neutropenia. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2014; 58: 5758-5765.
4. Krishna G, Ma L, Martinho M, Preston RA, O'Mara E. A new solid oral tablet formulation of posaconazole: a randomized clinical trial to investigate rising single- and multiple-dose pharmacokinetics and safety in healthy volunteers. *J.Antimicrob.Chemother.* 2012; 67: 2725-2730.
5. Maertens J, Cornely OA, Ullmann AJ, Heinz WJ, Krishna G, Patino H, Caceres M, Kartsonis N, Waskin H, Robertson MN. Phase 1B study of the pharmacokinetics and safety of posaconazole intravenous solution in patients at risk for invasive fungal disease. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2014; 58: 3610-3617.
6. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, Greinix H, Morais de Azevedo W, Reddy V, Boparai N, Pedicone L, Patino H, Durrant S. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N.Engl.J.Med.* 2007; 356: 335-347.
7. Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, Chandrasekar P, Donowitz GR, Graybill R, Greene RE, Hachem R, Hadley S, Herbrecht R, Langston A, Louie A, Ribaud P, Segal BH, Stevens DA, van Burik JA, White CS, Corcoran G, Gogate J, Krishna G, Pedicone L, Hardalo C, Perfect JR. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect.Dis* 2007; 44: 2-12.
8. Greenberg RN, Mullane K, van Burik JA, Raad I, Abzug MJ, Anstead G, Herbrecht R, Langston A, Marr KA, Schiller G, Schuster M, Wingard JR, Gonzalez CE, Revankar SG, Corcoran G, Kryscio RJ, Hare R. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2006; 50: 126-133.
9. van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect.Dis* 2006; 42: e61-e65.

10. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, Helfgott D, Holowiecki J, Stockelberg D, Goh YT, Petrini M, Hardalo C, Suresh R, Angulo-Gonzalez D. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N.Engl.J.Med.* 2007; 356: 348-359.
11. Groll AH, Walsh TJ. Posaconazole: clinical pharmacology and potential for management of fungal infections. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 2005; 3: 467-487.
12. Courtney R, Pai S, Laughlin M, Lim J, Batra V. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2003; 47: 2788-2795.
13. Nomeir AA, Kumari P, Hilbert MJ, Gupta S, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Hare R, Miller GH, Lin CC, Cayen MN. Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2000; 44: 727-731.
14. Li Y1, Theuretzbacher U, Clancy CJ, Nguyen MH, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of posaconazole. *Clin.Pharmacokinet.* 2010; 49: 379-396.
15. Courtney R, Wexler D, Radwanski E, Lim J, Laughlin M. Effect of food on the relative bioavailability of two oral formulations of posaconazole in healthy adults. *Br.J Clin Pharmacol.* 2004; 57: 218-222.
16. Krishna G, Ma L, Vickery D et al. Effect of varying amounts of a liquid nutritional supplement on the pharmacokinetics of posaconazole in healthy volunteers. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2009; 53: 4749-4752.
17. Krishna G1, Ma L, Vickery D, Yu X, Wu I, Power E, Beresford E, Komjathy S. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2009; 53: 958-966.
18. Felton T, Troke PF, Hope WW. Tissue penetration of antifungal agents. *Clin Microbiol.Rev* 2014; 27: 68-88.
19. Blennow O, Eliasson E, Pettersson T, Pohanka A, Szakos A, El-Serafi I, Hassan M, Ringdén O, Mattsson J. Posaconazole concentrations in human tissues after allogeneic stem cell transplantation. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2014; 58: 4941-4943.
20. Siopi M, Mavridou E, Mouton JW, Verweij PE, Zerva L, Meletiadis J. Susceptibility breakpoints and target values for therapeutic drug monitoring of voriconazole and *Aspergillus fumigatus* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *J Antimicrob.Chemother.* 2014; 69: 1611-1619.
21. Autmizguine J1, Guptill JT, Cohen-Wolkowicz M, Benjamin DK Jr, Capparelli EV. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children: clinical implications. *Drugs* 2014; 74: 891-909.

22. Gavalda J, Martín T, López P, Gomis X, Ramírez JL, Rodríguez D, Len O, Puigfel Y, Ruiz I, Pahissa A. Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol.Infect.* 2005; 11: 999-1004.
23. Cendejas-Bueno E, Forastiero A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gómez-López A. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin Microbiol.Infect.* 2011.
24. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput.Methods Programs Biomed.* 2010; 99: 306-314.
25. EMEA. Guideline on validation of bioanalytical methods. 2010.
26. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-AFST). . EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. *Clin.Microbiol.Infect.* 2012; 18: E248-E250.
27. Cuenca-Estrella M, Meije Y, Diaz-Pedroche C, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Grande C, Juan RS, Lizasoain M, Rodriguez-Tudela JL, Aguado JM. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 379-384.
28. Howard SJ, Lestner JM, Sharp A, Gregson L, Goodwin J, Slater J, Majithiya JB, Warn PA, Hope WW. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of posaconazole for invasive pulmonary aspergillosis: clinical implications for antifungal therapy. *J.Infect.Dis.* 2011; 203: 1324-1332.
29. Lepak AJ, Marchillo K, Vanhecker J, Andes DR. Posaconazole pharmacodynamic target determination against wild-type and Cyp51 mutant isolates of *Aspergillus fumigatus* in an in vivo model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2013; 57: 579-585.
30. Mavridou E, Bruggemann RJ, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the cyp51A gene. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2010; 54: 860-865.
31. Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton DA, Chander J, Mayayo E, Alvarez E, Guarro J. Efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated infection caused by *Apophysomyces variabilis*. *J.Antimicrob.Chemother.* 2012; 67: 1712-1715.
32. Conte JE, Jr., Golden JA, Krishna G, McIver M, Little E, Zurlinden E. Intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of posaconazole at steady state in healthy subjects. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2009; 53: 703-707.
33. Campoli P, Perlin DS, Kristof AS, White TC, Filler SG, Sheppard DC.. Pharmacokinetics of posaconazole within epithelial cells and fungi: insights into

potential mechanisms of action during treatment and prophylaxis. *J.Infect.Dis.* 2013; 208: 1717-1728.

34. Farowski F, Cornely OA, Vehreschild JJ, Hartmann P, Bauer T, Steinbach A, Rüping MJ, Müller C. Intracellular concentrations of posaconazole in different compartments of peripheral blood. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2010; 54: 2928-2931.
35. Krishna G, Beresford E, Ma L, Vickery D, Martinho M, Yu X, Komjathy S, Tavakkol A. Skin concentrations and pharmacokinetics of posaconazole after oral administration. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2010; 54: 1807-1810.
36. Hope WW, Drusano GL. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics: bridging from the bench to bedside. *Clin.Microbiol.Infect.* 2009; 15: 602-612.

Figure 1: Posaconazole concentrations in serum and lung tissue after four oral doses. Each point on the curves represents an average concentration obtained from at least three animals per time point.

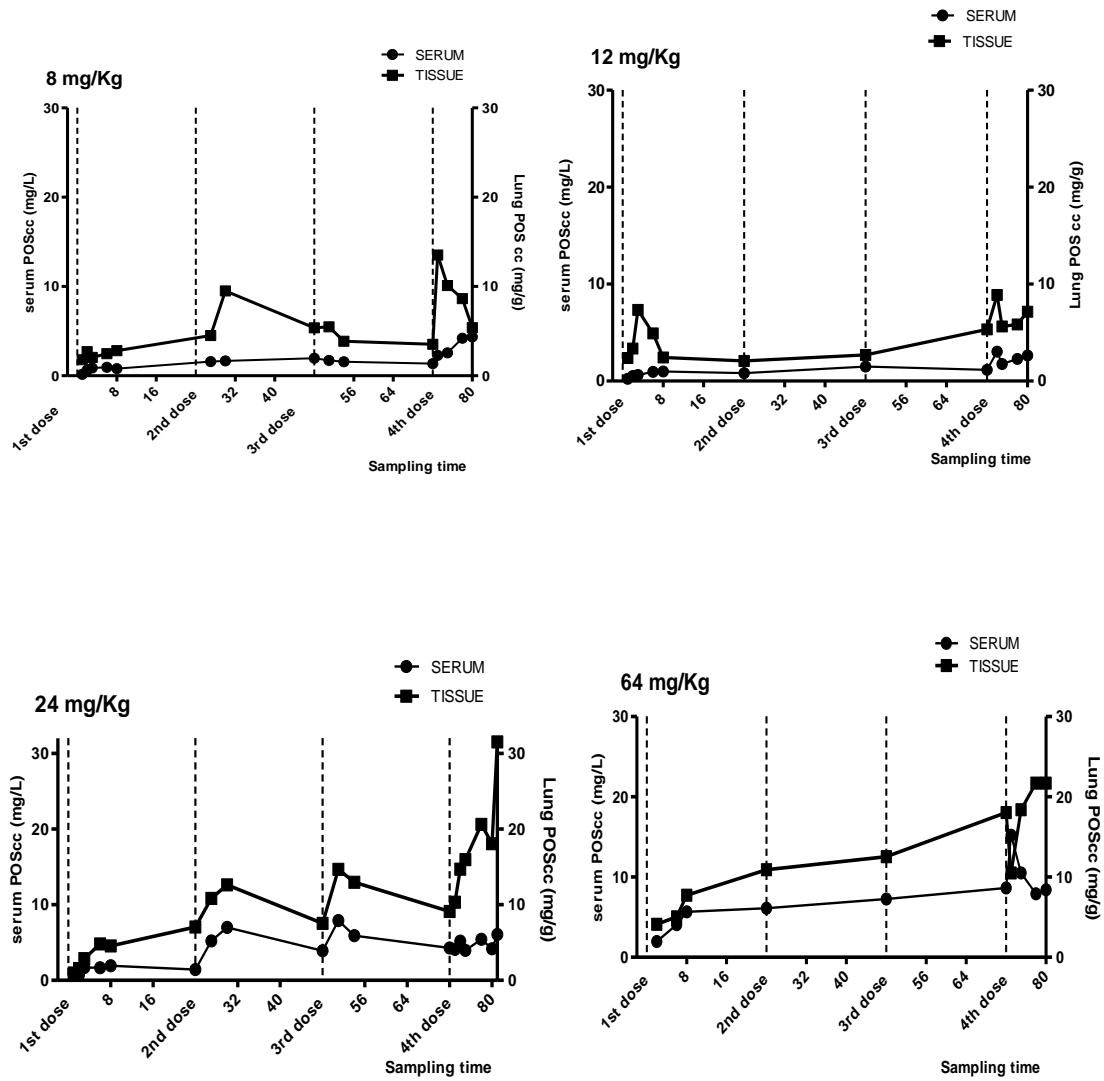


Figure 2: Relationship between posaconazole  $C_{max}$  (right axe),  $AUC_{0-80}$ (left axe) and doses in tissue and serum. The line indicates the linear regression. D1 is equivalent to 8 mg/kg; D2 is equivalent to 12 mg/kg; D3 is equivalent to 24 mg/kg; D4 is equivalent to 64 mg/kg

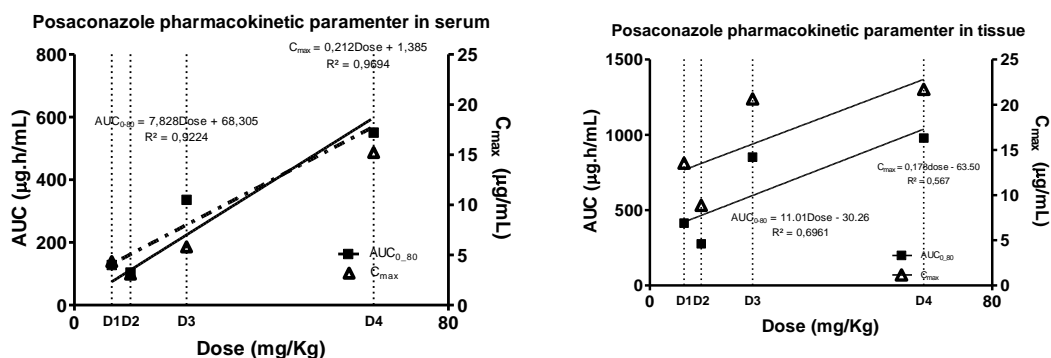


Table 1: Pharmacokinetic parameters after oral administration of different doses of posaconazole (oral gavage) in the rat model.

Pharmacokinetic parameters in serum						
Posaconazole dose (mg/kg)	Single dose			Multiple doses		
	AUC <sub>0-24</sub> (µg·h/mL)	Cmin-Cmax (µg/ml)	Tmax (h)	Cmin-Cmax (µg/ml)	AUC <sub>0-80</sub> (µg·h/mL)	R <sup>a</sup>
8 (560 mg QD)	5.74	0.17-0.95	6	2.28-4.34	128.15	4.5
12 (840 mg QD)	19.85	0.24-0.98	8	1.51-3.10	103.86	3.1
24 (1680 mg QD)	37.78	0.64-1.93	8	3.95-5.80	335.97	3.0
64 (4480 mg QD)	118.02	1.95-6.11	24	7.89-15.22	550.68	2.5

Pharmacokinetic parameters in lung						
Posaconazole dose (mg/kg)	Single dose			Multiple doses		
	AUC <sub>0-24</sub> (µg·h/mL)	Cmin-Cmax (µg/ml)	Tmax (h)	Cmin-Cmax (µg/ml)	AUC <sub>0-80</sub> (µg·h/mL)	R <sup>a</sup>
8 (560 mg QD)	18.83	1.8-2.96	6	5.38-13.53	414.29	4.5
12 (840 mg QD)	71.31	2.37-7.33	3	5.63-8.87	276.84	1.2
24 (1680 mg QD)	119.08	0.97-7.04	24	10.34-20.63	852.07	2.9
64 (4480 mg QD)	183.67	3.89-10.90	24	10.50-21.71	978.43	1.9

<sup>a</sup> Accumulation ratio= ratio of C<sub>max</sub> (after the fourth dose) to C<sub>max</sub> (after the first dose)

In parenthesis equivalent dosage in mg/day for 70 Kg person; QD, once daily dosage calculated for a person of 70 kg of weight. AUC: area under the curve. Cmax :maximum concentration. Tmax : time at Cmax is reached; Cmin: minimum concentration.

Table 2: Lung/ serum AUC and C<sub>max</sub> ratio for posaconazole at multiple dose regimens. Dose administered were 8 mg/kg, 12 mg/kg, 24 mg/kg and 64 mg/kg.

Doses of posaconazole mg/kg	Lung/Serum C <sub>max</sub> ratio at multiple dose regimen	Lung/ Serum AUC <sub>0-80</sub> ratio at multiple dose regimen
8	13.53/4.34= <b>3.12</b>	414.29/128.15= <b>3.23</b>
12	8.87/3.10= <b>2.86</b>	276/103.86= <b>2.66</b>
24	20.63/5.80= <b>3.56</b>	852.07/335.97= <b>2.54</b>
64	21.71/15.22= <b>1.43</b>	978.43/550.68= <b>1.78</b>

**3.3.- Parte clínica: Utilidad de la monitorización en pacientes tratados con voriconazol.**

**Original article:** “Voriconazole serum levels measured by high-performance liquid chromatography: a monocentric study in treated patients”.

Medical Mycology. **2012** May;50(4):439-45. doi: 10.3109/13693786.2011.630039. Epub 2011 Nov 9

**Objetivos:**

- 1.-Se realizó de manera retrospectiva el análisis de catorce pacientes tratados con voriconazol a causa infecciones fúngicas. Todos los pacientes tenían graves patologías de base.
- 2.-Se describen relaciones dosis-exposición-respuesta, así como la validez del rango terapéutico para concentraciones en suero de voriconazol que en el momento de la realización del estudio estaba establecido como válido (1-6 mg/L).

**Conclusiones:**

- 1.- Se observó que las concentraciones de voriconazol fueron altamente variables y poco predecibles en la mayoría de los pacientes.
- 2.- Se observó también que la ausencia de respuesta era más frecuente en aquellos pacientes con niveles persistentes menores de 1 mg/L.
- 3.-El número de muestras con concentraciones menores de 1 mg/L fue significativamente mayor en aquellos pacientes que mostraron fallo terapéutico.
- 4.- El período de tiempo durante el cual las concentraciones de voriconazol se mantuvieron por debajo de 1 mg/L fue ligeramente mayor en el grupo de pacientes con fallo terapéutico.
- 5.- Se debería individualizar la terapia en aquellos pacientes que están en tratamiento con voriconazol.

Short Communication

## Voriconazole serum levels measured by high-performance liquid chromatography: a monocentric study in treated patients

Alicia Gómez-López\*, Emilio Cendejas-Bueno\*, Isabel Cuesta\*, Julio García Rodríguez†, Juan L. Rodríguez-Tudela\*, A. Gutiérrez-Altés† & Manuel Cuenca-Estrella\*

\*Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, and †Servicio de Microbiología, Hospital La Paz, Madrid, Spain

In this study we present the results of a therapeutic drug monitoring retrospective analysis involving 14 patients with several underlying diseases who were receiving voriconazole for the treatment of fungal infections. A simple high performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection was used in the drug monitoring. We report here that serum concentrations were highly variable and unpredictable in most patients. We also found that lack of response was more frequent in patients with levels persistently lower than 1 mg/l. The number of samples with voriconazole concentrations below 1 mg/l was significantly higher in patients who exhibited therapeutic failures (88% versus 27%;  $P < 0.001$ ). In addition, the period of time in which voriconazole concentrations were maintained below 1 mg/l was slightly higher in patients in the failure group. We suggest that serum concentration should be individually quantified for patients receiving voriconazole therapy. Further prospective studies are needed to clarify the potential benefit of the individualization of treatment.

**Keywords** trough voriconazole levels, voriconazole, outcome

### Introduction

Invasive fungal infections (IFIs) are occurring with increasing frequency and are still associated with significant morbidity and mortality in spite of the availability of active drugs. Voriconazole, one such antifungal agent, is a third-generation triazole with broad activity against most clinically relevant fungal pathogens. It has been approved for the treatment of invasive aspergillosis and has subsequently replaced amphotericin B as the drug of choice in the treatment of such infections [1]. Voriconazole has also been approved for invasive candidiasis in non-neutropenic

patients, esophageal candidiasis [2], as well as for serious infections caused by *Scedosporium apiospermum* and *Fusarium* spp.

Some recent clinical observations describing voriconazole exposure-response relationships have suggested that under and over-dosing of this antifungal may influence the efficacy and safety of treatment [3–8]. A compilation of clinical data shows that patients with higher mean voriconazole concentrations tend to have better clinical responses [6,7,9]. Although the therapeutic range for voriconazole has not yet been clearly defined, a logistic regression model developed by Pascual *et al.* suggests that the lower end of the therapeutic range should be approximately 1 mg/l (the model predicts a 70% probability of response at a voriconazole trough concentration of 1 mg/l) [6]. On the other hand, plasma voriconazole concentrations higher than 5 or 6 mg/l are associated with adverse events [6,10].

Whether measurement of voriconazole blood levels may optimize therapy in individual patients continues to be a matter of debate [11]. However, in clinical practice,

Received 8 April 2011; Received in final form 12 August 2011; Accepted 4 October 2011

Presented in part at the 2010 20th European Conference on Clinical Microbiology and Infection Diseases (ECCMID), Vienna, Austria. Correspondence: Alicia Gómez-López, Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 8223426; Fax: +34 91 5097966; E-mail: aliciagl@isciii.es

© 2011 ISHAM

DOI: 10.3109/13693786.2011.630039

voriconazole failures in the treatment of fungal infections have been observed, probably related to subtherapeutic drug exposure [12]. However, accumulating reports suggest that efficacy and tolerance of this drug are increased with therapeutic drug monitoring (TDM) in patients with invasive mycoses [6,13,14] and may obviously be a strategy to consider when seeking to maximize the cost-effectiveness of treatment of these infections. The aim of this observational study was to correlate voriconazole serum concentrations and outcomes of patients with fungal infections. Here we show results of a retrospective study involving patients receiving voriconazole for fungal infections in which the serum concentrations were monitored using a simple and fast in-house high performance liquid chromatography (HPLC) assay with ultraviolet (UV) detection.

## Materials and methods

### Patients

Patients at Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain) who were admitted between 2008 and 2009 were eligible for inclusion in this retrospective review if they had undergone voriconazole serum therapeutic drug monitoring (TDM) after at least three days of therapy.

Collected data from medical records included demographic information, underlying disease, indication for treatment, dosage and global outcomes during the treatment period. Although specific criteria for therapeutic success vary for major fungal diseases, global outcomes was classified as failure (progression of disease or death) or success on the basis of a combination of clinical, radiological, and mycological criteria during the specified period of evaluation [15]. Patients were followed for a minimum of one month and a maximum of 18 months after the beginning of treatment. Trough serum samples were systematically drawn 10 min prior to the next dose from each patient evaluated. A retrospective analysis was performed in order to connect voriconazole concentrations and responses.

### Measurement of azole concentration

An in-house reverse-phased HPLC-UV method, validated according to international guidelines was used throughout the study [16]. Prior to the chromatographic analyses, samples were deproteinized by the addition of acetonitrile including a fixed concentration of voriconazole (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA) as an extraction standard (ES). Chromatographic characterizations were performed using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and water (70:30 and a flow rate of 0.8 ml/min). Detection was achieved by monitoring the absorbance at 255 and at 285 nm (for voriconazole and voriconazole,

respectively). Voriconazole and ES were eluted at 3.2 min and 5.8 min, respectively, using the chromatographic method described. The quantification of these azoles was thus complete in approximately 7 min. Linearity was established over a concentration range of 0.25–16.0 mg/l for voriconazole. Precision, expressed as percentage of relative standard deviation (%RSD) and accuracy, expressed as relative error (%RE), of both antifungals were within acceptable limits (less than 20%) stated for bioanalytical method validation [16,17]. The lower limit of quantification (LLOQ) was determined to be 0.25 mg/l.

Low and high voriconazole concentrations were defined as a concentration below 1 mg/l and higher than 5.5 mg/l, respectively, in accord to the report by Pascual *et al.* [6].

### Statistical analysis

Groups of patients were classified according to their outcomes (failure or success) at the end of the treatment period. Then they were analyzed taking into account categorical (presented as numbers or proportions) and continuous variables. Appropriate tests were used to check differences between groups employing the PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Madrid, Spain) and Epi Info (v.3.5.1) software (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). A *P* value < 0.01 was considered significant.

## Results

A total of 14 patients were included in the study, i.e., 10 men and four women with a mean age of 46.8 years (range 4–87), four of whom were children under 12 years of age. The most significant data are summarized in Table 1. The frequently encountered underlying conditions were malignant haematological disease (6/14, 43%) followed by solid organ transplantation (4/14, 29%), chronic obstructive pulmonary disease (COPD; 2/14, 14%) and others (2/14, 14%). Among patients evaluated, eight (57%) were treated for pulmonary aspergillosis (one proven, seven probable), two (14%) for *Scedosporium* infection (one proven arthritis, one probable pulmonary infection) and one each for a prosthesis fungal infection, an *Aspergillus* endocarditis, a proven invasive fusariosis, and an open wound infection caused by *A. fumigatus*. Eight patients received combination therapy, most of who were treated with voriconazole and caspofungin.

The absolute daily doses of voriconazole ranged between 100 and 1,000 mg per day by oral or intravenous administration (from 50–500 mg/12 h). In some cases the initial treatment regimen was not in accord with the recommended dosages [18]. Two patients (cases 2 and 3) with infections not caused by *Aspergillus* received slightly higher doses of voriconazole (600 mg/day). Patients received voriconazole for a mean of 107 days (range 9–602 days).

**Table 1** Demographics characteristics, voriconazole levels and outcomes for patients included in the study.

Patient no.	Age (yr)	Gender <sup>a</sup>	Underlying condition <sup>b</sup>	Fungal disease	Dosage (mg/day) before and after intervention	Initial <sup>c</sup> /after intervention	Voriconazole concentration (VRCc) (mg/l)		Time VRCc < I/Total (days) <sup>f</sup>	Combined therapy	Global response
							Median (IQR) <sup>e</sup>	No. VRCc < I/Total <sup>g</sup>			
1	12	M	Other	Heart prosthesis infection ( <i>A. niger</i> )	250 480	1.92/2.48	2.48 (2.03–3.04)	0/15	0/602	CAS	Success (complete response)
2	48	M	MHD	Prob Pulmonar infection ( <i>Scedosporium</i> spp.)	600	ND	1.4	½	27/34 (79%)	None	Success (complete response)
3	72	M	MHD	Arthritis ( <i>Scedosporium</i> spp.)	500 600	0.79/1.84	0.79 (0.74–1.32)	2/3	14/28 (50%)	TB	Failure (progression of disease)
4	9	M	SOT	Prob Invasive Aspergillosis	400 600	ND/0.42	0.42 (0.21–0.44)	3/3	39/39 (100%)	Nebulized AMB + CAS	Failure (progression of disease and death)
5	17	M	SOT	Prob Pulmonar Aspergillosis	400	3.73	2.36 (1.95–2.86)	0/6	0/243	None	Success (complete response)
6	4	F	SOT	Prob Invasive Aspergillosis	100 120	ND	ND	8/8	74/74 (100%)	Nebulized AMB + CAS	Failure (death)
7	10	F	SOT	Wound fungal infection	200	ND	0.52 (0.34–0.80)	¾	25/28 (89%)	None	Success (complete response)
8	72	M	MHD	Prob Pulmonar Aspergillosis	600	3.45		0/1	0/9	None	Success (complete response)
9	48	M	MHD	Prob Pulmonar Aspergillosis	600	1.27	1.42 (1.35–1.51)	0/2	0/32	CAS	Success (complete response)
10	69	F	MHD	IFI ( <i>Fusarium</i> spp)	400	2.28	1.88 (1.68–2.08)	0/2	0/48	CAS	Success (complete response)
11	75	M	COPD	Prob Pulmonar Aspergillosis	700	0.76	1.68 (1.22–2.14)	½	17/25 (68%)	Nebulized AMB + CAS	Failure (progression of disease and death)
12	87	F	COPD	Prob Pulmonary Aspergillosis	400	ND	ND	3/3	41/41 (100%)	None	Success (complete response)

(continued)

Table 1 (continued)

Patient no.	Age (yr)	Gender <sup>a</sup>	Underlying condition <sup>b</sup>	Fungal disease	Dosage (mg/day) before and after intervention	Voriconazole concentration (VRCc) (mg/l)				Global response	
						Initial <sup>c</sup> /after intervention	Median (IQR) <sup>d</sup>	No. VRCc < I/Total <sup>e</sup>	Time VRCc < I/Total (days) <sup>f</sup>		
13	71	M	Other	Endocarditis ( <i>A. fumigatus</i> )	800	ND	0.80 (0.40–1.71)	4/6	42/191 (21%)	CAS	Success (complete response)
14	61	M	MHD	Prob Pulmonary Aspergillosis	400 800	ND	ND	1/1	19/19 (100%)	None	Failure (progression of disease and death)

<sup>a</sup>F, female; M, male; <sup>b</sup>MHD, malignant haematological disease; COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease; SOT, solid organ transplantation; Other: patient no. 1 suffered from a Congenital heart disease, patient no. 13 had a fungal endocarditis. <sup>c</sup>First voriconazole measurement for each patient; <sup>d</sup>Median and IQR of VRCc through the course therapy; <sup>e</sup>Number of samples with VRCc below 1 mg/l weighed by total of samples; <sup>f</sup>Time in which VRCc was kept under 1 mg/l weighed by complete time interval of monitoring in days. Prob, probable; Proven, proven; ND, Not detected; AMB, amphotericin B; CAS, caspofungin; TB, terbinafine. Patients with dose adjustment in bold.

A total of 58 trough serum determinations were performed, with a mean of 4.1 per patient (range 1–15 determinations). More than one sample was obtained from 12 patients for analysis. The median trough voriconazole concentration was 1.52 mg/l (interquartile range 0.29–2.43 mg/l). The first measurement was determined between 4 and 34 days (average 14 days) after admission. The drug was below LLOQ (0.25 mg/l) in 24% (14/58) of the samples, with a high percentage having concentrations below 1 mg/l (43%, 25 out of 58).

Large variability in concentrations was detected in patients who received a fixed dose throughout the treatment period (Fig. 1a) as compared to those (five patients) who experienced dose increases (Fig. 1b). Three out of these five achieved higher concentrations as a result of dose adjustment and in two the voriconazole concentration was above the therapeutic range. On the other hand, no correlation was found between dose and trough concentrations of voriconazole (coefficient of determination:  $r^2 = 0.02$ ).

Progression of disease or death occurred in five out of 14 monitored patients (36%), whereas the remaining nine patients experienced successful responses (64%). Twenty-five voriconazole serum concentrations of nine different patients were initially below 1 mg/l (three of them were children under 12 years of age, cases 4, 6 and 7 who had had solid organ transplantations). They ranged between 0.0 and 0.79 mg/l despite the fact that most the patients received standard dosage (a maintenance dosage of 4 mg/kg IV or 200 mg for oral therapy every 12 h).

In five out of these nine patients, trough voriconazole concentrations reached the therapeutic range (1–5.5 mg/l) when first monitored (three of them experienced a favorable response). The remaining four patients had voriconazole concentrations that were persistently below 1 mg/l despite dose increases and only one of them (1/4) had a favorable response. It is worth noting that the number of samples with a concentration below 1 mg/l was significantly higher in the patients that experience treatment failures (88% versus 27%;  $P < 0.001$ , relative risk of failure of 3.3 at the 95% confidence Interval 1.9–5.6). In addition, the period of time in which voriconazole concentration remained under 1 mg/l was slightly higher in patients in this same group ( $P = 0.04$ , Student's  $t$ -test). This corresponds to an increased risk of failure for patients with persistently subtherapeutic trough concentrations.

On the other hand, five patients had voriconazole concentrations that were persistently higher than 1 mg/l (median 2.28 mg/l, interquartile range 1.84–2.94 mg/l). One sample from a patient had voriconazole levels of 6.40 mg/l although no toxicity was observed. All of these patients had complete resolution of their fungal infections and favorable outcomes.

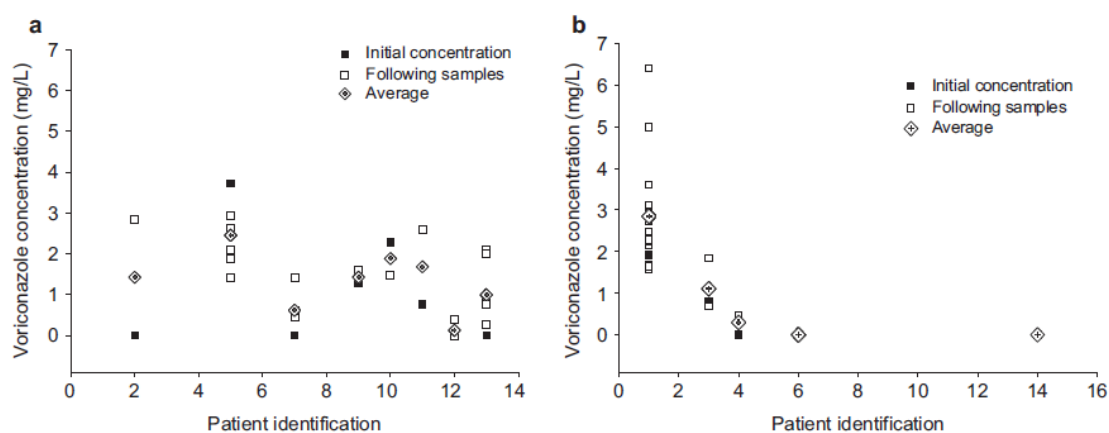


Fig. 1. Intra-patient variability in voriconazole serum concentration. (a) Patients receiving fixed doses are included in the analysis. (b) Only patients with dose optimization were included.

Further analysis with other variables such as age of patients, fungal infection (proven or probable) or undetected voriconazole concentration at first determination revealed that differences between groups were not significant.

### Discussion and conclusion

We report our experience with the use of TDM of voriconazole in patients presenting a broad range of underlying diseases. It is worth noting that the retrospective nature of this study and the limited number of patients included in the analysis constrain the conclusions that can be made. The strength of some of the associations should be interpreted with caution, although a number of interesting observations can be discussed. Our data show great variability in voriconazole serum concentrations in the observed population. We noted considerable variations among patients receiving standard doses, as high as 100-fold differences in those receiving fixed dosages [4], as well as patients whose dosage was increased during the study period (Fig. 1). In fact, there is no assurance that concentrations will remain stable in subsequent samples once appropriate voriconazole levels are obtained as has been recently described [19]. On the other hand, variability may be a reflection of the heterogeneity of the population studied (including adults and children). Recent studies demonstrate great differences in the pharmacokinetic of voriconazole in children and in adults and indicated that children would need higher doses to attain voriconazole exposure comparable to adults. These differences could contribute to misleading predictions of voriconazole exposure in children when dosage regimens are designed based on adult recommendations [20]. In fact, three out of four children showed voriconazole levels below 1 mg/l at the beginning of monitoring in this study.

It is also worth mentioning the high proportion of samples in which supposed subtherapeutic levels (25 out of 58 samples, 43%) were found. Several recent studies have shown results that concur with our data [6,8,21,22]. The reasons for this are not clear, although poor compliance, incomplete absorption, poor hepatic function, critical illnesses and overall drug interaction might be possible explanations. These data suggest that the number of determinations that are potentially subtherapeutic is high enough to warrant more prospective work.

As a result of the data reported here and by others, voriconazole monitoring is recommended at a minimum to evaluate the drug efficacy and safety in each patient. There is a general recommendation for repeated TDM in subjects requiring prolonged voriconazole administration.

Somewhat surprising is that four patients had persistently low levels of voriconazole even with dose adjustment and TDM. Again the retrospective nature of the study makes it difficult to draw any conclusion, but a careful examination of other variables such as organ function (two of them had experienced solid organ transplantation), concomitant medication usage should be recommended to better explain this behavior and guide dose adjustment in these patients. Monitoring concentrations in the middle of the dose interval (between peak and trough levels) could be useful in these situations in order to ascertain presence or absence of voriconazole, predict drug kinetic, and guide dose adjustment to adequately sustained voriconazole concentrations, although further studies will be needed to better define this point.

Several minimal values have been proposed regarding therapeutic targets for voriconazole, i.e., 0.25 mg/l [4], 0.35 mg/l [9], 0.5 mg/l [8], 1 mg/l [6] and 2 mg/l [7]. Some of these have been selected on the basis of the blood

concentrations required to be above the minimum inhibitory concentration (MIC) of voriconazole against most pathogenic fungi (0.25–0.5 mg/l). However, results from the largest logistic regression model developed in the most recent papers contain enough statistical potential to select approximately 1 mg/l as the minimum therapeutic target for voriconazole monitoring. Recently, Neely *et al.* have also confirmed this target for children [23]. Our results support the association of voriconazole trough concentration over 1 mg/l and response, and add new data to support the usefulness of voriconazole monitoring. Lack of response was more frequent in patients with levels persistently lower than 1 mg/l. In the case of patients with infections at sanctuary sites, disseminated disease or infected with less susceptible strains (*Fusarium* spp., *Scedosporium* spp.), a target concentration higher than 1 mg/l has been suggested by several authors [24]. However further prospective studies are needed to clarify this point.

In summary, a growing body of evidence suggests the necessity of TDM in patients treated with voriconazole. A good suggestion might be to sustain the trough voriconazole concentration above 1 mg/l throughout the entire dosing interval and once the steady state has been reached (after 1–3 days of administration following a loading dose or after five days without a loading dose). In addition, it would be advisable to try to incorporate prospective monitoring early in the treatment course. Optimal timing for voriconazole TDM has not yet been established. Trifilio *et al.* studied the temporal variation of plasma voriconazole concentrations throughout the course of therapy, analysing paired trough plasma concentrations separated by a median of 15 days. Large variability in concentrations were found, suggesting the need for repeating TDM [19], probably at weekly intervals would be advised followed by rational dose adjustment in order to guarantee adequately sustained concentrations.

In this regard, a rapid, specific and effective analytical method is quite important. Several quantification methods for evaluating voriconazole in plasma or serum by HPLC have been described in the literature [25–28]. Very few of them use an extraction standard (ES) to monitor the efficacy of the extraction procedure and imprecision of the HPLC injector [25,29]. However, the assay described here shows several advantages from these previously described, namely in terms of the time required for analysis and in the extraction standard employed, i.e., ravuconazole, which exhibited a chemical behavior similar to voriconazole (comparable percentage of recovery from clinical samples, 93% and 99% respectively, data not shown). Additionally, and from a practical perspective, ravuconazole is unavailable in the clinical practice, and it will never be found in clinical samples. Furthermore, if ravuconazole gets through approval as an antifungal for clinical use it would be

unlikely that these compounds are combined at once in the same patient. By contrast, the method will also be valid to quantify ravuconazole using voriconazole as ES.

We may therefore conclude that the judicious use of available agents may result in more successful and safer treatment of a growing number of life-threatening infections [21]. According to this observational study and those previously published, voriconazole serum concentration should be frequently quantified for patients receiving this treatment (we suggest once a week).

Further prospective studies are undoubtedly needed to determine the potential benefit of individualization of voriconazole treatment.

### Acknowledgements

The chromatographic method to detect voriconazole has been partially financed by a research Project from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, PI09/0624). E. Cendejas has a research Contract from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant CM08/0083). I. Cuesta has a research Contract from (Spanish Network for Research in Infectious Diseases) REIPI.

**Declaration of interest:** In the past five years, M. C-E has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the ALBAN program, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, the Spanish Health Research Fund, the Instituto de Salud Carlos III, the Ramon Areces Foundation, the Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has been a paid guest speaker on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. In the past five years, J. L.R-T has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, the Spanish Health Research Fund, the Instituto de Salud Carlos III, the Ramon Areces Foundation, the Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Mycognostica, Pfizer, and Schering Plough. He has been a paid guest speaker on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. The other authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 327–360.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 503–535.
- Boyd AE, Modi S, Howard SJ, *et al.* Adverse reactions to voriconazole. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 1241–1244.
- Denning DW, Ribaud P, Milpied N, *et al.* Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 563–571.
- Imhof A, Schaer DJ, Schanz U, Schwarz U. Neurological adverse events to voriconazole: evidence for therapeutic drug monitoring. *Swiss Med Wkly* 2006; **136**: 739–742.
- Pascual A, Calandra T, Bolay S, *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 201–211.
- Smith J, Safdar N, Knasinski V, *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1570–1572.
- Trifilio S, Ortiz R, Pennick G, *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**: 509–513.
- Miyakis S, van Hal SJ, Ray J, Marriott D. Voriconazole concentrations and outcome of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2009; **16**: 957–933.
- Potoski BA, Brown J. The safety of voriconazole. *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 1273–1275.
- Drusano GL. How does a patient maximally benefit from anti-infective chemotherapy? *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 1245–1246.
- Trifilio S, Singhal S, Williams S, *et al.* Breakthrough fungal infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients on prophylactic voriconazole. *Bone Marrow Transplant* 2006; **40**: 451–456.
- Hope WW, Billaud EM, Lestner J, Denning DW. Therapeutic drug monitoring for triazoles. *Curr Opin Infect Dis* 2008; **21**: 580–586.
- Smith J, Andes D. Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit* 2008; **30**: 167–172.
- Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA, *et al.* Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis* 2008; **47**: 674–683.
- Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation 2001. Available from the website: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- Shah VP, Midha KK, Findlay JW, *et al.* Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000; **17**: 1551–1557.
- European Medicines Agency (EMA). Vfend: summary of product characteristics, 2009. Available from the website: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/>
- Trifilio SM, Yarnold PR, Scheetz MH, *et al.* Serial plasma voriconazole concentrations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1793–1796.
- Walsh TJ, Driscoll T, Milligan PA, *et al.* Pharmacokinetics, safety, and tolerability of voriconazole in immunocompromised children. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4116–4123.
- Berge M, Guillemain R, Boussaud V, *et al.* Voriconazole pharmacokinetic variability in cystic fibrosis lung transplant patients. *Transpl Infect Dis* 2009; **11**: 211–219.
- Trifilio S, Pennick G, Pi J, *et al.* Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer* 2007; **109**: 1532–1535.
- Neely M, Rushing T, Kovacs A, Jelliffe R, Hoffman J. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 27–36.
- Lutsar I, Roffey S, Troke P. Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of guinea pigs and immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 728–732.
- Chhun S, Rey E, Tran A, *et al.* Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; **852**: 223–228.
- Keevil BG, Newman S, Lockhart S, *et al.* Validation of an assay for voriconazole in serum samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 650–657.
- Langman LJ, Boakye-Agyeman F. Measurement of voriconazole in serum and plasma. *Clin Biochem* 2007; **40**: 1378–1385.
- Prajapati AM, Patel SA, Patel NJ, Patel DB, Patel SK. Development and validation of reversed-phase column high-performance liquid chromatographic and first-derivative UV spectrophotometric methods for estimation of voriconazole in oral suspension powder. *J AOAC Int* 2008; **91**: 1070–1074.
- Vogeser M, Schiel X, Spohrer U. Quantification of voriconazole in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2005; **43**: 730–734.



## 4.- Discusión general.



Gran parte de la investigación en el Laboratorio de Referencia de Micología, perteneciente al Centro Nacional de Microbiología es una investigación aplicada que persigue fundamentalmente desarrollar nuevas metodologías transferibles a los laboratorios asistenciales del Sistema Nacional de Salud, con el fin último de mejorar y facilitar el manejo del paciente con enfermedad fúngica.

Este trabajo de tesis se ha dirigido a desarrollar, validar y evaluar la aplicación clínica de distintos métodos analíticos para la determinación de concentraciones sanguíneas de antifúngicos sistémicos del grupo de los azoles.

En 2009, el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología inició el desarrollo de métodos para la cuantificación de azoles sistémicos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en respuesta a una necesidad manifiesta de disponer de metodologías válidas para monitorizar los antifúngicos del grupo de los azoles y evaluar la relación exposición-respuesta para este grupo de antifúngicos. Los ensayos descritos confirman la validez de estas metodologías para su aplicación en clínica y transferencia a laboratorios asistenciales.

En este contexto, se han desarrollado y validado métodos analíticos para la cuantificación de voriconazol, posaconazol, itraconazol y su metabolito activo hidroxitraconazol mediante HPLC/UV. Además, se han desarrollado métodos microbiológicos, también llamados bioensayos, para la cuantificación de dos de estos fármacos en muestras de suero humano.

En el proceso de validación se ha confirmado la aplicabilidad de los métodos desarrollados en estudios preclínicos en modelos animales convencionales (modelos murinos) y en modelos alternativos de reciente implantación (invertebrados) con el **objetivo de evaluar parámetros farmacocinéticos válidos y extrapolables y establecer la validez de la relación exposición-respuesta**. Además, se realizó un estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes tratados con voriconazol, para evaluar la validez de estas metodologías en la monitorización clínica del tratamiento antifúngico.

Actualmente los resultados de esta tesis se están usando para guiar el tratamiento con antifúngicos sistémicos en pacientes ingresados y tratados con estos fármacos en hospitales del Sistema Nacional de Salud. También se están utilizando estos desarrollos metodológicos para el establecimiento de nuevas líneas de investigación en el estudio de la exposición a antifúngicos.

Una vista general de los aspectos incluidos en esta tesis se muestra en la figura 13:



Figura 13. Relaciones entre fármaco, microorganismo y hospedador.

**Sección 1ª.- Métodos; Aportaciones, ventajas y parámetros de validación. Modelos preclínicos y aplicaciones en pacientes con tratamiento.**

**A.- Métodos.**

Hasta la fecha se han descrito una gran variedad de métodos que permiten la cuantificación de antifúngicos en líquidos orgánicos. La mayoría utilizan técnicas cromatográficas de mayor o menor complejidad. Otros métodos minoritarios, bioensayos, también se han empleado para la cuantificación de estos compuestos.

Como ventajas generales de todos los métodos cromatográficos desarrollados destacar que son métodos rápidos, facilitan la toma de decisiones que impliquen cambios posológicos inmediatos, requieren pequeños volúmenes de muestra, y permiten el uso rutinario de la monitorización de azoles en hospitales cuyos laboratorios posean el equipamiento necesario.

En el caso particular de la determinación de voriconazol el tiempo de análisis requerido es corto y menor comparado con otros métodos expuestos en la literatura, así como el requerimiento de una menor cantidad de muestra (Chun, Rey et al., 2007; Langman and Boakye-Agyeman, 2007; Pennick, Clark et al., 2003).

Para posaconazol el tiempo de análisis es más largo, aunque el procesamiento de la muestra es igualmente sencillo. El límite inferior de cuantificación es mayor (0.125 µg/mL) que el de otros

métodos descritos en la literatura, sin embargo, esto no supone un inconveniente para realizar una monitorización clínicamente efectiva (la concentración mínima eficaz en tratamiento descrita está definida en 0.7 µg/mL), no habiéndose establecido hasta este momento una concentración máxima tóxica (Andes, Pascual et al., 2009; Ashbee, Barnes et al., 2014; Hamada, Tokimatsu et al., 2013; Lewis, 2011; Muller, Arndt et al., 2006; Rochat, Pascual et al., 2010). Por lo tanto, no habría limitación de este método para su uso en la monitorización clínica de concentraciones sanguíneas.

En referencia a itraconazol, se desarrolló y validó un método útil para cuantificar concentraciones de itraconazol y en el mismo proceso concentraciones de su principal metabolito activo, hidroxitraconazol. Al ser dos compuestos estructuralmente relacionados pero con polaridades diferentes, con la química específica de la columna utilizada y alargando el tiempo de carrera de la muestra, se consiguió una separación de ambos compuestos sin errores de identidad gracias al espectro proporcionado por el detector de arreglo de diodos (PDA). No está definido con claridad el papel que desempeña este metabolito en el tratamiento con itraconazol, pero si se conoce que colabora en el efecto antifúngico y cuya actividad antimicrobiana es equiparable a la de la molécula de la cual deriva. Los métodos que detectan tanto fármaco activo como metabolitos tienen una ventaja adicional. Son capaces de proporcionar los datos necesarios para poder calcular la correspondiente tasa metabólica, una relación que permite inferir situaciones metabólicas individuales o anómalas y en consecuencia realizar los ajustes de dosis necesarios en función de estos parámetros.

Los métodos desarrollados ofrecen ventajas adicionales: la fase móvil no necesita de aditivos (soluciones tampón), lo cual favorece la reproducibilidad de los resultados (menor número de interferencias y precipitados que se asocian con fallos técnicos). El uso de un compuesto de características químicas similares como control de extracción (ravuconazol) asegura un comportamiento cromatográfico similar al de los compuestos evaluados. Así mismo el método de extracción usado en los tres métodos cromatográficos desarrollados, asegura un porcentaje de recuperación de los tres antifúngicos y del control interno, mayor del 90%. Adicionalmente, el detector de arreglo de diodos (PDA) proporciona espectros ultravioleta característicos que verifican la identidad y homogeneidad de los picos detectados, específicos de cada compuesto analizado.

Respecto a los dos métodos microbiológicos desarrollados y validados para voriconazol y posaconazol, resultaron ser precisos, exactos y rápidos, con un tiempo de respuesta no superior a 48 horas. La validez del método microbiológico está asegurada, pues ha demostrado

concordancia con los resultados obtenidos para las mismas muestras por un método de referencia, en este caso el correspondiente método cromatográfico, como así se pone de manifiesto tras la validación cruzada realizada. No hubo variabilidad metodológica en ningún parámetro (EMA, 2010; FDA, 2013).

Los bioensayos muestran ventajas interesantes. Se pueden evaluar de manera simultánea varias muestras por duplicado o triplicado, lo cual reduce costes, tiempo de trabajo y errores en la medición de las zonas de inhibición. Así mismo, el escaso volumen de suero necesario para la realización de la técnica, permite que se pueda realizar esta determinación en situaciones en las que la obtención de una muestra adecuada se complica.

Otra de las ventajas es la flexibilidad del ensayo. Como microorganismo revelador, permite el uso de cualquier cepa y especie de *Candida* que sea sensible a voriconazol y posaconazol, siempre que proporcionen de una manera fiable y reproducible zonas simétricas en los halos de inhibición del crecimiento. La exactitud y la precisión tanto del bioensayo validado para voriconazol como para posaconazol están dentro de los límites aceptados por la FDA y la EMA para la validación de métodos bioanalíticos (EMA, 2010; FDA, 2013). La exactitud y precisión muestran valores superiores a los obtenidos a través de técnicas cromatográficas, pero siempre en los límites de validez que recomiendan las guías internacionales. La precisión es similar a otros bioensayos publicados, pero la diferencia fundamental con estos otros es el rango más amplio de concentraciones (0.25-16 mg/L) que abarcan los dos bioensayos validados en esta tesis (Adams, Steppe et al., 2006; Gage and Stopher, 1998; Pascual, Nieth et al., 2007; Steinmann, Huelsewede et al., 2011).

A su vez, presentan ciertas desventajas respecto a los métodos cromatográficos. El bioensayo determina la actividad antifúngica de la muestra, pero no cuantifica ni identifica el fármaco responsable de tal actividad. Por lo tanto, cualquier fármaco o compuesto presente en la muestra, que tenga actividad antifúngica, puede modificar el diámetro de los halos de inhibición, dando un resultado erróneo para el antifúngico evaluado (Adams, Steppe et al., 2006; Cendejas-Bueno, Cuenca-Estrella et al., 2013; Cendejas-Bueno, Forastiero et al., 2012; Gage and Stopher, 1998; Pascual, Nieth et al., 2007; Steinmann, Huelsewede et al., 2011). No se desarrolló un bioensayo para la monitorización de itraconazol debido a que las muestras de pacientes tratados presentan una combinación de itraconazol e hidroxitraconazol, y no es posible determinar qué concentración de itraconazol y cuál de hidroxitraconazol contribuye al efecto final. La terapia antifúngica combinada es otro factor que deber ser tenido en cuenta a la hora de evaluar muestras de pacientes con este tipo de tratamientos, debido a que los resultados obtenidos no serían representativos de la concentración del antifúngico a cuantificar.

Por lo tanto, los bioensayos evaluados y validados demuestran ser fiables, precisos y baratos para monitorizar azoles en laboratorios clínicos de hospitales

## **B.- Aplicaciones en análisis preclínicos, modelos animales.**

Una de las aplicaciones más interesantes de los métodos desarrollados son los estudios encaminados a establecer relaciones exposición-respuesta con antifúngicos. Este tipo de ensayos realizados en diferentes modelos experimentales, han contribuido a una mejor comprensión de estas relaciones. En este contexto, se aceptan como herramientas válidas para evaluar si el éxito clínico está únicamente relacionado con la susceptibilidad de la cepa causal o si a su vez está influenciada por la cantidad de fármaco disponible (exposición).

En esta tesis se han evaluado aspectos farmacocinéticos de posaconazol y voriconazol en dos modelos animales de aspergilosis invasora; un modelo murino clásico (rata wistar inmunodeprimida) y un modelo alternativo de invertebrado (*Galleria mellonella*) con el objetivo de establecer relaciones exposición-respuesta. La utilización de cepas de *Aspergillus fumigatus* con perfil de sensibilidad diferente ha permitido avanzar en el establecimiento de correlaciones in vitro-in vivo con antifúngicos.

El modelo invertebrado de *Galleria mellonella* ha mostrado ser un modelo válido para estudios de virulencia y actividad antimicrobiana. Se acepta, por lo tanto, como un modelo aplicable al estudio de relaciones exposición-respuesta, pues permite a las diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus* desarrollarse en el interior de la larva y al antifúngico enfrentarse a su diana fúngica. Igualmente la exposición evaluada para los dos azoles ( $AUC_{0-24h}$ ) en este modelo alternativo, es comparable a la publicada previamente en modelos diferentes.

En el caso de voriconazol y posaconazol, las evidencias demuestran que el parámetro farmacodinámico que predice eficacia es el  $AUC_{0-24}/CMI$ . Este parámetro ha sido evaluado en modelos murinos con cepas sensibles y resistentes a azoles, encontrando que un  $AUC_{0-24}/CMI$  próximo a 20 (17-22) para voriconazol (Courtney, Pai et al., 2003; Jeans, Howard et al., 2012; Mavridou, Bruggemann et al., 2010b) y a 250 (167-321) para posaconazol (Courtney, Pai et al., 2003; Howard, Lestner et al., 2011; Lepak, Marchillo et al., 2013; Mavridou, Bruggemann et al., 2010a) han sido establecidos como predictores de éxito terapéutico. En el modelo invertebrado desarrollado, se observó respuesta al tratamiento con voriconazol (aumento significativo de la supervivencia larvaria) cuando la relación entre la exposición (AUC) y la CMI de la cepa infectante superó un valor de 16. Del mismo modo, en este modelo se encontró respuesta a posaconazol (aumento de la supervivencia) cuando el parámetro  $AUC_{0-24}/CMI$  se cuantificó por encima de 477.

Para el tratamiento de cepas con CMI elevadas, la exposición requerida ha de ser mayor, en una relación que define el parámetro farmacodinámico estimado. En este modelo encontramos que larvas infectadas con cepas de *Aspergillus* que han mostrado un patrón sensible (S) a azoles,

respondían bien tras la administración de dosis equivalente a la dosis terapéutica en humanos. Por el contrario, estas mismas dosis no fueron suficientes para alcanzar una respuesta equivalente en larvas infectadas con cepas que mostraron un perfil de resistencia (R).

El modelo clásico de aspergilosis invasora en rata demostró ser también de utilidad para evaluar parámetros farmacocinéticos, la exposición al fármaco y sirvió además para establecer la utilidad de dos herramientas diagnósticas, como son el índice de galactomanano y la carga fúngica (PCR-RT), para el seguimiento y la monitorización de la eficacia de un régimen de profilaxis.

En el modelo de rata en el que se utilizó posaconazol como profilaxis, se observó que la exposición al fármaco era similar en los dos grupos de animales, tanto en el grupo de los infectados por la cepa resistente como los infectados por la cepa sensible. La dosis de posaconazol administrada como profilaxis mostró un potente efecto frente a la cepa de *A. fumigatus* susceptible (MIC<0.125mg/L; AUC<sub>0-24</sub>/CMI ratio=1235), produciéndose un descenso de la carga fúngica y del índice de galactomanano. Esto puede ser interpretado como ausencia de la progresión de la infección. Por el contrario, con la cepa resistente a posaconazol (MIC>8mg/L;AUC<sub>0-24</sub>/MIC ratio=5.13), no hubo descenso de los marcadores a pesar de que la exposición a posaconazol fue similar. Para mostrar eficacia frente a este tipo de cepas resistentes, la exposición que debe alcanzarse es mucho mayor a la de las cepas sensibles, y sólo puede alcanzarse con dosificaciones mayores de las que ahora mismo están autorizadas (Mavridou, Bruggemann et al., 2010a).

La disposición y penetración en tejido aporta información importante para entender la eficacia de este grupo de antifúngicos. Los ensayos realizados con posaconazol en el modelo de rata descrito, muestran que este antifúngico se acumula en pulmón, alcanzando concentraciones superiores a las obtenidas en suero. Este aumento se relacionó con las dosis administradas, a mayor dosis, mayor concentración en tejido. La exposición en tejido (AUC y C<sub>max</sub>.) demostró ser entre 1.4 y 3.2 veces superior a la encontrada en suero.

### **C.-Aplicaciones en estudios clínicos, pacientes tratados.**

La variación inter e intraindividual es un hecho demostrado en los pacientes tratados con estos compuestos azólicos. Las causas ya se han descrito en la introducción de esta tesis. Es por lo tanto importante disponer de metodología que permitan evaluar esta variabilidad y dosificar en consecuencia.

En los estudios realizados en pacientes tratados e incluidos en este trabajo de tesis, se evidencia una gran variabilidad de niveles sanguíneos, Se encontró una alta variabilidad entre diferentes grupos de poblaciones y dentro de cada grupo poblacional, entre los diferentes sujetos . Así

mismo también se evidenció gran variabilidad entre las diferentes muestras de un mismo paciente. Estas observaciones llevan a la conclusión de que cualquier modificación en la dosificación y/ o en la vía de administración justifica la monitorización de niveles sanguíneos de voriconazol, posaconazol e itraconazol (Hyland, Jones et al., 2003; Pascual, Calandra et al., 2008; Trifilio, Pennick et al., 2007; Trifilio, Yarnold et al., 2009). En este contexto la disponibilidad de métodos analíticos fiables como los aquí expuestos constituyen herramientas necesarias e imprescindibles para manejar con eficacia tal variabilidad y dosificar en consecuencia.

### **Monitorización de pacientes tratados con voriconazol.**

En el estudio realizado en pacientes tratados con voriconazol, analizados de manera retrospectiva y de los cuales se pudo recabar datos clínicos suficientes para extraer conclusiones respecto a la monitorización y su utilidad en la práctica clínica, se evidenció una alta proporción de muestras en los que los niveles cuantificados fueron subterapéuticos (43%), hecho también observado y descrito en la literatura (Berge, Guillemain et al., 2009; Pascual, Calandra et al., 2008; Trifilio, Pennick et al., 2007). Las principales causas relacionadas de esta variabilidad son la biodisponibilidad, el incumplimiento, la pobre absorción del fármaco, el estado funcional del hígado o comedificaciones.

Las relaciones obtenidas respecto a niveles y eficacia, confirman los datos publicados de manera previa a este estudio (Berge, Guillemain et al., 2009), los cuales sugieren un rango terapéutico entre 1 µg/mL y 6 µg/mL. Las asociaciones obtenidas en este estudio entre niveles valle y respuesta, proporcionan más datos a los ya existentes para apoyar la utilidad de la monitorización de voriconazol. La ausencia de respuesta fue más frecuente en los pacientes en los que los niveles valle estaban por debajo de 1µg/mL de manera persistente.

En conclusión, hay suficientes evidencias que apoyan el uso de la monitorización de voriconazol como herramienta terapéutica en pacientes tratados o en profilaxis (Ashbee, Barnes et al., 2014).

## **Sección 2ª.- Recomendaciones actuales en la monitorización terapéutica de antifúngicos y futuro como herramienta terapéutica.**

Los beneficios de la monitorización deben ser analizados en función de qué ventajas aporta esta herramienta terapéutica en pacientes en los que se aplique con respecto a los pacientes en los que no. Para que la monitorización sea útil, ésta tiene que cumplir determinados criterios expuestos anteriormente en esta tesis. La monitorización de un fármaco debe ser considerada un proceso multidisciplinar, en el que estén implicados los diferentes profesionales que intervienen en el proceso, desde el personal de enfermería encargado de recoger la muestra, el analista que la procesa y el especialista que interpreta el análisis, y finalmente el médico encargado de ajustar las dosis para conseguir la máxima eficacia del fármaco.

En la actualidad existen evidencias científicas que apoyan el uso de la monitorización de antifúngicos triazólicos en pacientes en tratamiento y profilaxis. Guías prácticas publicadas recientemente han establecido recomendaciones sobre el uso de la monitorización de voriconazol. Dos de las más recientes, la publicada por la Sociedad Japonesa de Quimioterapia y por la Sociedad Británica de Micología Médica (Ashbee, Barnes et al., 2014; Hamada, Tokimatsu et al., 2013), recomiendan tanto las técnicas analíticas más adecuadas para realizar el análisis de voriconazol, posaconazol e itraconazol, como las indicaciones para la monitorización, basándose éstas en los grados de evidencia obtenidos de la revisión de la literatura.

La monitorización es a día de hoy una herramienta terapéutica complementaria que ayuda a definir una exposición adecuada o inadecuada al fármaco. El desarrollo y validación de métodos de monitorización exactos, precisos y fiables como los desarrollados en este trabajo de tesis, permiten el ajuste de la dosis para garantizar la adecuada exposición, aumentando las probabilidades de éxito y minimizar el riesgo de toxicidad y efectos adversos. En ocasiones las condiciones clínicas del paciente requieren una monitorización a demanda, así como una velocidad de respuesta que permita afirmar si hay una exposición correcta al fármaco. La transferencia de estos métodos a los centros de Sistema Nacional de Salud y no sólo su desarrollo en centros de referencia garantiza esa velocidad de respuesta y la toma de decisiones inmediata. El retraso en el inicio de una correcta terapia antifúngica, así como la exposición inadecuada al fármaco, se ha visto que están independientemente asociadas con el aumento de la mortalidad debida a la EFI.

Por otro lado, basadas en la experiencia, se están empezando a establecer estrategias de dosificación que ayudan a optimizar las dosis para alcanzar las concentraciones diana que aseguren la eficacia y minimicen los riesgos de toxicidad. La presencia en los centros del Sistema Nacional de Salud de un profesional con los conocimientos tanto metodológicos como

científicos y con la capacidad para integrar todo este conocimiento a la hora de la toma de decisiones que impliquen cambios en la terapia de los pacientes, es esencial para una optimización del tratamiento antifúngico. El contacto directo entre el analista, y el conocimiento por parte de este de toda la patología de base y tratamientos concomitantes del paciente, y el clínico es esencial para el abordaje del tratamiento de estos pacientes tan complejos. Para dar un buen uso y una correcta utilidad de la monitorización de antifúngicos azólicos, el conocimiento del proceso completo, incluida la farmacocinética (y sus variables más importantes), aspectos farmacodinámicos, así como de la literatura más relevante publicada al respecto, deben ser lo más completos posible. Para ello, todos los profesionales implicados en la toma de decisiones derivadas de la monitorización deben estar familiarizados y especializados con cada paso del proceso. De igual manera, la interpretación de los resultados debe ser realizada por un profesional con conocimientos en monitorización, ayudando sus recomendaciones a optimizar la terapia antifúngica con la finalidad de lograr una correcta exposición al fármaco con la menor toxicidad posible (Bruggemann and Aarnoutse, 2015).

Son esenciales métodos analíticos válidos para aplicar a los resultados obtenidos nuevas herramientas informáticas para la optimización de dosificaciones de azoles. Estas herramientas están empezando a abrirse paso en la literatura científica como una alternativa válida a la hora de individualizar las dosificaciones y los intervalos de dosificación de los azoles. Los factores farmacocinéticos que varían de unas poblaciones a otras y que pueden ayudar a individualizar de manera real los regímenes de administración son la base para el desarrollo de estas herramientas. Hasta el día de hoy, los estudios farmacocinéticos y de eficacia se han realizado en poblaciones de pacientes muy heterogéneas, lo que no valida los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en poblaciones homogéneas. Es aquí donde los modelos animales tienen un papel importante, ya que en ocasiones no es posible hacer estudios en estas poblaciones, bien por número insuficiente de sujetos o bien por la complejidad de los mismos. Estos modelos pueden ayudar a predecir parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos presentes en estas poblaciones. Estos datos pueden servir de orientación en el manejo de estas poblaciones, aunque evidentemente no de guía única. Una vez establecidos los valores de las concentraciones diana para cada población de pacientes, los factores individuales (como por el ejemplo el genotipo metabolizador de enzimas metabolizadoras, las comorbilidades asociadas, las comedificaciones, etc...), y los factores farmacodinámicos (concentración mínima inhibitoria de la levadura o el hongo filamentoso que infecta al paciente), deben integrarse para ayudar a establecer una terapia dirigida individualizada, en la que el paciente obtiene el máximo beneficio de la administración del fármaco antifúngico. Se elaborará, por lo tanto, un “traje terapéutico” hecho a medida para cada individuo.

Hay ciertos aspectos en la monitorización de azoles que no han sido del todo aclarados. El estudio de los diferentes genotipos metabolizadores y su influencia en las concentraciones de voriconazol y de las interacciones farmacológicas de éste, abren un nuevo frente de investigación para la optimización terapéutica. La identificación de nuevas interacciones podría proporcionar nuevos datos sobre las rutas de metabolización de los fármacos implicados. En cuanto a qué tipo de muestra es la mejor para realizar la monitorización y los tiempos de muestreo, parecen claras las recomendaciones expuestas por diferentes sociedades y grupos de expertos. En el caso concreto de voriconazol, la concentración en el valle refleja la exposición al fármaco y es la medida de exposición al fármaco más fácilmente interpretable (Ashbee, Barnes et al., 2014) . En el caso de posaconazol e itraconazol, la concentración valle también refleja bien la exposición. Las evidencias más recientes apuntan a que éste valor que representa la exposición (concentración valle) tiene que considerarse en función de la CMI del microorganismo causante de la infección, ya que ésta es un determinante importante de la relación exposición-respuesta (Ashbee, Barnes et al., 2014). El tratamiento de cepas con CMIs más elevadas requiere exposiciones mayores para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

Así mismo las concentraciones en momentos distintos al valle (pico) pueden ser útiles para monitorizar otros procesos como la absorción. Queda por definir el papel de la determinación de estos antifúngicos en otros fluidos biológicos diferentes a suero y plasma y su interpretación (Ashbee, Barnes et al., 2014). Hasta ahora la experiencia y los estudios realizados son escasos, y debido a la dificultad de realizarlo en pacientes (necesidad de técnicas invasivas para la obtención de muestras biológicas), es en este punto donde los modelos animales aportan información que puede ser útil de trasladar al paciente en tratamiento y profilaxis con estos fármacos, y que permiten poner las bases para futuras investigaciones.

### **Bibliografía**

Adams,A.I., Steppe,M., Froehlich,P.E., Bergold,A.M., 2006. Comparison of microbiological and UV-spectrophotometric assays for determination of voriconazole in tablets. *J. AOAC Int.*, 89, 960-965.

Andes,D., Pascual,A., Marchetti,O., 2009. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 24-34.

Ashbee,H.R., Barnes,R.A., Johnson,E.M., Richardson,M.D., Gorton,R., Hope,W.W., 2014. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69, 1162-1176.

Berge,M., Guillemain,R., Boussaud,V., Pham,M.H., Chevalier,P., Batisse,A., Amrein,C., Dannaoui,E., Lloriot,M.A., Lillo-Le Louet,A., Billaud,E.M., 2009. Voriconazole pharmacokinetic variability in cystic fibrosis lung transplant patients. *Transpl. Infect. Dis.*, 11, 211-219.

Bruggemann,R.J., Aarnoutse,R.E., 2015. Fundament and Prerequisites for the Application of an Antifungal TDM Service. *Curr. Fungal. Infect. Rep.*, 9, 122-129.

Bruggemann,R.J., Blijlevens,N.M., Burger,D.M., Franke,B., Troke,P.F., Donnelly,J.P., 2010. Pharmacokinetics and safety of 14 days intravenous voriconazole in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Antimicrob. Chemother.*, 65, 107-113.

Cendejas-Bueno,E., Cuenca-Estrella,M., Gomez-Lopez,A., 2013. Determination of voriconazole serum concentration by bioassay, a valid method for therapeutic drug monitoring for clinical laboratories. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 3437-3440.

Cendejas-Bueno,E., Forastiero,A., Rodriguez-Tudela,J.L., Cuenca-Estrella,M., Gomez-Lopez,A., 2012. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, 1229-1235.

Chhun,S., Rey,E., Tran,A., Lortholary,O., Pons,G., Jullien,V., 2007. Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 852, 223-228.

Courtney,R., Pai,S., Laughlin,M., Lim,J., Batra,V., 2003. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 2788-2795.

Cuenca-Estrella,M., Meije,Y., Diaz-Pedroche,C., Gomez-Lopez,A., Buitrago,M.J., Bernal-Martinez,L., Grande,C., Juan,R.S., Lizasoain,M., Rodriguez-Tudela,J.L., Aguado,J.M., 2009.

Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 379-384.

EMA. Guideline on validation of bioanalytical methods. 2010.

FDA, 2013. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA.

Gage,R., Stopher,D.A., 1998. A rapid HPLC assay for voriconazole in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17, 1449-1453.

Hamada,Y., Tokimatsu,I., Mikamo,H., Kimura,M., Seki,M., Takakura,S., Ohmagari,N., Takahashi,Y., Kasahara,K., Matsumoto,K., Okada,K., Igarashi,M., Kobayashi,M., Mochizuki,T., Nishi,Y., Tanigawara,Y., Kimura,T., Takesue,Y., 2013. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of voriconazole: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. *J. Infect. Chemother.*, 19, 381-392.

Howard,S.J., Lestner,J.M., Sharp,A., Gregson,L., Goodwin,J., Slater,J., Majithiya,J.B., Warn,P.A., Hope,W.W., 2011. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of posaconazole for invasive pulmonary aspergillosis: clinical implications for antifungal therapy. *J. Infect. Dis.*, 203, 1324-1332.

Hyland,R., Jones,B.C., Smith,D.A., 2003. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos.*, 31, 540-547.

Jeans,A.R., Howard,S.J., Al-Nakeeb,Z., Goodwin,J., Gregson,L., Majithiya,J.B., Lass-Flörl,C., Cuenca-Estrella,M., Arendrup,M.C., Warn,P.A., Hope,W.W., 2012. Pharmacodynamics of voriconazole in a dynamic in vitro model of invasive pulmonary aspergillosis: implications for in vitro susceptibility breakpoints. *J. Infect. Dis.*, 206, 442-452.

Langman,L.J., Boakye-Agyeman,F., 2007. Measurement of voriconazole in serum and plasma. *Clin Biochem.*, 40, 1378-1385.

Lepak,A.J., Marchillo,K., Vanhecker,J., Andes,D.R., 2013. Posaconazole pharmacodynamic target determination against wild-type and Cyp51 mutant isolates of *Aspergillus fumigatus* in an in vivo model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 579-585.

Lewis,R.E., 2011. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin. Proc.*, 86, 805-817.

Mavridou,E., Bruggemann,R.J., Melchers,W.J., Mouton,J.W., Verweij,P.E., 2010a. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54, 860-865.

Mavridou,E., Bruggemann,R.J., Melchers,W.J., Verweij,P.E., Mouton,J.W., 2010b. Impact of *cyp51A* mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54, 4758-4764.

Muller,C., Arndt,M., Queckenberg,C., Cornely,O.A., Theisohn,M., 2006. HPLC analysis of the antifungal agent posaconazole in patients with haematological diseases. *Mycoses*, 49 Suppl 1, 17-22.

Nomeir,A.A., Kumari,P., Hilbert,M.J., Gupta,S., Loebenberg,D., Cacciapuoti,A., Hare,R., Miller,G.H., Lin,C.C., Cayen,M.N., 2000. Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 727-731.

Pascual,A., Calandra,T., Bolay,S., Buclin,T., Bille,J., Marchetti,O., 2008. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin. Infect. Dis.*, 46, 201-211.

Pascual,A., Nieth,V., Calandra,T., Bille,J., Bolay,S., Decosterd,L.A., Buclin,T., Majcherczyk,P.A., Sanglard,D., Marchetti,O., 2007. Variability of voriconazole plasma levels measured by new high-performance liquid chromatography and bioassay methods. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 137-143.

Pennick,G.J., Clark,M., Sutton,D.A., Rinaldi,M.G., 2003. Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 2348-2350.

Rochat,B., Pascual,A., Pesse,B., Lamoth,F., Sanglard,D., Decosterd,L.A., Bille,J., Marchetti,O., 2010. Ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry and sensitive bioassay methods for quantification of posaconazole plasma concentrations after oral dosing. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54, 5074-5081.

Salas,V., Pastor,F.J., Calvo,E., Sutton,D.A., Chander,J., Mayayo,E., Alvarez,E., Guarro,J., 2012a. Efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated infection caused by *Apophysomyces variabilis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 67, 1712-1715.

Salas,V., Pastor,F.J., Calvo,E., Sutton,D.A., Chander,J., Mayayo,E., Alvarez,E., Guarro,J., 2012b. Efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated infection caused by *Apophysomyces variabilis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 67, 1712-1715.

Steinmann,J., Huelsewede,J., Buer,J., Rath,P.M., 2011. Comparison and evaluation of a novel bioassay and high-performance liquid chromatography for the clinical measurement of serum voriconazole concentrations. *Mycoses*, 54, e421-e428.

Trifilio,S., Pennick,G., Pi,J., Zook,J., Golf,M., Kaniecki,K., Singhal,S., Williams,S., Winter,J., Tallman,M., Gordon,L., Frankfurt,O., Evens,A., Mehta,J., 2007. Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer*, 109, 1532-1535.

Trifilio,S.M., Yarnold,P.R., Scheetz,M.H., Pi,J., Pennick,G., Mehta,J., 2009. Serial plasma voriconazole concentrations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 1793-1796.

Vallor,A.C., Kirkpatrick,W.R., Najvar,L.K., Bocanegra,R., Kinney,M.C., Fothergill,A.W., Herrera,M.L., Wickes,B.L., Graybill,J.R., Patterson,T.F., 2008. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 2593-2598.

A 3D illustration of four stylized human figures holding a large globe made of puzzle pieces. The globe is composed of several interlocking puzzle pieces, with one piece missing from the top. The figures are positioned around the globe, appearing to support it. The entire scene is rendered in a light, semi-transparent style.

## 5.- Conclusiones.

1.- Los métodos cromatográficos desarrollados para cuantificar itraconazol, su metabolito hidroxitraconazol, voriconazol y posaconazol cumplen con los criterios de recomendados en los procesos de validación de métodos bioanalíticos. Han demostrado ser métodos fiables, y reproducibles para la monitorización de estos antifúngicos en muestras de suero de pacientes tratados.

2. Los métodos microbiológicos desarrollados para cuantificar voriconazol y posaconazol cumplen con los criterios de recomendados en los procesos de validación de métodos bioanalíticos. Han demostrado ser métodos fiables, y reproducibles para la monitorización de pacientes.

3.- La validación cruzada entre métodos biológicos y métodos cromatográficos aporta un valor adicional positivo en cuanto a fiabilidad y reproducibilidad. Desarrollar e implementar métodos precisos, sensibles y exactos no es fácil. Estos deben someterse a procesos de validación complejos y a veces tediosos, así como estar sometidos a controles de calidad externos para detectar desviaciones en la calidad analítica y aplicar las mejoras y las medidas correctoras necesarias

4. Los métodos desarrollados han demostrado ser herramientas útiles en ensayos preclínicos con modelos animales, para establecer relaciones exposición –respuesta con azoles.

5- Los modelos animales presentados demuestran ser útiles en la evaluación de parámetros PK/PD y en la evaluación de correlaciones *in vitro-in vivo*. La emergencia de *Aspergillus fumigatus* resistentes a azoles pueden comprometer el tratamiento con estos fármacos, sobre todo con voriconazol y posaconazol como agente de primera línea para la prevención de infección fúngica invasora en pacientes de riesgo. En los modelos descritos se obtienen parámetros PK/PD similares a los descritos en la bibliografía, lo que permite establecer la validez de estos modelos como paso previo de cribado a la evaluación clínica

5.- Las concentraciones séricas de los tres fármacos en los diferentes pacientes y en las diferentes muestras obtenidas de cada uno de ellos son muy variables, lo que unido a las características farmacocinéticas complejas justifican la monitorización de las concentraciones séricas de los tres fármacos.

6. Estas metodologías aportan interesantes aplicaciones en el manejo y racionalización del tratamiento con antifúngicos azólicos,

7.- La evaluación de la utilidad de la monitorización de voriconazol en pacientes en tratamiento presentada en esta tesis, muestra conclusiones interesantes que son corroboradas por publicaciones tanto previas como posteriores. Por lo tanto nuestro estudio, pese al carácter

retrospectivo y la limitación en el número de pacientes corrobora la realidad actual de los resultados de la monitorización de voriconazol hasta el momento de su publicación.

