



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**FACULTAT DE MEDICINA**

**DEPARTAMENT DE MEDICINA**

***PROFILAXIS DE LA INFECCIÓ PER ASPERGILLUS CON  
ANFOTERICINA B NEBULIZADA EN PACIENTES TRASPLANTADOS  
PULMONARES***

Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía

**Presentada por: Víctor Monforte Torres**

Licenciado en Medicina y Cirugía

**Directores de la Tesis: Dr. Antonio Román Broto**

Hospital Vall d'Hebron

Universitat Autònoma de Barcelona

**Dr. Joan Gavalda Santapau**

Hospital Vall d'Hebron

Universitat Autònoma de Barcelona

*A mi querida familia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento a todas las personas que con su esfuerzo y dedicación han colaborado en la realización de los estudios que constituyen la presente tesis. En especial al Dr. Antonio Román y al Dr. Joan Gavaldà por su apoyo y orientación.

***Artículos que constituyen la presente tesis:***

- *Nebulized Amphotericin B Prophylaxis for Aspergillus Infection in Lung Transplantation: Study of Risk Factors.* Monforte V, Roman A, Gavaldà J, Bravo C, Tenorio L, Ferrer A, Maestre J, Morell F. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:1274-1281.
  
- *Nebulized Amphotericin B Concentration and Distribution in the Respiratory Tract of Lung-Transplanted Patients.* Monforte V, Roman A, Gavaldà J, López R, Pou L, Simó M, Aguadé S, Soriano B, Bravo C, Morell F. *Transplantation* 2003;75:1571-1574.

## **ABREVIATURAS**

AB	Anfotericina B
BAL	Lavado broncolalveolar
BAS	Broncoaspirado
BOS	Síndrome de bronquiolitis obliterante
CMV	Citomegalovirus
FEV <sub>1</sub>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
HEPA	High-Efficiency Particulate Air
nAB	Anfotericina B nebulizada
nAB-99mTc	nAB marcada con Tecnecio
TP	Trasplante de pulmón

## **ÍNDICE**

	Págs.
<b>1. Introducción al trasplante de pulmón</b>	
1.1. Supervivencia.....	8
1.2. Capacidad funcional.....	12
1.3. Calidad de vida.....	13
1.4. Complicaciones.....	14
1.4.1. Lesión por isquemia reperusión.....	14
1.4.2. Complicaciones de la vía aérea.....	15
1.4.3. Complicaciones inmunológicas.....	16
1.4.4. Complicaciones infecciosas no fúngicas.....	19
1.4.5. Complicaciones infecciosas fúngicas.....	22
<b>2. Introducción a la Aspergilosis</b>	
2.1. Concepto.....	23
2.2. Etiología.....	23
2.3. Epidemiología.....	24
2.4. Patogenia.....	26
2.5. Anatomía Patológica.....	29
2.6. Formas Clínicas.....	30
2.6.1. Aspergilosis respiratorias de causa inmuno-alérgica.....	30
2.6.2. Aspergilosis de colonización.....	32
2.6.3. Aspergilosis invasiva.....	35
2.6.4. Aspergilosis nosocomial epidémica.....	43
2.7. Tratamiento.....	44
2.8. Profilaxis.....	47

<b>3. Justificación.....</b>	<b>48</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>51</b>
<b>5. Resumen Global de los resultados.....</b>	<b>52</b>
<b>6. Discusión.....</b>	<b>56</b>
<b>7. Conclusiones finales</b>	
7.1. Principales.....	60
7.2. Secundarias.....	61
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>63</b>
<b>9. Publicaciones.....</b>	<b>85</b>

## **1. INTRODUCCIÓN AL TRASPLANTE DE PULMÓN.**

Desde su aparición a inicios de los años ochenta, el trasplante de pulmón (TP) se ha consolidado como una opción terapéutica para pacientes seleccionados en situación de insuficiencia respiratoria crónica. En los pacientes con afectación funcional grave, el TP ofrece la posibilidad de aumentar la calidad de vida y seguramente de alargarla. Sin embargo, el curso postoperatorio no está exento de complicaciones que pueden deteriorar la función pulmonar a largo plazo y acortar la vida del paciente.

### **1.1. SUPERVIVENCIA**

La supervivencia de los pacientes portadores de TP es del 73%, 57% y 45% a uno, 3 y 5 años, respectivamente según los datos del registro de la Sociedad Internacional de Trasplante Cardíaco y Pulmonar (1). La supervivencia de los pacientes sometidos a trasplante pulmonar en Inglaterra entre los años 1995 y 1999 fue del 53,8% a tres años y el tiempo de espera medio para el trasplante de 386 días (2). Se puede decir que, a pesar de las importantes mejoras de la técnica quirúrgica y de los cuidados del postoperatorio inmediato, las posibilidades de sobrevivir a un TP sólo han mejorado discretamente en la última década. Probablemente esta mejora discreta refleja fundamentalmente la superación de la fase de entrenamiento de muchos grupos de trasplante. Estos resultados están claramente por debajo de los que se obtienen en otros

trasplantes órganos como el corazón o el hígado cuya supervivencia llega al 70% a los cinco años.

Es difícil saber si el TP alarga realmente la vida de los pacientes comparando con la historia natural de la enfermedad de base. Sin embargo, no parecen planteables ensayos clínicos a este nivel. Como mínimo, son necesarios estudios epidemiológicos longitudinales con un gran número de pacientes afectados de las enfermedades, que constituyen indicación de TP, para poder identificar los factores pronósticos. Estos estudios son escasos, y los modelos pronósticos extraídos de ellos difíciles de aplicar a un paciente concreto. El estudio más importante ha sido el de Hosenpud y col. (3), quienes encontraron que el TP ofrece una mayor posibilidad de supervivencia desde el mismo día de la intervención a los pacientes con fibrosis pulmonar y fibrosis quística, pero menor en los pacientes con enfisema trasplantados respecto a los que permanecen en las listas de espera. Charman y col. (4) en un estudio retrospectivo de más de 600 pacientes trasplantados en la Universidad de Cambridge demuestran que todos los pacientes, independientemente de su diagnóstico, se beneficiaron del trasplante pulmonar en términos de supervivencia. De Meester y col. analizaron los datos de Eurotransplant entre 1990 y 1996, y observaron un beneficio en la supervivencia en todos los diagnósticos, aunque algo más tardío en el enfisema (5). Se ha de considerar que el pronóstico del enfisema en fases avanzadas es difícil de establecer y se fundamenta en estudios de hace unos 30 años. Según estos estudios, la inclusión de los pacientes en lista de

espera se realizaba cuando presentaban un FEV<sub>1</sub>(volumen forzado espiratorio en el primer segundo) inferior al 30%. A partir del consenso de 1998, se considera que los pacientes con enfisema han de presentar un FEV<sub>1</sub> inferior al 25% para poder ser incluidos (6). Actualmente otros parámetros más complejos se empiezan a usar para determinar el momento del trasplante, es el caso del índice BODE. El índice BODE esta constituido por el índice de masa corporal, porcentaje del teórico FEV<sub>1</sub>, distancia en el test de la marcha de 6 minutos y grado de disnea, y parece ser un buen parámetro para determinar el pronóstico de la EPOC (7). Así, la supervivencia con índice BODE de 7 o mayor parece ser superior con el trasplante que con el tratamiento médico habitual (8). No solo se ha ido perfilando mejor a los candidatos a TP con enfisema, sino que también han aparecido estudios en otras patologías que ayudan a decidir el mejor momento para indicar el TP. Así, Liou y col. (9), en un estudio con datos obtenidos del Registro Americano de la Fundación de la Fibrosis Quística de 468 pacientes con TP y 11630 controles entre 1992 y 1997, observaron que los pacientes con fibrosis quística con posibilidades de sobrevivir inferiores al 30% en 5 años son los que se van ha beneficiar claramente del TP. Sin embargo, no existía correlación entre el FEV<sub>1</sub> y el pronóstico en los pacientes con fibrosis quística. De tal forma que pacientes con un FEV<sub>1</sub> menor del 30% sobrevivían más del 70 % a los dos años, mientras que un 30% de pacientes con un FEV<sub>1</sub> mayor del 30% no superaban los dos años. Estos resultados contrastan con trabajos previos en los que se observaba que los pacientes con fibrosis quística con

FEV<sub>1</sub> inferior al 30% presentaban una supervivencia inferior al 50% a los dos años (6). Otros factores pronósticos distintos del FEV<sub>1</sub> han adquirido importancia, la colonización por *Staphylococcus aureus* o *Burkholderia cepacia*, el estado nutricional, el sexo, la diabetes y el número de exacerbaciones. En resumen, el análisis ponderado de la situación clínica del paciente junto con la presencia o no de estos factores parece el mejor método para poder efectuar una indicación correcta de TP en cada paciente en concreto.

La mortalidad en el TP es mayor en el postoperatorio temprano y durante el primer año. En el postoperatorio, las infecciones y el fallo primario del injerto son las principales causas. Mediante análisis multivariante se han identificado factores de riesgo de muerte temprana después del TP. Entre estos se incluyen el diagnóstico preoperatorio de hipertensión pulmonar, dependencia de ventilación mecánica antes del TP, edad del receptor o del donante mayor de 50 años (10). La supervivencia es algo menor en los pacientes sometidos a trasplante unipulmonar respecto a los sometidos a trasplante bipulmonar (1). En ambos grupos la supervivencia esta limitada principalmente por el desarrollo de rechazo crónico que condiciona insuficiencia respiratoria progresiva e incremento del riesgo de infecciones. Por otra parte, la edad por encima de 55 años y el diagnóstico de fibrosis pulmonar se asocian a una menor supervivencia a largo plazo (10). Pierre y col. (11), en un estudio retrospectivo, observaron mayor mortalidad en los pacientes en los que se habían utilizado donantes marginales. Se considero que los donantes eran

marginales si tenían una edad superior a 55 años, pO<sub>2</sub> inferior a 300 mmHg, secreciones purulentas o infiltrados radiológicos.

## **1.2. CAPACIDAD FUNCIONAL**

La gran mayoría de pacientes que son capaces de superar el TP, tengan una enfermedad obstructiva o restrictiva, reciban un trasplante unipulmonar o bipulmonar, consiguen mejorar de forma muy importante su función pulmonar. Característicamente, la mejor función pulmonar se consigue entre el cuarto y sexto mes, cuando la convalecencia de la intervención es superada: Se solucionan las lesiones pulmonares por preservación, desaparece el dolor y se normaliza la función muscular y la biomecánica de la caja torácica. La función pulmonar medida por espirometría se puede normalizar en un trasplante pulmonar bilateral y alcanzar hasta un 70% del valor teórico en un trasplante unipulmonar. Después de un TP no complicado se observa una normalización del intercambio gaseoso con recuperación de la oxigenación que permite la retirada de la oxigenoterapia a los pocos días del trasplante en prácticamente todos los pacientes. Los pacientes con hipercapnia antes del trasplante pueden tardar tres o cuatro semanas en corregirla. Desde el punto de vista hemodinámico, los pacientes con enfermedades pulmonares vasculares normalizan la presión y las resistencias pulmonares en el postoperatorio inmediato. Además, se observa una mejora inmediata en el gasto cardiaco y un remodelado progresivo del ventrículo derecho con

normalización del grosor de la pared ventricular derecho en unos meses. Esta normalización persiste a lo largo del tiempo.

La capacidad de ejercicio mejora lo suficiente para que la gran mayoría de los receptores de TP consigan un estilo de vida sin restricciones físicas. Al final del primer año del postoperatorio, aproximadamente el 80% de los receptores de TP no tienen limitaciones para la actividad física (10). La mayor parte de los pacientes duplican el número de metros caminados en el test de la marcha. Sin embargo, en test de esfuerzos más complejos se ha visto que los receptores de TP presentan una capacidad de ejercicio reducida que no se corrige a lo largo del tiempo. A pesar de que los pacientes no presenten limitación cardíaca o ventilatoria evidente, el consumo máximo de oxígeno se sitúa entre el 40 y el 60% de los valores de referencia (12). En estos pacientes se observa también un descenso del umbral anaeróbico y se ha observado una defectuosa utilización del oxígeno a nivel periférico, lo cual sugiere que podrían existir problemas musculares periféricos inducidos por los inhibidores de la calcineurina (13-15).

### **1.3. CALIDAD DE VIDA**

Uno de los aspectos evaluables más importante en estos pacientes es la calidad de vida. Los escasos estudios existentes han observado un incremento de la calidad de vida a los pocos meses del TP (16) y un descenso dramático de la calidad de vida tras el diagnóstico de rechazo crónico (17). Sin embargo, esta mejora evidente de la capacidad de ejercicio y de la calidad

de vida en el postoperatorio del TP no ha repercutido claramente en la vuelta al trabajo de un número substancial de pacientes. De hecho, los datos existentes demuestran que, en el mejor de los casos, menos del 40% de los pacientes vuelven a tener una vida laboral activa en el postoperatorio (10). También los niños que consiguen volver a la escuela después del trasplante presentan un rendimiento menor que sus compañeros (18)

#### **1.4. COMPLICACIONES**

**1.4.1. Lesión por isquemia reperfusión:** La mayor parte de los receptores de TP presentan un edema pulmonar moderado en el postoperatorio inmediato. En uno de cada 6-8 pacientes este edema es grave y se comporta como un distrés respiratorio del adulto. Cuando esto ocurre se habla de fallo primario del injerto y sus mecanismos fisiopatológicos se engloban en el concepto de lesión de isquemia-reperfusión. Aunque el trauma quirúrgico y las alteraciones de la circulación linfática pulmonar y pleural también contribuyen al desarrollo de la lesión de isquemia-reperfusión, esta lesión se minimiza con la mejora de la preservación pulmonar durante el tiempo de isquemia fría. El diagnóstico se basa, una vez excluidas otras causas, en la presencia de infiltrados pulmonares más o menos importantes en la radiografía de tórax e hipoxemia en los primeros tres días del postoperatorio. Un estudio retrospectivo (19) han sugerido que la mortalidad asociada al fallo primario del injerto esta relacionada con la edad del paciente, el tiempo de isquemia fría, el grado de hipoxemia inicial y la situación hemodinámica del paciente.

La prevención mediante la realización del TP en el tiempo de isquemia fría más corto posible y la utilización de la solución de preservación más adecuada (20) es el mejor tratamiento. Además, mantener el pulmón en una situación de relativa “deshidratación” tanto en el donante como una vez implantado parece que también puede minimizar este tipo de lesión. Recientemente, Fiser y col. (21) han demostrado que una reperfusión lenta y controlada evita en gran medida las lesiones de isquemia-reperfusión. De hecho la mortalidad es alta cuando las lesiones son importantes y el intercambio gaseoso malo. Sin embargo, los pacientes que se recuperan suelen conseguir una función pulmonar normal (22).

**1.4.2. Complicaciones de la vía aérea:** Las anastomosis de la vía aérea representan una fuente de complicaciones que afectan entre el 5 y el 15 % de los pacientes (23). Se asume que el entrenamiento quirúrgico puede ayudar a bajar la incidencia de estas complicaciones. La rotura total de la anastomosis bronquial es rara pero muy grave, implicando la muerte del paciente en la inmensa mayoría de los casos. Se ha abogado por el retrasplante como única solución en estos casos. La rotura parcial de la anastomosis bronquial se ha de manejar de forma conservadora intentando reducir todos los factores que impliquen un aumento de la tensión en la sutura, especialmente la ventilación mecánica. La estenosis de la anastomosis bronquial es la complicación más frecuente. Generalmente se puede tratar bien con dilataciones neumáticas con balón mediante fibrobroncoscopia o mediante dilataciones con broncoscopio rígido y, en el caso de que exista broncomalacia que comporte

colapso bronquial, se puede corregir mediante la instalación de una prótesis endobronquial (24).

**1.4.3. Complicaciones inmunológicas:** La mayor parte de los pacientes sometidos a TP presentaron en el postoperatorio inmediato algún episodio de rechazo agudo. De hecho la mayor incidencia de esta complicación esta en los primeros cien días y va disminuyendo a lo largo del primer año (25). Este problema es común a todos los pacientes aunque parece que es menos prevalente en niños de menos de un año (26).

Se asume que la ausencia de coincidencias en el sistema HLA representa un riesgo de rechazo agudo y probablemente de rechazo crónico (26). La clínica del rechazo agudo va del rechazo asintomático, en un tercio de las biopsia transbronquial de control se encuentran lesiones de rechazo leve a moderado (27), hasta cuadros severos infiltrados pulmonares, fiebre e hipoxemia severa. Dado la inespecificidad del cuadro clínico, el diagnóstico del rechazo agudo debe intentar realizarse histológicamente (28). Se considera necesario obtener unos 5 fragmentos de uno o más lóbulos para que la biopsia transbronquial tenga el máximo rendimiento. En esas condiciones, la sensibilidad estimada de este procedimiento es de alrededor del 75% (29). La observación de linfocitos infiltrando en diversa intensidad los vasos sanguíneos es el hallazgo característico. El tratamiento consiste en metilprednisolona. En los casos más severos un bolus diario de entre 10 y 15 mg/kg tres días consecutivos con descenso posterior a la dosis previa de corticoesteroides en una a dos semanas. Con este tratamiento, la respuesta

suele ser espectacular en la mayoría de los pacientes, especialmente si el episodio ocurre en las primeras semanas. En casos más leves, dosis de 1 mg/kg de peso durante 10 días son suficientes. En un tercio de los pacientes se pueden observar persistencia del rechazo agudo tras el tratamiento. En estos casos, se ha de valorar la optimización del tratamiento inmunosupresor del paciente dada la posibilidad de evolución a rechazo crónico (30;31).

El rechazo crónico o síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS) es, junto con las infecciones, el problema de más importancia en el postoperatorio del TP. De hecho, pasado el primer año, representa la principal causa de muerte de los pacientes portadores de TP. Histológicamente se manifiesta por la presencia de bronquiolitis obliterante constrictiva que es mucho más difícil de demostrar que el rechazo agudo mediante biopsia transbronquial (32). Sin embargo, el reconocimiento sindrómico de este proceso no suele ser problemático. El diagnóstico se realiza por caída del 20% del FEV1 con respecto al basal no explicable por otras causas (33). De hecho, en la actualidad, existe consenso en que no es necesario el diagnóstico histológico para el diagnóstico de BOS (34).

El factor de riesgo reconocido como más importante para el desarrollo de BOS son los episodios de rechazo agudo. Otros factores de riesgo son la neumonitis citomegálica, la bronquitis linfocitaria, la isquemia de la vía aérea y la ausencia de coincidencia del sistema HLA entre donante y receptor (33;35-37).

La aparición de BOS es poco común en los primeros seis meses del postrasplante pero posteriormente su prevalencia se va incrementando progresivamente y suele afectar entre el 60 y 70% de los pacientes que viven al cabo de 5 años (33;35). Clínicamente se manifiesta por ser un proceso asintomático en los primeros meses, para aparecer en fases avanzadas disnea, tos y expectoración. Posteriormente, estos episodios de tos y expectoración se complican con la colonización por patógenos, especialmente por *P. aureuginosa* y por *Aspergillus* spp. La espirometría demuestra una obstrucción progresiva al flujo aéreo, la radiografía de tórax no suele demostrar alteraciones importantes en fases iniciales y la tomografía computerizada de tórax puede demostrar la presencia de atrapamiento aéreo, especialmente en espiración, y bronquiectasias en fases avanzadas.

La historia natural es variable. Así el espectro va, desde algunos pacientes que permanecen estables durante mucho tiempo, a otros con una rápida caída del FEV1 que les lleva en pocos meses a la insuficiencia respiratoria y a la muerte. Los pacientes que presentan BOS más tardíamente, presentan una evolución mejor que los que lo hacen precozmente (38).

Ninguno de los múltiples tratamientos ensayados para detener la progresión del BOS ha demostrado claramente que cambie el curso de la enfermedad de una forma substancial. Tacrolimus, micofenolato, diferentes tipos de anticuerpos citolíticos, irradiación linfática total y algún otro tratamiento más han sido probados. Los resultados de la mayoría de ellos muestran cierta utilidad pero son estudios con muchas limitaciones dado que son

retrospectivos o faltos de grupo control (30;39;40). El pronóstico de BOS es malo con una mortalidad cercana a la mitad de los pacientes en dos años (39).

**1.4.4. Complicaciones Infecciosas (no fúngicas):** La frecuencia de infecciones respiratorias en el paciente portador de un TP es mucho más elevada que en otros trasplantes de órganos. Una de las principales razones es que el pulmón es el único órgano trasplantado que está en contacto con el exterior. Además existen otros factores, como son el tratamiento inmunosupresor, la denervación que sufre el árbol bronquial (que implica la abolición del reflejo tusígeno), el deficiente drenaje linfático, el deficiente aclaramiento mucociliar (por la isquemia de la mucosa bronquial) y la mala función macrofágica que disminuye la eficiencia de los mecanismos de defensa alveolar. Las infecciones más frecuentes son las bacterianas, con episodios de traqueobronquitis y neumonía especialmente en los primeros días del postoperatorio. También aparecen frecuentemente episodios de bronquitis en los pacientes que desarrollan rechazo crónico, los cuales pueden evolucionar en fases avanzadas hacia la insuficiencia respiratoria crónica con bronquiectasias difusas (41). En todas estas infecciones son los bacilos gram-negativos, especialmente la *P. aeruginosa*, los más frecuentemente implicados (42). No está demostrado que los pacientes que presentan una sepsis bronquial crónica antes del trasplante con afectación de senos paranasales, como la fibrosis quística o las bronquiectasias, tengan una mayor frecuencia de infecciones bacterianas en el postoperatorio. Sin

embargo, se ha demostrado que los gérmenes bacterianos implicados en las infecciones del postoperatorio son en muchos casos las mismas cepas que tenía el paciente antes de la intervención (43).

Otras infecciones bacterianas incluyen la tuberculosis o la infección por *Nocardia*. La tuberculosis es mucho más frecuente en la población trasplantada que en la población general, por lo que el uso de estrategias de quimioprofilaxis parece adecuado en estos pacientes (44). La incidencia de infección por *Nocardia* en algunos estudios alcanza el 2% de los pacientes con TP (45). Existe un reciente interés por averiguar el papel que juegan los virus respiratorios en el TP. En este sentido Vilchez y col. (46) recogieron 39 casos de infección por influenza y parainfluenza durante 10 años con una considerable morbimortalidad. Otros trabajos también refuerzan la importancia de este tipo de infección (47), incluso se han asociado con el desarrollo de BOS (48;49).

Sin embargo, la infección viral más trascendente en el postoperatorio del TP es la producida por citomegalovirus (CMV). La incidencia global de infección / enfermedad por CMV varía entre un 53 a un 75% según diversos autores (50-52). Estas cifras son mucho más elevadas que las de otro tipo de trasplante de órgano sólido. En los pacientes que no han recibido profilaxis la forma de enfermedad más frecuente es la neumonitis. Se presentan preferentemente entre la segunda semana y el tercer mes, con una máxima incidencia entre la tercera y sexta semana (53). La enfermedad por CMV es un factor de riesgo reconocido para el desarrollo de otras infecciones oportunistas (54), así como

de BOS (25;33). Para poder conseguir minimizar los efectos del citomegalovirus sobre el paciente portador de un TP se han desarrollado diversas estrategias de prevención. En algunos países con una población de seronegativos sobre el 50%, una de las estrategias utilizadas ha consistido en realizar trasplantes de pulmón entre donantes y receptores seronegativos. Sin embargo, la mayor parte de los países de nuestro entorno presentan unas tasas de infección por citomegalovirus mucho más elevadas y en la práctica, la mayor parte de los receptores y donantes han tenido contacto previamente con el virus. En todos estos casos, el uso de ganciclovir durante las primeras semanas o meses del postoperatorio ha demostrado ser útil retrasando la aparición de enfermedad y disminuyendo su gravedad (52;55;56). Otras estrategias más recientes tratan de evitar la realización de profilaxis universal mediante la detección precoz de la replicación vírica (terapia anticipativa) (57-60). La posibilidad que la viremia también sea un factor de riesgo para BOS (61), el posible desarrollo de resistencias del CMV al ganciclovir (59), así como la dificultad de la logística de este tipo de profilaxis, limitan su utilidad. Otra de las medidas profilácticas recomendada por algunos autores es la administración coadyuvante de inmunoglobulinas para CMV. Los resultados de este tipo de profilaxis son contradictorios (62-64). La aparición de profármacos del ganciclovir con una alta biodisponibilidad parece la más prometedora estrategia de profilaxis (65). Es el caso del valganciclovir, que se ha demostrado en otros órganos como una eficaz y segura profilaxis (66;67). Los datos en el TP también apuntan en esta dirección (68;69).

**1.4.5. Complicaciones Infecciosas fúngicas:** La infección por hongos es una causa importante de morbilidad y de mortalidad en el TP (70). La infección fúngica más frecuente en esta población es la causada por *Aspergillus* spp. Esta infección, a pesar de un diagnóstico temprano y un tratamiento agresivo, presenta una mortalidad muy elevada (70-73). Los pacientes receptores de este tipo de trasplante son particularmente susceptibles. Por una parte, el pulmón es el único órgano trasplantado que tiene contacto directo con el ambiente. Por otra, la anastomosis bronquial durante las primeras semanas presenta un grado variable de isquemia que propicia la proliferación fúngica. De hecho, estas peculiaridades determinan formas clínicas de infección por *Aspergillus* spp. muy específicas del TP. Se caracterizan por la afectación de la vía aérea en diversos grados, desde una forma leve como es una traqueobronquitis simple, con una mucosa eritematosa y un aumento de las secreciones, hasta formas más graves como serían traqueobronquitis con formación de úlceras o pseudomembrana, muchas veces en la zona de la anastomosis bronquial (73). La afectación del parénquima pulmonar es la forma más grave, y también la menos frecuente de todas las formas de infección por *Aspergillus* spp. en el TP. La incidencia de esta forma de infección por *Aspergillus* spp. oscila entre un 5% y 20% (70-72;74-77). Esta forma, con muy mal pronóstico a pesar del tratamiento, es común también a otros tipos de trasplantes.

## **2. INTRODUCCIÓN A LA ASPERGILOSIS**

### **2.1. CONCEPTO**

Las aspergilosis son un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades oportunistas causadas por hongos filamentosos del género *Aspergillus* spp. Son micosis no contagiosas, esporádicas y cosmopolitas, producidas por diferentes mecanismos patogénicos. Las formas clínicas de presentación son de diferente gravedad y éstas dependen fundamentalmente de factores relacionados con el huésped. La definición excluye, por tanto, las enfermedades causadas por toxinas (micotoxinas). Las formas viscerales invasivas y diseminadas son infecciones de extrema gravedad y evolución aguda que se dan principalmente en enfermos inmunodeprimidos, sobretodo en los que sufren neutropenias graves y prolongadas. En los últimos años se han descrito también epidemias de aspergilosis invasivas nosocomiales.

### **2.2 ETIOLOGÍA**

Las numerosas especies del género *Aspergillus* spp. se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Son por tanto, especies cosmopolitas de distribución universal. Sólo unas pocas especies, de las más de 500 que se incluyen en el género *Aspergillus* spp, se han descrito como causantes de patología en el hombre. *A. fumigatus* es la de mayor interés médico, especialmente como causa de enfermedad invasiva en enfermos inmunodeprimidos. Otras especies que pueden causar enfermedad invasiva son: *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, etc.

*A. niger* se aísla con mayor frecuencia en casos de otomicosis y otras formas de aspergilosis de colonización.

Las especies del género *Aspergillus* spp. son termófilas, capaces de crecer a temperaturas superiores a 50°C, lo que posibilita su desarrollo en restos orgánicos (estiércol, vegetación muerta) calentados por reacciones de fermentación bacteriana. En el laboratorio se desarrollan con facilidad y rapidez en medios de cultivo ordinarios dando lugar a colonias de textura y colores variados según las especies. La multiplicación asexual (anamórfica) es muy característica y permite su identificación, al menos a nivel de género. Los conidióforos terminan en una vesícula, de cuya superficie nacen formaciones digitiformes, perpendiculares a su superficie (fiálides), en cuyo interior se producen las conidias. En algunas especies las fiálides se presentan en dos filas o series, las de la primera fila se denominan métulas o profiálides. Las conidias emergen a través del extremo libre de las fiálides constituyendo cadenas. Las conidias varían según la especie en forma, tamaño y color.

### **2.3. EPIDEMIOLOGÍA**

*Aspergillus* spp. es un hongo ubicuo en la naturaleza que crece bien en tierra, agua, hojas, semillas y fundamentalmente en el abono orgánico. Las principales especies de *Aspergillus* spp. que se han asociado con infección en humanos incluyen *A. fumigatus*, *A. terreus* y *A. flavus*. *Aspergillus* spp. tiene un ciclo biológico muy simple y una de sus características principales es la

alta capacidad de esporulación y como consecuencia, la generación de concentraciones altas de esporas en el aire . Aunque los humanos inhalan continuamente esporas de *Aspergillus* spp, estas son eliminadas eficientemente por el sistema inmune y raramente producen enfermedad. Sin embargo, durante los últimos 10-20 años debido al aumento del número de personas con inmunosupresión esta situación ha cambiado. En la actualidad, *A. fumigatus* es uno de los principales patógenos que causa enfermedad invasora, normalmente fatal, en pacientes inmunocomprometidos. *Aspergillus* spp. se ha aislado en sistemas de ventilación, aire, agua, superficies, comida, plantas y a partir de polvo generado durante trabajos de construcción y renovación de edificios. La presencia de esporas de *Aspergillus* spp. en el ambiente hospitalario constituye el mayor factor de riesgo extrínseco para el desarrollo de la aspergilosis invasiva. Las obras de construcción y renovación alrededor de los hospitales aumenta considerablemente el número de esporas en el ambiente y se asocian, con relativa frecuencia, con el desarrollo de aspergilosis de origen nosocomial (78).

Los estudios epidemiológicos y la caracterización molecular de *Aspergillus* spp. ha planteado problemas debido al desconocimiento genético de esta especie. Actualmente, la secuencia del genoma de *A. fumigatus* está disponible por lo que se producirá un avance más rápido en este campo (79). Diversos métodos de caracterización molecular específica han demostrado ser útiles para el análisis epidemiológico de distintas especies de *Aspergillus* spp. y en la determinación de la relación genética entre cepas. La detección

de polimorfismos en fragmentos generados con enzimas de restricción (RFLP) y posterior hibridación con sondas de DNA (Afut1) es una técnica muy laboriosa que necesita de laboratorios y personal especializados pero que ha sido utilizada para demostrar la clonalidad entre cepas de *Aspergillus* spp. implicadas en brotes de infección nosocomial. Las técnicas de PCR, utilizando iniciadores inespecíficos (RAPD) o iniciadores dirigidos a secuencias repetidas (PCR-fingerprinting), han demostrado ser útiles, rápidas y de fácil aplicación en el laboratorio de microbiología, aunque carecen de la reproducibilidad necesaria para estudios epidemiológicos desarrollados a lo largo del tiempo. Con el aumento del conocimiento genético de *A. fumigatus*, se están desarrollando modificaciones de estas técnicas de PCR con el fin de mejorar su reproducibilidad (80). Diferentes estudios que han estudiado múltiples cepas de *A. fumigatus* han observado gran variabilidad en función del área geográfica y también dentro de un mismo hospital lo que demuestra la elevada biodiversidad de este hongo (81;82).

#### **2.4. PATOGENIA**

*A. fumigatus* no es un patógeno habitual en el huésped humano sano ya que sus esporas son eliminadas eficazmente por el sistema inmune. La defensa del huésped frente a la aspergilosis es fundamentalmente un mecanismo innato. La colonización del epitelio mucoso y la interacción inicial con las células del huésped está considerado como el momento crucial en el establecimiento de la enfermedad y por tanto se ha sugerido que *A. fumigatus*

produce sustancias biológicas activas (gliotoxina, etc) que lentifican el movimiento ciliar y dañan el epitelio favoreciendo la colonización de las vías aéreas. Las esporas de *A. fumigatus* tienen un tamaño suficientemente pequeño (2-3  $\mu\text{m}$ ) para alcanzar el alveolo pulmonar. Cuando existe un defecto inmunitario congénito o inducido por medicación, las características biológicas del hongo son suficientes para que se comporte como patógeno. Las esporas que resisten los mecanismos de defensa inmune del huésped pueden germinar, desarrollar micelio e invadir el tejido pulmonar. Los mecanismos de defensa del huésped frente al hongo son: (a) En primer lugar, en el huésped sano los cilios del epitelio pulmonar excluyen las esporas inhaladas. Algunos tratamientos junto con las enzimas y toxinas segregados por el hongo podrían dañar el epitelio o inhibir el movimiento ciliar; (b) Los macrófagos alveolares son la primera línea de defensa inmune inespecífica, responsables de la ingestión y destrucción de las conidias inhaladas. Incluso en el huésped inmunocompetente, la interacción y posterior fagocitosis de la espora por parte de los macrófagos alveolares y la eliminación de la misma es un proceso lento e ineficiente que no ocurre hasta pasados 2-3 días después de la inhalación. Las conidias que escapan de los macrófagos germinan y forman hifas que invaden el parénquima pulmonar. (c) Los polimorfos nucleares acuden al foco de infección especialmente después de la germinación extracelular, se adhieren a la superficie de las hifas y activan la bolsa respiratoria, con secreción de los intermediarios del oxígeno y degranulación. Este proceso es muy rápido y el 50% de las hifas muere

transcurridas dos horas. Uno de los pasos clave en el establecimiento de la aspergilosis pulmonar es la resistencia de *A. fumigatus* a la fagocitosis y la lenta eliminación de las hifas. Aunque se ha demostrado el papel esencial que tienen en este paso los macrófagos alveolares y los neutrófilos, se desconocen los mecanismos moleculares responsables de los mismos. Hasta la fecha no se han identificado verdaderos factores de virulencia esenciales para el desarrollo de *A. fumigatus* en pulmón por lo tanto se especula que la virulencia de este hongo esta directamente relacionada con sus características biológicas específicas (amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, pequeño diámetro de las esporas y versatilidad de crecimiento con escasos requerimientos nutritivos)(83). Con respecto a la inmunidad celular, ha sido poco estudiada en la infección por *Aspergillus* spp. Aunque existen modelos experimentales en ratones que han estudiado el papel desempeñado por los diferentes tipos de células T y la liberación de citoquinas asociadas a las mismas, no existen estudios en humanos. El papel de estas células únicamente es evidente por el aumento de incidencia de la aspergilosis invasiva observada en pacientes con inmunodeficiencias y en aquellos infectados por virus. La respuesta humoral en pacientes con aspergilosis invasiva no produce ningún grado de protección debido al profundo grado de inmunosupresión de estos pacientes(84).

## 2.5 ANATOMÍA PATOLÓGICA

La histopatología de las distintas formas clínicas de aspergilosis es bastante característica de cada una de ellas.

En la aspergilosis broncopulmonar alérgica hay abundantes hifas y con frecuencia cabezas conidiales en los tapones mucosos y reacción inflamatoria de la pared bronquial. En las formas de aspergilosis de colonización no suele existir invasión de los tejidos y rara vez existe una reacción inflamatoria; se observa una masa de filamentos enmarañados de diámetro constante que no suelen penetrar en el epitelio de la cavidad; pueden verse vesículas, pero es excepcional observar cabezas conidiales. En la enfermedad pulmonar invasiva las hifas suelen penetrar en las paredes de los bronquios y bronquiolos produciendo una neumonitis aguda con necrosis y microabscesos. Las hifas tienen también tendencia a invadir la luz vascular produciendo trombosis que facilitan la diseminación y dan lugar a necrosis hemorrágicas locales. En algunas lesiones las hifas se llegan a distinguir con la tinción de hematoxilina-eosina, pero los detalles morfológicos se observan mejor con tinciones especiales como el PAS o las técnicas argénticas (Grocott-Gomori o Gridley). En las formas invasivas pulmonares y de otros tejidos es característica la disposición radiada de las hifas aspergilaes, de 3-4µm de diámetro, en el centro de un foco necrótico. Las hifas presentan típicas bifurcaciones dicotómicas en ángulo agudo, orientadas en la misma dirección.

## 2.6. FORMAS CLÍNICAS

### 2.6.1. Aspergilosis respiratorias de causa inmuno-alérgica

- *Asma aspergilar*. Las esporas inhaladas de diversas especies de *Aspergillus* spp. actúan como alérgenos, al igual que las de otros hongos anemófilos, desencadenando un cuadro de asma bronquial clásica debida a una reacción de hipersensibilidad de tipo I, con formación de anticuerpos de la clase IgE, que se fijan en la superficie de los mastocitos y basófilos. Con un estímulo posterior y al unirse estos antígenos a los anticuerpos, se producen alteraciones a nivel de la membrana celular, con la consiguiente liberación de mediadores químicos que desencadenan la reacción asmática. La respuesta al estímulo antigénico es inmediata y de corta duración. No existen anticuerpos precipitantes, pero sí reagínicos de la clase IgE, específicos, frente a *Aspergillus* spp.

- *Aspergilosis broncopulmonar alérgica*. Ha sido también denominada bronquitis aspergilar mucomembranosa. Se produce generalmente en enfermos asmáticos y con fibrosis quística. Las esporas de *Aspergillus* spp, al ser inhaladas, son atrapadas en las secreciones bronquiales viscosas de estos enfermos y proliferan. En estos casos, las esporas, además de actuar como alérgenos, producen una infección localizada. Los mecanismos patogénicos implicados consisten en una reacción inmediata de tipo I mediada por anticuerpos IgE y una reacción de hipersensibilidad tipo III. En algunos países ha sido considerada como la causa más frecuente de infiltrados pulmonares recurrentes con eosinofilia. Aunque generalmente afecta a

individuos adultos, también puede darse en niños. Los síntomas clínicos son similares a los del asma, pero más crónicos y severos. Estos enfermos suelen expectorar tapones bronquiales muy purulentos de los que se aísla con regular frecuencia *A. fumigatus* y, excepcionalmente, otras especies. En la radiografía de tórax se observan con frecuencia infiltrados homogéneos fugaces y migratorios, preferentemente localizados en lóbulos superiores. Existe eosinofilia en sangre y esputo. El funcionalismo pulmonar muestra un patrón obstructivo, y en las pruebas de provocación se observa una caída inmediata del FEV<sub>1</sub>, con broncopasmo que se recupera y vuelve a aparecer al cabo de 4-6 horas; puede ir acompañado de fiebre y leucocitosis. En estos enfermos existe un incremento de los anticuerpos de la clase IgE e IgG. Estos últimos pueden demostrarse fundamentalmente por técnicas de inmunoprecipitación en agar. Como consecuencia de ataques recurrentes pueden aparecer bronquietasias proximales. El pronóstico es variable; algunos pacientes desarrollan asma corticodependiente o neumopatía obstructiva crónica con bronquiectasias centrales, mientras que otros no experimentan pérdida permanente de su función pulmonar, a pesar de las frecuentes exacerbaciones.

- *Alveolitis alérgica extrínseca*. Dentro de éstas se incluyen el llamado “pulmón del agricultor” y otras neumopatías afines, que se producen por inhalación repetida de diversos tipos de polvos orgánicos (esporas de determinados actinomicetos termófilos del heno, fúngicas y proteínas de origen aviar). Se trata muchas veces de enfermedades profesionales que se caracterizan por la

presencia de anticuerpos precipitantes específicos, formación de granulomas y un defecto ventilatorio restrictivo en la exploración funcional respiratoria. Los antígenos inhalados provocan la aparición de anticuerpos precipitantes que originan reacciones alérgicas tipo III a nivel de los tejidos de intercambio gaseoso. Se ha sugerido que, en estos casos, se produce también reacción de hipersensibilidad tipo IV. En la forma aguda, los síntomas aparecen 6-10 horas después de la exposición a esporas. El paciente tiene fiebre, escalofríos y en la radiografía de tórax aparecen infiltrados difusos. El cuadro clínico y las lesiones suelen desaparecer espontáneamente a los pocos días. Después de muchos accidentes agudos por la frecuente exposición a los alergenos puede instalarse una forma crónica, con insuficiencia respiratoria severa y fibrosis pulmonar de mal pronóstico. No existe eosinofilia en sangre periférica ni en la biopsia pulmonar.

### **2.6.2. ASPERGILOSIS DE COLONIZACIÓN**

- *Aspergiloma*. *Aspergillus* spp. se desarrolla en una cavidad en comunicación con la luz bronquial formada en el curso de una enfermedad previa. Generalmente se trata de cavernas tuberculosas, quísticas, secundarias a abscesos, de origen neumoconiótico, sarcoidótico, bronquiectásico, etc. Las conidias de *A. fumigatus*, y menos frecuentemente de otras especies, al llegar a estas cavidades donde no existen macrófagos alveolares pueden germinar y desarrollar una masa de micelio intracavitario sin que las hifas penetren en el tejido vecino. Un aspergiloma puede ser perfectamente tolerado durante muchos años sin apenas causar sintomatología. La

hemoptisis, de intensidad variable, suele ser el síntoma más constante; no son infrecuentes las hemoptisis masivas que pueden poner en peligro la vida del enfermo. Un síntoma inespecífico es la tos crónica que presentan a veces estos enfermos. La presencia de fiebre así como síndrome tóxico concomitante es inusual, aunque se observa en algunos casos, así como cuando se produce una infección bacteriana sobreañadida. El aspergiloma puede también observarse como un hallazgo radiológico en enfermos asintomáticos. La localización más frecuente es a nivel de los lóbulos superiores, preferentemente en el lado derecho, y la imagen radiológica más característica es una opacidad uniforme y poco densa, redonda u oval, bien delimitada y con un menisco aéreo superior, en algunos casos pueden observarse los cambios gravitacionales que ponen de manifiesto la libre movilidad del aspergiloma en el interior de la cavidad. En algunos casos pueden observarse imágenes menos características (engrosamiento de la pared de la cavidad, imágenes de condensación, etc.). La evolución es variable y en un pequeño porcentaje de casos se resuelve espontáneamente; el resto pueden permanecer estables durante años o aumentar de tamaño y dar complicaciones (sobreinfección, hemoptisis, etc.). El diagnóstico de sospecha generalmente se realiza por radiología y se confirma mediante pruebas serológicas, fundamentalmente de inmunoprecipitación (doble difusión, electroforesis, etc.). La observación de los arcos C y/o J que pueden ser caracterizados enzimáticamente y son específicos de *A. fumigatus* ofrece mayor seguridad diagnóstica. En las técnicas de hemaglutinación pasiva,

títulos superiores a 1/320 son sugestivos de esta forma clínica de aspergilosis. Debido a que estos hongos son contaminantes aéreos frecuentes de los cultivos en el laboratorio y sus esporas pueden colonizar la vía respiratoria alta en condiciones normales, los estudios micológicos, los exámenes microscópicos directos y los cultivos sólo tienen valor si son reiteradamente positivos. La negatividad de los estudios micológicos no descarta el diagnóstico.

- *Aspergilosis del conducto auditivo externo y de los senos paranasales.* *A. niger*, y menos frecuentemente otras especies del género, pueden causar otomicosis. Estas se manifiestan por síntomas inespecíficos, tales como prurito local, malestar y tinnitus con eliminación de cerumen; se aprecia una inflamación moderada del conducto auditivo externo con detritus constituido por células descamadas, el mismo cerumen y una masa de micelio. El diagnóstico se efectúa por examen microscópico directo (en el que pueden observarse la presencia de hifas y muchas veces cabezas conidiales características de la especie causal) y cultivo. La aspergilosis sinusal es, en general, una infección crónica no invasiva. Los senos maxilares son los que se afectan con mayor frecuencia. Los síntomas son bastante inespecíficos: cefalea, rinorrea, descarga postnasal, etc. El diagnóstico de certeza se obtiene al tomar muestras por punción, observándose hifas en el examen microscópico directo y aislando por cultivo *A. flavus* u otras especies.

### 2.6.3. ASPERGILOSIS INVASIVA

Las puertas de entrada de las especies del género *Aspergillus* spp. son el tracto respiratorio, las lesiones cutáneas, las heridas quirúrgicas, la córnea y el oído. Por lo general, la infección se sitúa en la puerta de entrada y puede quedar localizada o diseminarse, bien por contigüidad (p. e. a la órbita desde los senos paranasales) o bien por invasión vascular produciendo una enfermedad generalizada con afectación de más de un órgano. Las diferentes formas de aspergilosis invasivas pueden agruparse como sigue:

#### 1) *Infección asociada a daño en los tejidos, cirugía o cuerpo extraño:*

- Queratitis y/o endoftalmitis
- Infección cutánea
- Infección de herida quirúrgica
- Endocarditis protésica
- Asociada a cuerpo extraño:
  - Infección de catéter intravascular
  - Peritonitis por infección de catéter de diálisis peritoneal

#### 2) *Infección en el paciente inmunodeprimido:*

- Aspergilosis cutánea primaria
- Aspergilosis pulmonar:
  - Invasiva aguda
  - Crónica necrotizante
- Aspergilosis traqueobronquial:

- Traqueobronquitis obstructiva
- Traqueobronquitis ulcerativa
- Rinosinusitis
- Diseminada (cerebral, cutánea...)

Las manifestaciones clínicas son diferentes dependiendo de la patología de base del paciente. La forma más frecuente de presentación en los pacientes neutropénicos es la pulmonar (80-90%), aunque entre el 5 y el 10% de las ocasiones, puede presentarse en forma diseminada o únicamente con afectación rinosinusal. Por lo general tiene muy mal pronóstico y la mortalidad es muy elevada. En el trasplante de órgano sólido es excepcional la forma rinosinusal, siendo más frecuente la pulmonar. La enfermedad más común en el paciente trasplantado hepático es la neumonía, que disemina rápidamente con una mortalidad cercana al 100%. En el trasplante cardíaco y en el renal es más frecuente la presentación en forma de nódulos pulmonares, de curso más indolente y mejor pronóstico. En cambio, en el trasplante de pulmón, predomina la enfermedad que afecta a la vía aérea, siendo casi exclusiva de estos pacientes la traqueobronquitis. Es la que tiene mejor pronóstico, aunque en ocasiones es complicado diferenciarla de la colonización. En el paciente con infección por el VIH, tiene una presentación subaguda en forma de neumonía cavitada, difícil de distinguir de la tuberculosis y con una mortalidad que se acerca al 25%. En la enfermedad granulomatosa crónica se presenta en forma de abscesos fríos que se localizan predominantemente en el

pulmón, aunque también puede afectarse la pared torácica y el hueso, siendo infrecuente la forma diseminada. En los grandes quemados aparece como una infección superficial que progresa en 5-10 días a enfermedad diseminada y muerte del paciente siendo a menudo refractaria al tratamiento médico.

La presentación y la progresión de la enfermedad pulmonar dependerán del nivel de inmunosupresión. Los pacientes más inmunodeprimidos estarán paucisintomáticos y progresarán rápidamente hacia la muerte, en cambio aquellos menos inmunodeprimidos tendrán un curso más lento y sintomático.

**La enfermedad pulmonar invasiva aguda** es típica de los pacientes con neutropenia por una enfermedad linfoproliferativa y de los que son sometidos a un trasplante de médula ósea u órgano sólido. Puede presentarse de forma focal o nodular o bien como neumonía uni o bilateral. Los síntomas iniciales son la tos seca y la fiebre que puede estar ausente en aquellos tratados con corticoesteroides. Cerca del 25% de los pacientes pueden estar asintomáticos en el momento del diagnóstico. Puede aparecer hemoptisis, aunque raramente es el síntoma inicial. El desarrollo de disnea es sinónimo de enfermedad difusa. En ocasiones aparece dolor torácico que puede ser pleurítico, pero que generalmente es inespecífico. El pronóstico de la enfermedad focal es más favorable que el de la enfermedad difusa, aunque los pacientes pueden fallecer por una hemoptisis masiva sin expectoración hemoptoica previa. La imagen más característica de la aspergilosis aguda pulmonar invasiva es una lesión bien delimitada, cavitada y con base pleural aunque también pueden aparecer nódulos no cavitados, consolidación

alveolar o cavidades con paredes de distinto grosor. El derrame pleural es raro. En el paciente neutropénico el neumotórax espontáneo es muy sugestivo de aspergilosis o zygomycosis. En las fases iniciales de la enfermedad el TAC torácico puede demostrar lesiones que no son aparentes en la radiografía de tórax y por tanto, es obligatoria su práctica ante la sospecha de aspergilosis.

Las dificultades de diagnóstico etiológico de las aspergilosis invasivas se deben a que, por tratarse de individuos inmunodeprimidos, las técnicas serológicas basadas en la detección de anticuerpos precipitantes suelen ser negativas y la biopsia pulmonar está contraindicada en la mayor parte de los casos. Por estas razones y dada la gravedad del cuadro clínico, en la actualidad se acepta que hay que iniciar tratamiento cuando en pacientes inmunodeprimidos de alto riesgo se observen hifas tabicadas en el examen directo o bien se aísle *Aspergillus* spp en un esputo, broncoaspirado o lavado bronco-alveolar (84). El aislamiento repetido de la misma especie a partir de estas muestras, con exámenes microscópicos positivos y gran número de colonias en los cultivos, tiene mayor valor diagnóstico. No obstante, en sentido estricto, nunca puede excluirse que pueda tratarse de una contaminación ambiental o de un estado de saprofitismo del hongo en el árbol bronquial o incluso en la cavidad orofaríngea. En los últimos años se han evaluado técnicas inmunológicas (aglutinación de látex y ELISA de doble sandwich) para detección de galactomanano en suero y orina para el diagnóstico de aspergilosis invasivas. El galactomanano es un antígeno polisacárido específico de la pared aspergilar. Aunque los resultados de

algunos estudios recientes son algo contradictorios respecto al valor de estas técnicas, se acepta en la actualidad que la detección de galactomanano en suero puede ser positiva antes de que aparezcan lesiones en la radiografía de tórax y que son técnicas (especialmente la de ELISA de doble sandwich) de gran utilidad para el diagnóstico rápido de las aspergilosis invasivas (85). También se ha comprobado que la detección de títulos elevados de antigenemia es un buen predictor de la diseminación de la infección y tiene valor pronóstico (86). Aunque mediante estas técnicas hay un número no despreciable de resultados falsos positivos (87), en la actualidad se consideran técnicas de probada utilidad en el manejo de los enfermos con riesgo elevado de aspergilosis invasiva y en la monitorización de la eficacia del tratamiento administrado.

***La neumonía crónica necrotizante*** es menos frecuente que la aguda invasiva y acontece en los pacientes con infección por VIH, enfermedad granulomatosa crónica, alcoholismo y tratamiento prolongado con corticoides por diferentes neumopatías crónicas como la sarcoidosis o la EPOC. También puede diagnosticarse en pacientes sin enfermedad de base. Los síntomas son parecidos a los del aspergiloma con tos crónica productiva y expectoración hemoptoica. Es frecuente la aparición de fiebre moderada, astenia y pérdida de peso. En la radiografía de tórax se puede observar una área de consolidación alveolar cavitada en una zona donde no existía cavitación previa. Para el diagnóstico de seguridad es imprescindible la demostración de hifas en tejido junto con un cultivo de secreción respiratoria positivo a

*Aspergillus* spp. En ocasiones, sólo es posible observar granulomas ya que las hifas son escasas pero en cultivo crecerá el hongo. El diagnóstico serológico de la aspergilosis pulmonar necrotizante crónica se aproxima más a los resultados proporcionados por el aspergiloma pulmonar que a los de las formas invasivas.

**La traqueobronquitis aspergilar** es una enfermedad casi exclusiva de los pacientes con SIDA y de los receptores de un trasplante de pulmón, aunque también se ha descrito en personas inmunocompetentes. Puede oscilar entre una simple traqueobronquitis con producción excesiva de moco e inflamación o traqueobronquitis ulcerativa con úlceras y pseudomembranas que se sitúan preferentemente en la sutura del injerto pulmonar. La mayoría de los pacientes están sintomáticos con tos productiva y fiebre moderada. Más raramente pueden presentar disnea, dolor torácico y expectoración hemoptoica. En ocasiones, si no hay respuesta al tratamiento antifúngico, puede complicarse con enfermedad pulmonar o diseminada. La radiografía de tórax es normal y en el TAC puede observarse un aumento de densidad peribronquial. El diagnóstico se realiza mediante la visualización broncoscópica y la histología y cultivo del material necrótico traqueobronquial. Se han descrito dos tipos de **sinusitis aspergilar invasiva**, la aguda, típica del paciente neutropénico y del trasplantado de médula ósea y la crónica, que afecta a sujetos menos inmunodeprimidos. La sinusitis invasiva es excepcional en el trasplantado de órgano sólido. La sintomatología de la forma aguda con fiebre, cefalea y rinorrea purulenta o epistaxis es

indistinguible de la sinusitis bacteriana aguda. La existencia de áreas de sensibilidad disminuida, escaras o ulceración es muy sugestivo de etiología fúngica. Aunque por lo general es el único foco de enfermedad aspergilar, puede extenderse hacia el paladar y coexistir con enfermedad pulmonar. La radiología convencional y el TAC de senos no permite distinguirla de la etiología bacteriana. La resonancia magnética en T2, muestra una señal de menor intensidad que la observada en la sinusitis bacteriana. La mayoría de pacientes afectados de la forma crónica son inmunocompetentes aunque se ha descrito en diabéticos y en pacientes con SIDA. La clínica depende del grado de extensión de la enfermedad y podrá aparecer a lo largo de los meses cefalea, sensación de plenitud nasal y la sintomatología propia de la invasión de la órbita (diplopia, proptosis...). La apirexia es constante. El diagnóstico puede ser complicado ya que el número de hifas que pueden observarse en las biopsias es escaso o nulo. El cultivo suele ser positivo aunque requiere múltiples muestras.

La mayoría de los pacientes que fallecen de aspergilosis invasiva tienen una **enfermedad diseminada** que no ha sido diagnosticada a menos que el paciente haya tenido afectación pulmonar o cerebral. Puede aparecer shock y CID (coagulación intravascular diseminada) que pueden confundir con una infección bacteriana. Pueden afectarse la práctica totalidad de los órganos aunque los que se afectan con más frecuencia son el pulmón, cerebro, piel, tracto gastrointestinal en forma de úlceras sangrantes, el tiroides, el endocardio y el parénquima renal y hepático. La aspergilosis cerebral afecta a

pacientes con enfermedad diseminada. Raramente es la única forma de presentación de la aspergilosis invasiva. La práctica totalidad de los pacientes que sufren este tipo de aspergilosis invasiva fallecen. La sintomatología y evolución, al igual que en la enfermedad pulmonar dependerá del grado de inmunosupresión. Los pacientes con una inmunosupresión leve acudirán con cefalea y un síndrome de lesión ocupante de espacio cerebral; mientras que aquellos profundamente inmunodeprimidos acuden con una disminución del estado de conciencia y convulsiones siendo su evolución rápidamente fatal. La aparición de fiebre y meningismo es rara. El TAC cerebral muestra una imagen de hipodensidad con gran edema a su alrededor y captación de contraste en anillo. En los pacientes neutropénicos y en aquellos muy inmunodeprimidos puede faltar la imagen en anillo y el efecto masa por el edema cerebral. Para el diagnóstico de seguridad es necesario una biopsia esterotáxica o punción-aspiración pero este procedimiento es difícil de realizar por el estado clínico del paciente, la localización de la lesión o la coagulopatía subyacente. Dado que la aspergilosis cerebral se da casi siempre en el curso de una enfermedad diseminada, el diagnóstico se realizara en otra localización , habitualmente el pulmón.

**La afectación cutánea** aparece en el contexto de una enfermedad diseminada excepto en los pacientes neutropénicos en que puede ser la única forma de enfermedad. En éstos suele aparecer en los lugares de venopunción. El aspecto es muy similar a la del ectima gangrenoso causado por *Pseudomonas aeruginosa*. Inicialmente aparece un nódulo rojo-violáceo

que rápidamente se necrosa y ulcera por el centro. *Aspergillus* spp. también puede producir una infección progresiva que no responde al tratamiento en grandes quemados o una infección en la herida quirúrgica de trasplantados hepáticos la cual evoluciona rápidamente a una enfermedad diseminada y a la muerte del paciente.

Otras formas más raras de aspergilosis invasiva incluyen la endocarditis sobre válvula protésica, la meningitis postneurocirugía o en adictos a drogas por vía parenteral o por contigüidad de la sinusitis, la endoftalmitis en los adictos a drogas parenterales o en la enfermedad diseminada, la epiglotitis y la pericarditis en el neutropénico, el empiema después de la rotura de un aspergiloma durante la resección quirúrgica y la queratitis en los pacientes con lesiones corneales previas (traumatismos, herpes, queratitis sicca) o que usan glucocorticoides tópicos.

#### **2.6.4. ASPERGILOSIS NOSOCOMIAL EPIDÉMICA.**

Se han descrito diversas epidemias ocurridas en hospitales. Las conidias aspergilaes serían liberados en nubes, principalmente al realizarse obras dentro o en zonas próximas al hospital, sobre todo al movilizar polvo de falsos techos. En los estudios realizados durante estas epidemias se ha comprobado que el número de esporas de estos hongos por m<sup>3</sup> es mucho mayor en determinadas zonas del hospital próximas a las obras, que en otras distantes. El porcentaje de aislamientos ambientales y del tracto respiratorio de pacientes ingresados también se incrementaba en función de las obras (88). En estas circunstancias, los pacientes inmunodeprimidos son más

susceptibles a padecer aspergilosis invasiva. El uso de habitaciones con filtros HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*) para pacientes con riesgo se ha mostrado como una medida preventiva eficaz en estos casos (89). Otras fuentes de infección por *Aspergillus* spp. en hospitales han sido los vendajes y esparadrapos contaminados y también la presencia de esporas en el agua, alimentos y condimentos (pimienta).

## **2.7. TRATAMIENTO**

El tratamiento de la aspergilosis broncopulmonar alérgica se basa en la administración de glucocorticoides. En la fases agudas, cuando existen infiltrados pulmonares, se administran dosis de prednisona de 1 mg/kg/día o superiores, hasta que el infiltrado desaparece. Se continúa luego durante 2 semanas con 0.5 mg/kg/día y, posteriormente, con esa misma dosis en días alternos durante 3-6 meses. Los broncodilatadores y el drenaje postural pueden ayudar a prevenir las impactaciones mucosas. En los pacientes con formas graves que no responden a los glucocorticoides o que necesitan dosis elevadas para mantener la remisión, puede ensayarse el itraconazol, a dosis de 200-400 mg/día durante varios meses. La actitud actual frente al aspergiloma pulmonar tiende a ser conservadora, incluso en los pacientes que presentan hemoptisis ligeras o moderadas. El riesgo de hemorragia grave en estos casos es del 10% y, aunque la mortalidad operatoria es inferior al 7%, la incidencia de complicaciones (fístula broncopulmonar, hemorragia, empiema) es elevada. Por ello, la decisión de resección quirúrgica se tiene que

individualizar. El tratamiento del aspergiloma sinusal consiste en la extirpación quirúrgica.

La mortalidad asociada a la enfermedad invasiva sin tratamiento antifúngico se aproxima al 100%. La evolución de la enfermedad depende de la patología de base, siendo muy rápida en los pacientes con neutropenia y trasplantados hepáticos y de médula ósea. En ocasiones el diagnóstico de seguridad es muy difícil de establecer por lo que ante la sospecha clínica o ante un cultivo positivo en un paciente muy inmunodeprimido debe iniciarse tratamiento de forma precoz. Los antifúngicos con actividad frente a *Aspergillus* spp. son la anfotericina B, el itraconazol, el voriconazol y la caspofungina. En la última década, se han desarrollado las formulaciones lipídicas de anfotericina B que han demostrado una eficacia similar a la de la anfotericina B con menor nefrotoxicidad. El tratamiento de elección de la aspergilosis pulmonar invasiva es voriconazol a una dosis de 6 mg/kg/12 h el primer día seguido de 4 mg/kg/12 h a partir del segundo día (90) o anfotericinas lipídicas a dosis de 5 mg/kg/día. Deben tenerse en cuenta las posibles interacciones farmacológicas del voriconazol como inhibidor del metabolismo del citocromo-450 y la inconveniencia de su utilización i.v. en aquellos pacientes con un aclaramiento de creatinina inferior a 10 ml/min. La duración óptima del tratamiento, para cualquier tipo de antifúngico, es desconocida y depende de la extensión de la enfermedad, la respuesta al mismo y el estado inmunitario del paciente. Por tanto, la duración debería estar guiada por la respuesta clínica más que por una dosis total arbitraria. Parece razonable continuar el

tratamiento durante varios meses (un mínimo 4 a 6; de ahí la bondad de las formas orales de tratamiento), con el fin de tratar microfocos después de que los signos clínicos y radiológicos hayan desaparecido, los cultivos sean negativos y el estado inmunitario sea lo más correcto posible. La respuesta final de estos pacientes al tratamiento antifúngico está relacionada con factores del huésped como pueden ser la disminución de la inmunosupresión y la recuperación de la función del injerto. Una secuencia lógica de tratamiento sería comenzar con tratamiento endovenoso con voriconazol o con una anfotericina lipídica hasta la desaparición de los signos radiológicos (o como mínimo hasta detener la progresión de la enfermedad) y posteriormente continuar con voriconazol o itraconazol por vía oral durante un período de tiempo prolongado para tratar los posibles microfocos. Cuando existe fracaso terapéutico, entendiendo como tal la progresión de la enfermedad al final de la primera semana o la estabilidad de las lesiones tras un mes de tratamiento correcto, estaría indicado realizar un tratamiento combinado con anfotericina B liposomal a dosis de 5 mg/Kg/d asociada a caspofungina (91) o aumentar la dosis de anfotericina liposomal a 10 mg/Kg/d (92).

Los pacientes con una enfermedad de curso más subagudo, poco inmunodeprimidos o que se les puede retirar la inmunosupresión y que toleran la ingesta oral pueden ser tratados con itraconazol oral. Deben tenerse en cuenta las interacciones con ciclosporina, digoxina, antihistamínicos e inhibidores de la proteasa del VIH.

La cirugía de excisión está indicada en el tratamiento de la aspergilosis pulmonar invasiva si cursa con hemoptisis o está localizada cerca de los grandes vasos. En los pacientes con neutropenia puede estar indicada la cirugía en el caso de persistencia de la enfermedad antes del trasplante de médula ósea o de un nuevo tratamiento quimioterápico. El desbridamiento quirúrgico es muy útil en la sinusitis aguda del neutropénico, aunque no debería realizarse durante los periodos de neutropenia porque las complicaciones hemorrágicas son muy frecuentes. En la aspergilosis cerebral la mortalidad es cercana al 100% a pesar de la exéresis quirúrgica, por lo que la única cirugía recomendada en esta entidad es la punción diagnóstica.

## **2.8. PROFILAXIS**

La prevención de esta enfermedad es muy complicada porque el riesgo de infección se extiende durante todo el periodo de inmunosupresión. Durante los periodos de neutropenia profunda los pacientes deben estar ingresados en habitaciones con presión positiva con entrada de aire filtrado a través de filtros HEPA. Posteriormente, la exposición al hongo continua dado la gran ubicuidad de éste. Se ha intentado profilaxis con triazoles orales (74), pero tanto las interacciones medicamentosas como la mala tolerancia digestiva hacen que un porcentaje considerable de los pacientes no puedan continuar con este tipo de profilaxis (93). El uso de anfotericina B nebulizada como profilaxis es discutido en enfermos hematológicos (94;95). En el trasplante pulmonar la información era escasa hasta hace pocos años (95;96).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La alta incidencia de enfermedad por *Aspergillus* spp. y su alta mortalidad a pesar de un tratamiento precoz y correcto, ha obligado a desarrollar estrategias de prevención. Dichas estrategias han sido dirigidas en algunos casos a evitar la inhalación de esporas y en otros caso, a la administración profiláctica de fármacos antifúngicos. Puesto que la ruta más común de la entrada del *Aspergillus* spp. es la vía respiratoria, se han utilizado sistema de filtración de aire para evitar la inhalación de esporas. Así, los cuartos con filtros HEPA han disminuido la incidencia de infección por *Aspergillus* spp. en los pacientes con trasplante de médula ósea (88;97). Sin embargo, los altos costes, y que sea una estrategia solo útil durante la estancia hospitalaria del enfermo, limitan su utilidad en los pacientes con TP (97;98). La Anfotericina B endovenosa a dosis bajas dosis, utilizada de forma eficaz en el trasplante de médula ósea (99), también se ha ensayado en el TP. En los primeros trasplante del pulmón algunos grupos utilizaron dicha estrategia, pero los resultados no fueron publicados. Al igual que el aislamiento en habitaciones con filtro HEPA, se trata de una profilaxis sólo utilizable en el post trasplante inmediato. Sin embargo, el riesgo de infección persiste meses después del trasplante. El itraconazol es otro fármaco utilizado por algunos grupos de TP como profilaxis. Los resultados positivos que se han obtenido en otro pacientes inmunocomprometidos (100;101) han animado a estos grupos a utilizarlo. Sin embargo, las evidencias sobre su efectividad son escasas en el

TP (102). Por otra parte, se trata de un fármaco costoso y que presenta interacciones importantes con la ciclosporina y tacrolimus (84;93).

Dado que el tratamiento de elección para la infección por *Aspergillus* spp. ha sido clásicamente la Anfotericina B (AB), y dado que la puerta de entrada es la vía aérea, la inhalación de AB ha sido ensayada como profilaxis de la infección por *Aspergillus* spp. La inhalación mediante nebulización de Anfotericina se ha utilizado con éxito en modelos experimentales (103;104) pero los datos en humanos, básicamente en pacientes neutropénicos, son controvertidos (94;95;105-107). La información de la eficacia de este tipo de profilaxis en el TP es escasa (77;96). A esto, hay que sumarle el desconocimiento de la farmacocinética y de la distribución de la anfotericina B nebulizada (nAB) en el árbol respiratorio. Así como, la posible absorción sistémica con la consecuente nefrotoxicidad. Hasta la fecha, ningunos estudio sobre farmacocinética y distribución de la nAB en el árbol respiratorio de los receptores de trasplante del pulmón se ha publicado.

Los dos trabajos que constituyen la presente tesis intentan completar la información que existe sobre la profilaxis de la infección por *Aspergillus* spp. con nAB en TP. El primer programa de TP en España se inicio en nuestro Hospital en 1990. Durante los primeros años del programa la incidencia de infección y la mortalidad por *Aspergillus* spp. fue muy elevada. Por dicho motivo, y a pesar de las pocas evidencias clínicas y farmacológicas que existían, en 1993 se introdujo la profilaxis con nAB. A partir de entonces la infección por *Aspergillus* spp. disminuyó de forma muy importante. Dada la

imposibilidad por motivos éticos de plantear un estudio controlado para determinar la eficacia de la profilaxis con nAB, se realizó un estudio retrospectivo de factores de riesgo para la infección por *Aspergillus* spp. Entre las 23 variables estudiadas se incluyó la intención de profilaxis con nAB. Dicho estudio "*Nebulized Amphotericin B Prophylaxis For Aspergillus Infection In Lung Transplantation. Study Of Risk Factors*" es el primer trabajo de la presente tesis.

En el segundo estudio, "*Nebulized Amphotericin B Concentration And Distribution In The Respiratory Tract Of Lung-Transplanted Patients*", se determinó la concentración y la distribución de nAB en el árbol respiratorio del paciente trasplantado de pulmón. El estudio consistía en dos partes, en la primera se determinaban las concentraciones alcanzadas por la nAB en el tracto respiratorio a partir de muestras obtenidas mediante broncoscopia. En la segunda se usaban técnicas con radioaerosoles para conocer la distribución de la nAB depositada en los pulmones.

#### **4. OBJETIVOS**

El objetivo del primer estudio "*Nebulized Amphotericin B Prophylaxis For Aspergillus Infection In Lung Transplantation. Study Of Risk Factors*", fue determinar si la profilaxis con nAB era un factor de protección contra la infección por *Aspergillus* spp.

El objetivo del segundo estudio, "*Nebulized Amphotericin B Concentration And Distribution In The Respiratory Tract Of Lung-Transplanted Patients*", fue determinar la concentración alcanzada y la distribución de nAB en el árbol respiratorio del paciente trasplantado de pulmón.

## **5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS**

En el estudio "*Nebulized Amphotericin B Prophylaxis For Aspergillus Infection In Lung Transplantation. Study Of Risk Factors*" cincuenta y cinco pacientes consecutivos que habían sido sometidos a un TP entre 1990 y 1997, y que sobrevivieron más de 7 días, fueron estudiados. La nAB fue indicado en 44 /55 pacientes (80%). El seguimiento medio de los pacientes fue de 14 meses (rango: 0,3- 46 meses). Treinta y dos de los 55 pacientes (58%) estudiados estaban vivos al final del estudio. Dieciocho de 55 pacientes (33%) desarrollaron infección por *Aspergillus* spp. El tiempo medio entre la infección y el trasplante fue de 8.8 meses (rango: 0.3-41 meses). Se incluyeron 23 variables en el estudio, entre ellas la intención de profilaxis con nAB. En el análisis univariante se observó que al 91,9 % de los pacientes que no desarrollaron infección por *Aspergillus* spp. se les había indicado profilaxis con nAB, en contraste con un 55,6 % en el grupo de pacientes que si habían desarrollado la infección por *Aspergillus* spp. ( $p < 0,01$ ). Los resultados del análisis multivariante confirmaron la importancia de la nAB como factor independiente para disminuir la infección por *Aspergillus* spp. (odds ratio: 0.13; IC 95% 0.02 - 0.69;  $p < 0.05$ ). Por otra parte, en el grupo de pacientes con infección por *Aspergillus* spp, el 61,1% de ellos también desarrollaron enfermedad por CMV. Sin embargo, en el grupo de los pacientes sin infección por *Aspergillus* spp. la incidencia de CMV fue del 24, 3% ( $p < 0.05$ ). La enfermedad por CMV se mostró como factor de riesgo independiente para

el desarrollo de la infección por *Aspergillus* spp. (odds ratio: 5.1; IC 95% 1.35 - 19.17;  $p < 0.05$ ).

Las formas clínicas de infección por *Aspergillus* spp. fueron traqueobronquitis en 8 casos, en 5 traqueobronquitis ulcerativa y en 5 formas invasivas con afectación del parénquima. Todos los pacientes con aspergillosis pulmonar invasiva murieron, 2 de los 5 con traqueobronquitis ulcerativa y ninguno con traqueobronquitis. El *Aspergillus fumigatus* fue el agente etiológico más frecuente con 14 episodios (77%). Durante el período del estudio se observaron 12 episodios de colonización por *Aspergillus* spp. Todos los episodios de colonización fueron resueltos aumentando la dosis de nAB a tres veces al día. Ciento seis episodios de colonizaciones por otros hongos diferentes del *Aspergillus* spp. fueron también diagnosticados. Sólo hubo tres casos de infección por otros hongos diferentes al *Aspergillus* spp. ( 3 traqueobronquitis, dos por *Blastoschizomyces capitatus* y una por *Pseudallescheria boydii*). Los efectos secundarios de la profilaxis con nAB fueron tos (14/44, 32%), broncoespasmo leve (4/44, 9%) y náusea (3/44, 7%). Solamente un paciente tuvo que suspender la profilaxis con nAB por efectos adversos. Cuatro pacientes no siguieron regularmente la profilaxis y dos abandonaron la profilaxis por voluntad propia.

En el segundo estudio "*Nebulized Amphotericin B Concentration And Distribution In The Respiratory Tract Of Lung-Transplanted Patients*" se realizaron 120 broncoscopias en 39 pacientes que recibían profilaxis con 6 mg diaria de nAB, como mínimo desde hacía 7 días. Se observó que, 4 horas

después de la administración de nAB, las concentraciones de AB eran de 1,46  $\mu\text{g/ml}$  (IC del 95% 0,81-2,12) y de 15,75  $\mu\text{g/ml}$  (IC del 95% 10,93-20,58) en broncoaspirado (BAS) y el lavado broncolalveolar (BAL) respectivamente. Posteriormente las concentraciones declinaron progresivamente. A las 24 horas, las concentraciones eran 0,37  $\mu\text{g/ml}$  (IC del 95% 0,19 – 0,55) en BAS y 11,02  $\mu\text{g/ml}$  (IC del 95% 6,99 – 15,05) en el BAL. A las 48 horas las concentraciones en BAS eran de 0,08  $\mu\text{g/ml}$  (IC del 95% 0,04-0,12) y en BAL de 10,58  $\mu\text{g/ml}$  (IC del 95% 6,56-14,60). No se encontraron niveles sanguíneos de AB en ninguna de las muestras seriadas de los 5 pacientes estudiados. En la segunda parte de este mismo artículo, se determinó la distribución de la nAB realizando una gammagrafía de ventilación tras la inhalación de nAB marcada con Tecnecio (nAB-99mTc). Diecisiete pacientes trasplantados pulmonares fueron estudiados. La distribución de nAB-99mTc fue uniforme en 12 de los 13 pacientes sin BOS. Tres de los cuatro pacientes con BOS tenían una distribución heterogénea en el injerto. Cuatro de 6 pulmones nativos (3 fibrosis pulmonares idiopática y 1 enfisema) tenían distribución no uniforme de la nAB-99mTc, en un paciente la nAB-99mTc no fue detectado (fibrosis pulmonar idiopática) y en otro la distribución fue considerada uniforme (fibrosis pulmonar idiopática). La distribución fue simétrica entre ambos injertos en los pacientes con trasplante bipulmonar. En los trasplantes unipulmonares fue mejor en el injerto que en el nativo (72,2% vs 27,8%,  $p < 0,01$ ). En un paciente con estenosis bronquial se observó un gran depósito de nAB-99mTc en el bronquio donde se situaba la estenosis.

Una buena correlación se observó entre la distribución regional de la nAB-99m Tc y la perfusión regional determinada por gammagrafía ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.01$ ). Esta correlación cercana fue mantenida en los pulmones injertados tanto con, como sin BOS ( $r = 0.79$ ,  $p < 0.01$  y  $r = 0.82$ ,  $p < 0.01$ , respectivamente), en el pulmón nativo fue menor ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.05$ ).

## **6. DISCUSIÓN**

El estudio “*Nebulized Amphotericin B Prophylaxis For Aspergillus Infection In Lung Transplantation. Study Of Risk Factors*” parece demostrar que la profilaxis con nAB previene la infección por *Aspergillus* spp. en los receptores de un TP. Estos datos concuerdan con los escasos estudios publicados en el TP (96;102). Al final de 1999, dos años después de finalizar nuestro estudio, 111 pacientes habían recibido profilaxis con nAB. Dieciséis de esos pacientes fueron diagnosticados de infección por *Aspergillus* spp. (14.4%) pero sólo dos desarrollaron enfermedad pulmonar invasiva (1.8%). Estos resultados son muy similares a los que comunican Reichenspurner et al. (77) con 2% incidencia de enfermedad invasiva por *Aspergillus* spp. en los pacientes que recibieron profilaxis con nAB en contraste con un 12 % de un grupo control histórico. Después de la publicación de nuestro estudio se han publicado otros trabajos con resultados similares (108;109).

Factores de riesgo reconocidos en la literatura para la infección por *Aspergillus* spp. en pacientes inmunodeprimidos son la neutropenia y el tratamiento crónico con corticoesteroides (84). En el trasplante pulmonar se han implicado como factores de riesgo la neumonitis por CMV (70;110), la isquemia de la vía aérea (73) y el pulmón nativo en los trasplantes unipulmonares (71;111;112). No se ha encontrado relación con el rechazo o aumento de inmunosupresión, sin embargo su implicación no puede ser descartada (113). En nuestro estudio, además de la enfermedad por CMV, ningún otro factor de riesgo se ha reconocido. Es posible que esto sea debido,

por lo menos en parte, a que la profilaxis con nAB previene la colonización de la vía aérea isquémica y del pulmón nativo. Por otra parte, la baja incidencia de infecciones por otros hongos en estos pacientes induce a pensar en que la profilaxis con nAB también puede proteger de otras infecciones fúngicas.

La seguridad de la nAB en otros pacientes inmunocomprometidos es aceptable en la mayoría de los estudios publicados (106;114;115). La nAB en nuestro estudio fue bien tolerada a las dosis administradas (hasta 6 mg tres veces al día a una concentración de 1 mg/ml). La incidencia de efectos adversos en el TP fue comparable a la de otros autores con dosis similares (77). Sin embargo con dosis más altas se han descrito efectos secundarios más severos (95;114;115).

En resumen, la profilaxis con nAB parece efectiva y bien tolerada pero la correcta posología del fármaco es desconocida porque se desconoce su farmacocinética en el árbol respiratorio. Se desconoce si son suficientes las concentraciones en la zona de la sutura, y se desconoce también si hay absorción sistémica de la nAB y por tanto riesgo de nefrotoxicidad. Asimismo se ignora como se distribuye y si hay factores que modifican esta distribución (pulmón nativo o rechazo crónico). El segundo trabajo de esta tesis doctoral intenta contestar estas preguntas.

En este segundo trabajo, "*Nebulized Amphotericin B Concentration And Distribution In The Respiratory Tract Of Lung-Transplanted Patients*", se observó que la nebulización de 6 mg de AB alcanza suficiente concentración en el árbol bronquial para ser usada como profilaxis de la infección por

*Aspergillus* spp. en el TP. Las concentraciones halladas fueron más altas a nivel distal (representadas por el BAL) que a nivel proximal (probablemente mejor representadas por el BAS). Aunque la concentración para prevenir la infección por *Aspergillus* spp. no está bien definida, una concentración mínima inhibitoria (CMI<sub>90</sub>) de 1 µg/ml parece ser suficiente en la mayoría de los casos (116;117). Por tanto, en las zonas más distales del árbol bronquial, 6 mg de nAB cada 24 horas e incluso intervalos más prolongados puede ser suficiente para evitar la proliferación fúngica. Pero en cambio, en las zonas más proximales del árbol bronquial, donde las concentraciones sólo exceden 1 µg/ml durante las primeras horas, probablemente es necesario aumentar la frecuencia de administración, especialmente si existe isquemia de la sutura. A la vista de estos resultados, la pauta de profilaxis administrada en el estudio de factores de riesgo (6 mg 3 veces al día hasta el día 120 y posteriormente 6 mg/día) parece correcta, puesto que protege la sutura en el periodo más vulnerable.

La ausencia de la absorción sistémica de AB después de la nebulización es un tema especialmente importante en estos pacientes por el uso crónico de inmunosupresores nefrotóxicos. Los datos comunicados en la literatura en otro tipo de pacientes también describen una pobre absorción sistémica de la nAB (94;118). Junto con la buena tolerancia del fármaco que se describe en el primer trabajo, se dibuja un perfil de seguridad suficientemente bueno para poder mantener la profilaxis durante largos periodos de tiempo.

Por otra parte, la distribución de la nAB es uniforme en el injerto que no presenta BOS. Sin embargo, en el paciente con BOS la distribución es más heterogénea. Los pacientes con BOS pueden tener una combinación de procesos obstructivo y restrictivos (119) que puede afectar a la distribución regional de la nAB. Esto implica que la nAB en estos pacientes pueda no llegar a todas las áreas del pulmón con el consecuente aumento de riesgo de infección. La buena correlación entre la distribución de la nAB y la gammagrafía de perfusión pulmonar podría permitir identificar a estos pacientes y por tanto, individualizar la profilaxis.

La distribución heterogénea en el pulmón nativo plantea la posibilidad de que este se pueda convertir en reservorio del *Aspergillus* spp. Sin embargo, los resultados del primer trabajo, donde no se identifica el pulmón nativo como factor de riesgo, parecen ir en contra de esta idea.

## **7. CONCLUSIONES FINALES**

### **7.1. Principales:**

1. En el trasplante pulmonar, la profilaxis con nAB es un factor de protección contra la infección por *Aspergillus* spp.
2. La nAB presenta una buena tolerancia, sus efectos adversos son leves y en muy pocos casos obliga a suspender su administración. No hay evidencias de la absorción sistémica de la nAB y por tanto de riesgo de nefrotoxicidad.
3. Los niveles de nAB que se alcanzan en el tracto respiratorio son suficientes para inhibir la proliferación de *Aspergillus* spp. La cantidad de fármaco detectada es mayor a medida que progresamos en el árbol bronquial.
4. Para la protección de la vía aérea más distal 6 mg/ día de nAB parece suficiente. Los datos del presente estudio apoyan que esta misma dosis administrada cada 48 horas también podrían tener una eficacia similar.
5. Hasta la cicatrización completa de la sutura, es recomendable aumentar la frecuencia de la administración de la nAB dado que la vía aérea proximal parece esta sólo protegida durante las primera horas después de la nebulización.
6. La nAB en el injerto sin BOS probablemente alcanza todas las áreas del pulmón y consigue una correcta protección en todas ellas.

7. En injertos con BOS, la distribución del fármaco es frecuentemente heterogénea y nos indica la posibilidad de que existan áreas donde los niveles de AB puedan ser bajos.
8. En los trasplantes unipulmonares la mayor parte de la nAB se deposita en el injerto. La distribución del fármaco en el pulmón nativo es heterogénea.
9. La gammagrafía de perfusión pulmonar puede ser un método para detectar aquellos pacientes con una distribución heterogénea del fármaco. Estos pacientes podrían beneficiarse de un ajuste individualizado de la profilaxis con nAB.

## **7.2. Secundarias:**

1. La incidencia de infección por *Aspergillus* spp. en el trasplante pulmonar es alta (33%). La mayoría de las infecciones por *Aspergillus* spp. en el trasplante pulmonar son formas de traqueobronquitis más o menos severas. La principal especie causante de las infecciones en el TP es *Aspergillus fumigatus*.
2. La nAB probablemente protege contra otras infecciones fúngicas. Las colonizaciones por otros hongos son frecuentes, pero las enfermedades fúngicas diferentes a la producida por *Aspergillus* spp. son poco frecuentes.
3. La enfermedad por CMV es un factor de riesgo para el desarrollo de infección por *Aspergillus* spp.

4. Es posible que la nAB se deposite de forma substancial en las zonas de estenosis bronquial. Esto contribuiría a mejorar la protección de la vía aérea en una situación especialmente susceptible para la infección por *Aspergillus* spp.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Mohacsi PJ, Keck BM et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twentieth official adult lung and heart-lung transplant report - 2003. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2003; 22(6):625-635.
- (2) Anyanwu AC, Rogers CA, Murday AJ. Intrathoracic organ transplantation in the United Kingdom 1995-99: results from the UK cardiothoracic transplant audit. *Heart* 2002; 87(5):449-454.
- (3) Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Edwards EB, Novick RJ. Effect of diagnosis on survival benefit of lung transplantation for end-stage lung disease. *Lancet* 1998; 351(9095):24-27.
- (4) Charman SC, Sharples LD, McNeil KD, Wallwork J. Assessment of survival benefit after lung transplantation by patient diagnosis. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(2):226-232.
- (5) De Meester J, Smits JM, Persijn GG, Haverich A. Listing for lung transplantation: life expectancy and transplant effect, stratified by type of end-stage lung disease, the Eurotransplant experience. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20(5):518-524.

- (6) Maurer JR, Frost AE, Estenne M, Higenbottam T, Glanville AR. International guidelines for the selection of lung transplant candidates. The International Society for Heart and Lung Transplantation, the American Thoracic Society, the American Society of Transplant Physicians, the European Respiratory Society. *Transplantation* 1998; 66(7):951-956.
- (7) Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, de Oca MM, Mendez RA et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine* 2004; 350(10):1005-1012.
- (8) Ussetti P, Laporta R. Predicting outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine* 2004; 350(22):2309-2310.
- (9) Liou TG, Adler FR, Cahill BC, FitzSimmons SC, Huang D, Hibbs JR et al. Survival effect of lung transplantation among patients with cystic fibrosis. *JAMA* 2001; 286(21):2683-2689.
- (10) Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: eighteenth Official Report-2001. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20(8):805-815.

- (11) Pierre AF, Sekine Y, Hutcheon MA, Waddell TK, Keshavjee SH. Marginal donor lungs: a reassessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123(3):421-427.
- (12) Williams TJ, Patterson GA, McClean PA, Zamel N, Maurer JR. Maximal exercise testing in single and double lung transplant recipients. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145(1):101-105.
- (13) Systrom DM, Pappagianopoulos P, Fishman RS, Wain JC, Ginns LC. Determinants of abnormal maximum oxygen uptake after lung transplantation for chronic obstructive pulmonary disease. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17(12):1220-1230.
- (14) Tirdel GB, Girgis R, Fishman RS, Theodore J. Metabolic myopathy as a cause of the exercise limitation in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17(12):1231-1237.
- (15) Hokanson JF, Mercier JG, Brooks GA. Cyclosporine A decreases rat skeletal muscle mitochondrial respiration in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(6):1848-1851.
- (16) Caine N, Sharples LD, Dennis C, Higenbottam TW, Wallwork J. Measurement of health-related quality of life before and after heart-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(10):1047-1058.

- (17) Gross CR, Limwattananon C, Matthees B, Zehrer JL, Savik K. Impact of transplantation on quality of life in patients with diabetes and renal dysfunction. *Transplantation* 2000; 70(12):1736-1746.
- (18) Wray J, Long T, Radley-Smith R, Yacoub M. Returning to school after heart or heart-lung transplantation: How well do children adjust? *Transplantation* 2001; 72(1):100-106.
- (19) Thabut G, Vinatier I, Stern JB, Leseche G, Loirat P, Fournier M et al. Primary graft failure following lung transplantation(\*) : predictive factors of mortality. *Chest* 2002; 121(6):1876-1882.
- (20) Muller C, Bittmann I, Hatz R, Kellner B, Schelling G, Furst H et al. Improvement of lung preservation -- from experiment to clinical practice. *Eur Surg Res* 2002; 34(1--2):77-82.
- (21) Fiser SM, Kron IL, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Cassada DC et al. Controlled perfusion decreases reperfusion injury after high-flow reperfusion. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(6):687-691.
- (22) Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 1998; 114(1):51-60.

- (23) Date H, Trulock EP, Arcidi JM, Sundaresan S, Cooper JD, Patterson GA. Improved airway healing after lung transplantation. An analysis of 348 bronchial anastomoses. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110(5):1424-1432.
- (24) Susanto I, Peters JI, Levine SM, Sako EY, Anzueto A, Bryan CL. Use of balloon-expandable metallic stents in the management of bronchial stenosis and bronchomalacia after lung transplantation. *Chest* 1998; 114(5):1330-1335.
- (25) Bando K, Paradis IL, Komatsu K, Konishi H, Matsushima M, Keena RJ et al. Analysis of time-dependent risks for infection, rejection, and death after pulmonary transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109(1):49-57.
- (26) Schulman LL, Weinberg AD, McGregor C, Galantowicz ME, Suciufoca NM, Itescu S. Mismatches at the HLA-DR and HLA-B loci are risk factors for acute rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(6 Pt 1):1833-1837.
- (27) Guilinger RA, Paradis IL, Dauber JH, Yousem SA, Williams PA, Keenan RJ et al. The importance of bronchoscopy with transbronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in the management of lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(6 Pt 1):2037-2043.

- (28) Becker FS, Martinez FJ, Brunsting LA, Deeb GM, Flint A, Lynch JP, III. Limitations of spirometry in detecting rejection after single-lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(1):159-166.
- (29) Yousem SA, Berry GJ, Cagle PT, Chamberlain D, Husain AN, Hruban RH et al. Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(1 Pt 1):1-15.
- (30) Roman A, Bravo C, Monforte V, Reyes L, Canela M, Morell F. Preliminary results of rescue therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil in lung transplanted patients with bronchiolitis obliterans. *Transplant Proc* 2002; 34(1):146-147.
- (31) Sarahrudi K, Carretta A, Wisser W, Senbaklavaci O, Ploner M, Neuhauser P et al. The value of switching from cyclosporine to tacrolimus in the treatment of refractory acute rejection and obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Int* 2002; 15(1):24-28.
- (32) Chamberlain D, Maurer J, Chaparro C, Idolor L. Evaluation of transbronchial lung biopsy specimens in the diagnosis of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13(6):963-971.

- (33) Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(3):297-310.
- (34) Valentine VG, Taylor DE, Dhillon GS, Knower MT, McFadden PM, Fuchs DM et al. Success of lung transplantation without surveillance bronchoscopy. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(3):319-326.
- (35) Heng D, Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wreghitt T, Wallwork J. Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis, and risk factors. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17(12):1255-1263.
- (36) Girgis RE, Tu I, Berry GJ, Reichenspurner H, Valentine VG, Conte JV et al. Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(12):1200-1208.
- (37) Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(2):271-281.
- (38) Brugiere O, Pessione F, Thabut G, Mal H, Jebrak G, Leseche G et al. Bronchiolitis obliterans syndrome after single-lung transplantation(\*) : impact of time to onset on functional pattern and survival. *Chest* 2002; 121(6):1883-1889.

- (39) Date H, Lynch JP, Sundaresan S, Patterson GA, Trulock EP. The impact of cytolytic therapy on bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17(9):869-875.
- (40) Kesten S, Chaparro C, Scavuzzo M, Gutierrez C. Tacrolimus as rescue therapy for bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16(9):905-912.
- (41) Kramer MR, Marshall SE, Starnes VA, Gamberg P, Amitai Z, Theodore J. Infectious complications in heart-lung transplantation. Analysis of 200 episodes. *Arch Intern Med* 1993; 153(17):2010-2016.
- (42) Maurer JR, Tullis DE, Grossman RF, Vellend H, Winton TL, Patterson GA. Infectious complications following isolated lung transplantation. *Chest* 1992; 101(4):1056-1059.
- (43) Trancassini M, Mosca G, Margiotta MC, Pecoraro C, Quattrucci S, Venuta F et al. Microbiologic investigation on patients with cystic fibrosis subjected to bilateral lung transplantation. *Transplantation* 2001; 72(9):1575-1577.
- (44) Roman A, Bravo C, Levy G, Monforte V, Vidal R, Sole J et al. Isoniazid prophylaxis in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19(9):903-906.

- (45) Husain S, McCurry K, Dauber J, Singh N, Kusne S. Nocardia infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(3):354-359.
- (46) Vilchez R, McCurry K, Dauber J, Iacono A, Keenan R, Griffith B et al. Influenza and parainfluenza respiratory viral infection requiring admission in adult lung transplant recipients. *Transplantation* 2002; 73(7):1075-1078.
- (47) Billings JL, Hertz MI, Wendt CH. Community respiratory virus infections following lung transplantation. *Transpl Infect Dis* 2001; 3(3):138-148.
- (48) Billings JL, Hertz MI, Savik K, Wendt CH. Respiratory viruses and chronic rejection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(5):559-566.
- (49) Vilchez RA, McCurry K, Dauber J, Iacono A, Keenan R, Zeevi A et al. The epidemiology of parainfluenza virus infection in lung transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 33(12):2004-2008.
- (50) Duncan AJ, Dummer JS, Paradis IL, Dauber JH, Yousem SA, Zenati MA et al. Cytomegalovirus infection and survival in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1991; 10(5 Pt 1):638-644.

- (51) Ettinger NA, Bailey TC, Trulock EP, Storch GA, Anderson D, Raab S et al. Cytomegalovirus infection and pneumonitis. Impact after isolated lung transplantation. Washington University Lung Transplant Group. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(4):1017-1023.
- (52) Soghikian MV, Valentine VG, Berry GJ, Patel HR, Robbins RC, Theodore J. Impact of ganciclovir prophylaxis on heart-lung and lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(9):881-887.
- (53) Wendt CH, Fox JM, Hertz MI. Paramyxovirus infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14:479-485.
- (54) Paya CV. Indirect effects of CMV in the solid organ transplant patient. *Transpl Infect Dis* 1999; Suppl 1:8-12.
- (55) Duncan SR, Grgurich WF, Iacono AT, Burckart GJ, Yousem SA, Paradis IL et al. A comparison of ganciclovir and acyclovir to prevent cytomegalovirus after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(1):146-152.
- (56) Hertz MI, Jordan C, Savik SK, Fox JM, Park S, Bolman RM, III et al. Randomized trial of daily versus three-times-weekly prophylactic ganciclovir after lung and heart-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17(9):913-920.

- (57) Kelly J, Hurley D, Raghu G. Comparison of the efficacy and cost effectiveness of pre-emptive therapy as directed by CMV antigenemia and prophylaxis with ganciclovir in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19(4):355-359.
- (58) Brumble LM, Milstone AP, Loyd JE, Ely EW, Pierson RN, III, Gautam S et al. Prevention of cytomegalovirus infection and disease after lung transplantation: results using a unique regimen employing delayed ganciclovir. *Chest* 2002; 121(2):407-414.
- (59) Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang ML, Boeckh M. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis* 2002; 185(1):20-27.
- (60) Kroes AC, Kalpoe JS. Preemptive therapy for cytomegalovirus infections and the development of resistance to ganciclovir. *J Infect Dis* 2002; 186(5):724-725.
- (61) Keenan RJ, Lega ME, Dummer JS, Paradis IL, Dauber JH, Rabinowich H et al. Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonary transplantation. *Transplantation* 1991; 51(2):433-438.

- (62) Valantine HA, Luikart H, Doyle R, Theodore J, Hunt S, Oyer P et al. Impact of cytomegalovirus hyperimmune globulin on outcome after cardiothoracic transplantation: a comparative study of combined prophylaxis with CMV hyperimmune globulin plus ganciclovir versus ganciclovir alone. *Transplantation* 2001; 72(10):1647-1652.
- (63) Kruger RM, Paranjothi S, Storch GA, Lynch JP, Trulock EP. Impact of prophylaxis with cytogam alone on the incidence of CMV viremia in CMV-seropositive lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(7):754-763.
- (64) Weill D, Lock BJ, Wewers DL, Randall YK, Zorn GL, Early L et al. Combination prophylaxis with ganciclovir and cytomegalovirus (CMV) immune globulin after lung transplantation: effective CMV prevention following daclizumab induction. *Am J Transplant* 2003; 3(4):492-496.
- (65) Pescovitz MD, Rabkin J, Merion RM, Paya CV, Pirsch J, Freeman RB et al. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(10):2811-2815.
- (66) Boivin G, Goyette N, Gilbert C, Roberts N, Macey K, Paya C et al. Absence of cytomegalovirus-resistance mutations after valganciclovir prophylaxis, in a prospective multicenter study of solid-organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2004; 189(9):1615-1618.

- (67) Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4(4):611-620.
- (68) Danziger-Isakov LA, Faro A, Sweet S, Michaels MG, Aurora P, Mogayzel PJ, Jr. et al. Variability in standard care for cytomegalovirus prevention and detection in pediatric lung transplantation: survey of eight pediatric lung transplant programs. *Pediatr Transplant* 2003; 7(6):469-473.
- (69) Zamora MR, Nicolls MR, Hodges TN, Marquesen J, Astor T, Grazia T et al. Following universal prophylaxis with intravenous ganciclovir and cytomegalovirus immune globulin, valganciclovir is safe and effective for prevention of CMV infection following lung transplantation. *American Journal of Transplantation* 2004; 4(10):1635-1642.
- (70) Yeldandi V, Laghi F, McCabe MA, Larson R, O'Keefe P, Husain A et al. Aspergillus and lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14(5):883-890.
- (71) Westney GE, Kesten S, De Hoyos A, Chapparro C, Winton T, Maurer JR. Aspergillus infection in single and double lung transplant recipients. *Transplantation* 1996; 61(6):915-919.

- (72) Cahill BC, Hibbs JR, Savik K, Juni BA, Dosland BM, Edin-Stibbe C et al. Aspergillus airway colonization and invasive disease after lung transplantation. *Chest* 1997; 112(5):1160-1164.
- (73) Kramer MR, Denning DW, Marshall SE, Ross DJ, Berry G, Lewiston NJ et al. Ulcerative tracheobronchitis after lung transplantation. A new form of invasive aspergillosis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144(3 Pt 1):552-556.
- (74) Patterson JE, Peters J, Calhoon JH, Levine S, Anzueto A, Al Abdely H et al. Investigation and control of aspergillosis and other filamentous fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2000; 2(1):22-28.
- (75) Mehrad B, Paciocco G, Martinez FJ, Ojo TC, Iannettoni MD, Lynch JP, III. Spectrum of Aspergillus infection in lung transplant recipients: case series and review of the literature. *Chest* 2001; 119(1):169-175.
- (76) Guillemain R, Lavarde V, Amrein C, Chevalier P, Guinvarc'h A, Glotz D. Invasive aspergillosis after transplantation. *Transplantation Proceedings* 1995; 27(1):1307-1309.

- (77) Reichenspurner H, Gamberg P, Nitschke M, Valantine H, Hunt S, Oyer PE et al. Significant reduction in the number of fungal infections after lung-, heart-lung, and heart transplantation using aerosolized amphotericin B prophylaxis. *Transplantation Proceedings* 1997; 26:627-628.
- (78) Oren I, Haddad N, Finkelstein R, Rowe JM. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients during hospital construction: before and after chemoprophylaxis and institution of HEPA filters. *Am J Hematol* 2001; 66(4):257-262.
- (79) Denning DW, Anderson MJ, Turner G, Latge JP, Bennett JW. Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(4):251-253.
- (80) McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *British Journal of Haematology* 2004; 126(3):289-297.
- (81) Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nolard N, Defontaine A et al. Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. *Journal of Medical Microbiology* 2001; 50(4):367-374.

- (82) Warris A, Klaassen CHW, Meis JFGM, de Ruiter MT, de Valk HA, Abrahamsen TG et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(9):4101-4106.
- (83) Fishman J, Rubin RH. Fungal infection in the organ transplant recipient. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 1998; 7:S42-S48.
- (84) Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 26:781-803.
- (85) Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P et al. Autopsy-Controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(10):3223-3228.
- (86) Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Journal of Infectious Diseases* 2002; 186(9):1297-1306.

- (87) Bretagne S, MarmoratKhuong A, Kuentz M, Latge JP, BartDelabesse E, Cordonnier C. Serum Aspergillus galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: Practical use in neutropenic patients. *Journal of Infection* 1997; 35(1):7-15.
- (88) Loo VG, Bertrand C, Dixon C, Vitye D, DeSalis B, McLean AP et al. Control of construction-associated nosocomial aspergillosis in an antiquated hematology unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17(6):306-364.
- (89) Beyer J, Schwartz S, Heinemann V, Siegert W. Strategies in prevention of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed or neutropenic patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 38(5):911-917.
- (90) Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347(6):408-415.
- (91) Kontoyiannis DP, Hachem R, Lewis RE, Rivero GA, Torres HA, Thornby J et al. Efficacy and toxicity of caspofungin in combination with liposomal amphotericin B as primary or salvage treatment of invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 2003; 98(2):292-299.

- (92) Martin MT, Gavalda J, Lopez P, Gomis X, Ramirez JL, Rodriguez D et al. Efficacy of high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52(6):1032-1034.
- (93) Patterson TF, Peters J, Levine SM, Anzueto A, Bryan CL, Sako EY et al. Systemic availability of itraconazole in lung transplantation. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(9):2217-2220.
- (94) Myers S, Devine SM, Topper RL, Ondrey M, Chandler C, O'Toole K et al. A pilot study of prophylactic aerosolized amphotericin B in patients at risk for prolonged neutropenia. *Leukemia and Lymphoma* 1992; 8:229-233.
- (95) Erjavec Z, Woolthuis GMH, Sluiter WJ, Daenen SMGJ, de Pauw B, Halie MR. Tolerance and efficacy of amphotericin B inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:364-368.
- (96) Calvo V, Borro JM, Morales P, Morcillo A, Vicente R, Tarrazona V et al. Antifungal prophylaxis during the early postoperative period of lung transplantation. Valencia Lung Transplant Group. *Chest* 1999; 115(5):1301-1304.

- (97) Sherertz RJ, Belani A, Kramer BS. Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infections. Unique risk of bone marrow transplant recipients. *Am J Med* 1997; 83:709-718.
- (98) Beyer J, Schwartz S, Barzen G, Risse G, Dullenkopf K, Weyer C et al. Use of amphotericin B aerosols for the prevention of pulmonary aspergillosis. *Infection* 1994; 22(2):143-148.
- (99) Rousey SR, Russler S, Gottlieb M, Ash RC. Low-dose amphotericin B prophylaxis against invasive *Aspergillus* infections in allogeneic marrow transplantation. *Am J Med* 1991; 91(5):484-492.
- (100) Todeschini G, Murari C, Pizzolo G, Amaddi G, Ambrosetti A, Ceru S et al. Oral itraconazole plus nasal amphotericin B for prophylaxis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12(8):614-618.
- (101) Mouy R, Veber F, Blanche S, Donadieu J, Brauner R, Levron JC et al. Long-term itraconazole prophylaxis against *Aspergillus* infections in thirty-two patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1994; 125(6 pt 1):998-1003.
- (102) Minari A, Husni R, Avery RK, Longworth DL, DeCamp M, Bertin M et al. The incidence of invasive aspergillosis among solid organ transplant recipients and implications for prophylaxis in lung transplants. *Transpl Infect Dis* 2002; 4(4):195-200.

- (103) Schmitt HJ, Bernard EM, Hauser M, Armstrong D. Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. 1988; . Antimicrob Agents Chemother (USA) 1988; 32(11):1676-1679.
- (104) Cicogna CE, White MH, Bernard EM, Ishimura T, Sun M TW, Armstrong D. Efficacy of prophylactic aerosol amphotericin B lipid complex in a rat model of pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(2):259-261.
- (105) Conneally E, Cafferkey MT, Daly PA, Keane CT, McCann SR. Nebulized amphotericin B as prophylaxis against invasive aspergillosis in granulocytopenic patients. Bone Marrow Transplant 1990; 5(6):403-406.
- (106) Behre GF, Lenz K, Schilling E, Heinemann V, Link H TA, Boenisch O et al. Aerosol amphotericin B inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic cancer patients. Ann Hematol 1995; 71(6):287-291.
- (107) Schwartz S, Behre G, Heinemann V, Wandt H, Schilling E, Arning M et al. Aerosolized amphotericin B inhalations as prophylaxis of invasive aspergillus infections during prolonged neutropenia: results of a prospective randomized multicenter trial. Blood 1999; 93(11):3654-3661.

- (108) Drew RH, Dodds AE, Benjamin DK, Jr., Duane DR, Palmer SM, Perfect JR. Comparative safety of amphotericin B lipid complex and amphotericin B deoxycholate as aerosolized antifungal prophylaxis in lung-transplant recipients. *Transplantation* 2004; 77(2):232-237.
- (109) Palmer SM, Drew RH, Whitehouse JD, Tapson VF, Davis RD, McConnell RR et al. Safety of aerosolized amphotericin B lipid complex in lung transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72(3):545-548.
- (110) Husni RN, Gordon SM, Longworth DL, Arroliga A, Stillwell PC, Avery RK et al. Cytomegalovirus infection is a risk factor for invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1998; 26(3):753-755.
- (111) Sandur S, Gordon SM, Mehta AC, Maurer JR. Native lung pneumonectomy for invasive pulmonary aspergillosis following lung transplantation: a case report. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(8):810-813.
- (112) Singh N, Husain S. Aspergillus infections after lung transplantation: clinical differences in type of transplant and implications for management. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(3):258-266.
- (113) Trulock EP. Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:789-818.

- (114) Dubois J, Bartter T, Gryn J, Pratter MR. The Physiologic effects of inhaled amphotericin B. *Chest* 1995; 108:750-753.
- (115) Gryn J, Goldberg J, Johnson E, Siegel J, Inzerillo J. The toxicity of daily inhaled amphotericin B. *Am J Clin Oncol* 1993; 16(1):43-46.
- (116) Johnson EM, Ojwang JO, Szekely A, Wallace TL, Warnock DW. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(6):1412-1416.
- (117) Chandrasekar PH, Cutright JL, Manavathu EK. Aspergillus: rising frequency of clinical isolation and continued susceptibility to antifungal agents, 1994-1999. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41(4):211-214.
- (118) Diot P, Rivoire B, Le Pape A, Lemarie E, Dire D, Furet Y et al. Deposition of amphotericin B aerosols in pulmonary aspergilloma. *Eur Respir J* 1995; 8(8):1263-1268.
- (119) O'Riordan TG, Iacono A, Keenan RJ, Duncan SR, Burckart GJ, Griffith BP et al. Delivery and distribution of aerosolized cyclosporine in lung allograft recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(2 Pt 1):516-521.

## **9. PUBLICACIONES**

# Nebulized Amphotericin B Prophylaxis for Aspergillus Infection in Lung Transplantation: Study of Risk Factors

Víctor Monforte, MD,<sup>a</sup> Antonio Roman, MD,<sup>a</sup> Joan Gavalda, MD,<sup>b</sup> Carles Bravo, MD,<sup>a</sup> Luis Tenorio, MD,<sup>c</sup> Adelaida Ferrer, MD,<sup>d</sup> José Maestre, MD,<sup>e</sup> and Ferran Morell, MD<sup>a</sup>

**Background:** Aspergillus infection remains a major cause of morbidity and mortality after lung transplantation. Therefore, some strategies have been attempted, one of which is nebulized amphotericin B (nAB); however, the efficacy of this prophylaxis has not been shown clearly. The aim is to study whether nAB can protect against Aspergillus infection in lung transplant recipients.

**Patients and Methods:** A study of risk factors was conducted in 55 consecutive lung allograft recipients. Twenty-three potential risk factors were analyzed. In 44 (80%) patients, nAB was indicated as prophylaxis. Multivariate analysis using logistic regression was performed.

**Results:** Eighteen of the 55 patients (33%) developed infection due to *Aspergillus* spp. Multivariate analysis showed nAB to be a preventive factor (odds ratio: 0.13; 95% confidence interval [CI] 0.02–0.69;  $p < 0.05$ ) and cytomegalovirus (CMV) disease was an independent risk factor for developing Aspergillus infection (odds ratio: 5.1; 95% CI 1.35–19.17;  $p < 0.05$ ). Only 1 patient required withdrawal of the prophylaxis owing to bronchospasm. nAB was well-tolerated in the remaining patients with only a few, mild, easily controlled side effects.

**Conclusions:** The present results show that nAB prophylaxis may be efficient and safe in preventing Aspergillus infection in lung-transplanted patients, and CMV disease increases the probability of Aspergillus infection. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20:1274–1281.

Lung transplantation has become an accepted treatment for end-stage pulmonary diseases. This group of solid organ transplant recipients appears to be particularly susceptible to infections because the lung is the only transplanted organ that has contin-

uous contact with the environment. *Pneumocystis carinii* pneumonia was virtually eliminated with prophylaxis. At present, other bacterial and viral infections can be prevented. However, fungal infection continues to be an important cause of morbidity and

---

From the <sup>a</sup>Servei de Pneumologia, the <sup>b</sup>Servei de Malalties Infeccioses, the <sup>c</sup>Servei de Cures Intensives, the <sup>d</sup>Servei de Microbiologia, and the <sup>e</sup>Servei de Cirurgia Toràcica, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.  
Submitted October 27, 2000; accepted May 15, 2001.  
Reprint requests: Antonio Roman, MD, Servei de Pneumologia,

---

Hospital General Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Telephone: +34 93 274 6157. Fax: +34 93 274 6083. E-mail: aroman@hg.vhebron.es  
Copyright © 2001 by the International Society for Heart and Lung Transplantation.  
1053-2498/01/\$—see front matter PII S1053-2498(01)00364-3

mortality in this population.<sup>3</sup> Of fungal infections, the most prevalent and important in lung-transplanted patients is caused by *Aspergillus* spp., and despite early diagnosis and aggressive treatment, related mortality remains high.<sup>1-4</sup> Nebulized amphotericin B (nAB) has been used successfully in the rat model of invasive aspergillosis,<sup>5,6</sup> but human data from neutropenic and other immunodepressed patients remain controversial.<sup>7-11</sup> To date few studies exist on nAB prophylaxis against this infection in recipients of lung transplantation.<sup>12,13</sup> These 2 studies do not sufficiently answer the question of the role of nAB in lung transplantation. Since April 1993 we have used nAB as prophylaxis for *Aspergillus* infections in all patients receiving a lung allograft. The purpose of this study was to evaluate the efficacy of this strategy by analyzing the risk factors of aspergillosis in our lung-transplant population.

## PATIENTS AND METHODS

### Patient Population

From August 1990 to September 1997, 72 patients underwent lung transplantation in our institution. The follow-up period ended in February 1998. Fifty-five patients (32 men, 23 women; mean age: 43.1 years; range: 15-67) who survived more than 7 days after transplantation were included in the study. Underlying diseases were idiopathic pulmonary fibrosis in 16 cases; emphysema in 13; bronchiectasis in 11; cystic fibrosis in 4, lymphangiomyomatosis in 3; primary pulmonary hypertension in 4; and silicosis, asbestosis, histiocytosis X, and bronchiolitis obliterans 1 patient each. Twenty-five single lung transplants and 30 sequential double lung transplants were performed. Surgical procedure was essentially similar over time in single and bilateral sequential lung transplantation. From April 1993 we started to administer nAB prophylaxis to all patients who received a lung allograft at our center ( $n = 44$ ). Eleven lung recipients before this date did not receive any fungal prophylaxis. Mean post-operative follow-up was 14 months (range: 0.3-62 months).

### Immunosuppression and Anti-microbial Prophylaxis

All patients were under the same protocol based on triple therapy with cyclosporine, azathioprine, and corticosteroids. Cyclosporine was started on day 1 with dose adjusted by trough blood levels between 200 to 300 ng/ml by immunoassay with monoclonal specific antibody. In the last 3 years, Neoral (Novar-

tis, East Hanover, NJ) has replaced classic cyclosporine in all patients. Azathioprine was started in the second post-operative week at a dose between 1 to 3 mg/kg/day depending on white cell count and avoiding a total leukocyte count less than  $4.0 \times 10^9$ /liter. Methylprednisolone was started in the operating room at a dose of 10 mg/kg before graft reperfusion, followed by 375 mg/day the first day, approximately 0.5 mg/kg/day the first 3 months, and a maintenance dose approximately 0.1 to 0.2 mg/kg/day for life. In recent years, cyclosporine was replaced by tacrolimus as rescue therapy in chronic and recurrent acute rejection in some patients. Occasionally, mycophenolate mophetil 2 g/day or methotrexate 5 to 10 mg/week substituted azathioprine for the same indication. When tacrolimus was used, the dose was adjusted at a trough level between 5 and 15 ng/ml by immunoassay with monoclonal non-specific antibody (MEIA, Imx autoanalyzer, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Acute rejection was treated with pulse intravenous (IV) administration of methylprednisolone at a dose of 10 mg/kg/day for 3 days. OKT3 was occasionally used when no response to standard treatment for acute rejection occurred. Some selected patients with non-resolved rejection underwent plasmapheresis and/or total lymphatic irradiation. Total immunosuppressive therapy was quantified in each patient before developing *Aspergillus* disease or until the end of the study. Quantification was made as follows: 1 point for each treatment with 3 pulse doses of methylprednisolone, 1 point for each course of OKT3, 1 point for each treatment with plasmapheresis, and 2 points if the patient underwent total lymphatic irradiation.

In the immediate post-operative period, patients without pre-operative septic disease received cefuroxime 1.5 g every 8 hours (1990-1996) or amoxicillin-clavulanate 2 g every 8 hours plus aztreonam 1 g every 8 hours (1997-1998). Prophylaxis was modified according to the microorganisms isolated from the last cultures performed in recipients with a septic underlying disease. Duration of prophylaxis was contingent on the results of recipient and donor intraoperative cultures. Since June 1993, IV ganciclovir has been used to prevent cytomegalovirus (CMV) infection and disease. Anti-viral prophylaxis consisted of IV ganciclovir at 5 mg/kg every 12 hours for the first 15 days after the procedure for all patients, followed by a course of 6 mg/kg five

times a week for 45 days for CMV-seropositive patients and 90 days for CMV-seronegative patients. All patients received prophylaxis with cotrimoxazol once a day (400 mg sulfamethoxazol plus 80 mg trimetopim) for life, starting when oral intake was possible. Isoniazid prophylaxis was prescribed in patients with tuberculosis infection (positive PPD) and those in whom cutaneous anergy was shown when they were included on the waiting list. The isoniazid dose was 5 mg/kg/day and completion of prophylaxis was considered at 12 months.

#### nAB Prophylaxis

Fifty milligrams of nAB desoxicolate for injection (Fungizona, Bristol-Myers Squibb Co, New Brunswick, NJ) were dissolved in 10 ml of sterile water for a concentration of 5 mg/ml; this solution was then diluted in sterile water for a total volume of 50 ml with one final concentration of 1 mg/ml. Solution maintained stable for at least 30 days at 4°C, measured by high-pressure liquid chromatography. A dose of 6 ml every 8 hours of nAB was started the first post-operative day and was continued until day 120 and then 6 mg once a day for life. The nebulization technique: nAB was nebulized by one jet nebulizer with a CR60 compressor (air pressure of 27.2 psi and flow 7.3 liter/minute) equipped with a disposable bacterial exhale filter. The aerosol droplet size was measured by TSI particle size analyzer and more than 90% of particles had a size of less than 5 µm. Patients were instructed by a trained staff nurse to inhale through a mouthpiece and exhale through the nose. Two patients failed to adapt adequately to the instructions and the system was thus adapted to a facial mask. The procedure took from 15 to 20 minutes. All patients received 2 puffs of salbutamol from a metered dose inhaler before nebulization of amphotericin B. To avoid contamination, the nebulizer was washed and brushed with soap and water after each administration; once rinsed, it was submerged in a sodium hypochlorite solution at 1% until the next administration. Cultures were performed of the nebulized solution and the different parts of the system to rule out bacterial contamination. This control showed no microbial contamination.

#### Follow-up

Before transplantation, respiratory samples from the recipient lungs were cultured for bacteria, mycobacterium, and fungi. On the day of the operation, respiratory samples from the donor and recipient

were cultured in the same way. After discharge, patients were followed at our outpatient clinic on a regular basis with maximum intervals of 6 weeks. Respiratory samples were obtained and cultured for bacteria, micobacteria, and fungi when the patient had sputum production or bronchoscopy was indicated. Compliance and possible adverse effects of immunosuppressive treatment and prophylaxis, including nAB, were routinely investigated. Every patient underwent surveillance bronchoscopy examinations at 2 and 4 weeks after transplantation and again at 3-month intervals the first year. In addition, bronchoscopy was indicated when clinical deterioration was present. Samples obtained by bronchoscopy included bronchoaspirate and bronchoalveolar lavage (BAL) for cellular examination; Gram and acid-fast bacilli stain; bacterial, fungal, mycobacterial and *Legionella* spp. cultures; and transbronchial biopsies for histopathologic assessment and immunohistochemical stains. Fungal cultures were plated on 3 different media: brain-heart infusion agar, inhibitory mold agar, which has gentamicin and chloramphenicol, and inhibitory mold agar with 10% sheep blood that has gentamicin, chloramphenicol, and cycloheximidine. Cultures were maintained for 4 weeks, and for 8 weeks when infection with dimorphic fungi was suspected.

#### Disease Definitions

Colonization by *Aspergillus* spp. was defined as positive respiratory culture samples with no clinical signs of disease. *Aspergillus* infection was considered when the patient had clinical symptoms, 2 or more respiratory samples were positive for *Aspergillus* spp., and at least 1 of these was obtained by bronchoscopy. *Aspergillus* infection was categorized as follows: *Aspergillus* tracheobronchitis diagnosed by clinical symptoms with purulent sputum production plus bronchoscopy findings with red edematous mucosa and mucus plugging; ulcerative tracheobronchitis diagnosed by bronchial biopsy and/or bronchoscopy findings with necrotic ulcers in the anastomosis or in the tracheobronchial tree that disappeared after treatment; and invasive pulmonary aspergillosis diagnosed when *Aspergillus* spp. was found on lung histopathology or radiologic evidence of invasion was observed.

Diagnosis of CMV infection was based on isolation or detection of the virus from any body fluid or tissue specimen by shell vial assay or anti-genemia. CMV disease included CMV viral syndrome and CMV focal diseases such as pneumonitis, hepatitis, or gastrointestinal disease. CMV viral syndrome was

**TABLE I** A total of 23 potential risk factors for Aspergillus infection compared in univariate analysis

	Aspergillus infection	No infection	<i>p</i> value
<b>Preoperative factors</b>			
Sex: male/female	13-5 (72.2%-27.8%)	19-18 (51.3%-48.7%)	NS
Mean age (years)	43.7 (range: 15-62)	42.8 (range: 21-67)	NS
Number of patients with bad Karnosky index (<40%)	13/18 (72.2%)	19/37 (51.4%)	NS
Aspergillus colonization	0/18 (0.0%)	2/37 (5.4%)	NS
Chronic bronchial sepsis (cystic fibrosis and bronchiectasis)	5/18 (27.8%)	11/37 (29.7%)	NS
Preop corticosteroid therapy	17/18 (94.4%)	32/37 (86.5%)	NS
CMV mismatch (D+/R-)	0/18 (0.0%)	5/37 (13.5%)	NS
<b>Intraoperative factors</b>			
Single vs bilateral	9-9 (50%-50%)	16-21 (43.2%-56.8%)	NS
Ischemic time (min)	281 ± 90.0	305 ± 87	NS
Cardiopulmonary bypass	4/18 (22.2%)	9/37 (24.3%)	NS
Severe preservation injury	7/18 (38.9%)	17/37 (45.9%)	NS
Hemodialysis	1/18 (5.6%)	4/37 (10.8%)	NS
Reoperation	0/18 (0.0%)	4/37 (10.8%)	NS
Mean no. of hemoderivates packs/patients	8 (range: 0-66)	11.1 (range: 0-50)	NS
Means no. of days in ICU	18.7 (range: 3-34)	21.2 (range: 1-85)	NS
Bronchial anastomosis complication (excluding Aspergillus infection)	4/18 (22.2%)	6/37 (16.2%)	NS
<b>Postoperative factors</b>			
Immunosuppression score	1.7 (range: 0-7)	1.5 (range: 0-6)	NS
Mean no. of treatment with bolus of corticosteroid	1.2 (range: 0-5)	1.1 (range: 0-6)	NS
Mean no. of patients with 2 or more acute rejection episodes	8/18 (44.4%)	10/37 (27%)	NS
Chronic rejection	4/18 (22.2%)	10/37 (27.0%)	NS
Number of patients with CMV disease	11/18 (61.1%)	9/37 (24.3%)	<.05
Diabetes mellitus	3/18 (16.7%)	6/37 (16.2%)	NS
Number of patients with nAB prophylaxis	10/18 (55.6%)	34/37 (91.9%)	<.01

NS = not significant.

defined as persistent fever, with or without leukopenia and thrombocytopenia in patients with positive blood culture or anti-genemia for CMV, in the absence of other causes. CMV focal disease was defined as the isolation of CMV from any tissue or body fluid plus consistent histologic findings. Diagnosis of acute rejection was based on clinical signs and symptoms and chest X-ray findings with or without lung biopsy. Chronic rejection was defined as a persistent drop in FEV<sub>1</sub> of 20% or more compared with baseline with or without histologic findings of bronchiolitis obliterans when other causes of pulmonary dysfunction were ruled out.

#### Data Analysis

A total of 23 potential risk factors, pre-operative, intraoperative, and post-operative, were analyzed for their association with Aspergillus infection (Ta-

ble I). Univariate analysis was performed using chi-square test for categorical variables; Wilcoxon's rank sum test was used to compare continuous variables that were not normally distributed, and analysis of variance or *t*-test was used to compare means of approximately normal continuous variables. Logistic models were developed with the use of forward stepwise regression to assess the risk factors for Aspergillus infection. Differences were considered to be significant at *p* values less than 0.05. Statistical analysis was performed with the SPSSWIN 9.0 package.

#### RESULTS

Fifty-five patients who underwent lung transplantation were studied; nAB was indicated in 44 (80%). Patients were followed for a mean of 14 months (range: 0.3-46 months). Thirty-two of the 55 (58%)

patients studied were alive at the end of follow-up. Eighteen of the 55 (33%) developed *Aspergillus* infection. Mean time elapsed between transplantation and *Aspergillus* infection was 8.8 months (range: 0.3–41 months). Fourteen episodes (78%) were diagnosed 2 months post-transplantation. The cumulative rate of *Aspergillus* infection after 6 and 18 months of follow-up was 26% and 32%, respectively. Crude univariate analysis showed that 91.9% of patients who did not suffer from *Aspergillus* infection and 55.6% of patients suffering from it ( $p < 0.01$ ) were under nAB prophylaxis, respectively. Moreover, in the group of patients who did not develop *Aspergillus* infection, 24.3% of the patients had CMV disease, and in the group of patients who developed *Aspergillus* infection, 61.1% of them had CMV disease ( $p < 0.05$ ) (Table I). Results of multivariate analysis confirmed the importance of nAB as an independent factor to decrease *Aspergillus* infection (odds ratio: 0.13; 95% confidence interval [CI] 0.02–0.69;  $p < 0.05$ ) and maintained CMV disease as an independent risk factor of *Aspergillus* infection after the procedure (odds ratio: 5.1; 95% CI 1.35–19.17;  $p < 0.05$ ).

The type of *Aspergillus* infection was tracheobronchitis in 8 cases, ulcerative tracheobronchitis in 5, and 5 recipients were diagnosed of invasive pulmonary aspergillosis. All the patients with invasive aspergillosis died, 2 with ulcerative tracheobronchitis and none with tracheobronchitis. *Aspergillus fumigatus* was the etiologic agent in 14 episodes (77%); the remaining infections were due to other species of *Aspergillus* spp. During the study period, 12 episodes of colonization due to *Aspergillus* spp. were diagnosed in 12 patients. All episodes of *Aspergillus* colonization were resolved by increasing the dose of nAB to three times a day. One hundred and 6 episodes of colonizations by fungi other than different of *Aspergillus* spp. were diagnosed (Table II). Two patients developed tracheobronchitis by *Blastoschizomyces capitatus* and *Pseudallescheria boydii*, respectively. They were cured with liposomal amphotericin B. The side effects of nAB prophylaxis were cough (14/44, 32%), mild bronchospasm (4/44, 9%), and nausea (3/44, 7%). Only 1 patient had to stop the prophylaxis because of repeated bronchospasm. Four patients observed non-regular compliance and 2 abandoned prophylaxis spontaneously.

## DISCUSSION

The aim of this work was to evaluate the efficacy of nAB as a preventive strategy against *Aspergillus*

**TABLE II** Fungal colonization in 55 lung transplantation patients

	No. of colonizations	No. of patients
<i>Candida albicans</i>	30	27
<i>Candida glabrata</i>	9	9
<i>Candida guilliermondii</i>	4	4
<i>Candida krusei</i>	7	7
<i>Candida lambica</i>	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	6	6
<i>Candida pseudotropicalis</i>	1	1
<i>Candida</i> spp.	10	9
<i>Candida tropicalis</i>	2	2
<i>Cephalosporium</i> sp.	1	1
<i>Fusarium</i> sp.	1	1
<i>Geotrichum capitatum</i>	2	1
<i>Geotrichum</i> spp.	3	3
<i>Hansenula anomala</i>	1	1
<i>Mucor</i> sp.	1	1
<i>Paecilomyces</i> sp.	1	1
<i>Penicillium</i> spp.	16	15
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	1
<i>Scopulariopsis</i> sp.	1	1
<i>Trichosporon capitatum</i>	1	1
<i>Tondopsis glabrata</i>	6	6
Total	106	100

infection using a study of risk factors for this infection in recipients of a lung allograft at our institution. The main results show CMV infection to be an independent risk factor for developing *Aspergillus* infection and that the use of nAB may be useful for preventing this infection. The incidence of systemic fungal infection varies with the type of organ transplanted.<sup>14</sup> *Candida* spp. is the most common cause of fungal infections in the majority of solid organ transplantations, except in lung and heart where the fungal infection is due predominantly to *Aspergillus* spp. The incidence of *Aspergillus* spp. isolation in respiratory samples of lung transplantation patients ranges from 8% to 50% and the rate of patients with disease also ranges from 5% to 20%.<sup>1–3,12</sup> These striking differences between groups are mostly due to differences in definitions of *Aspergillus* infection, because differentiation between colonization and tracheobronchitis or invasive disease may be difficult. Although the overall incidence of *Aspergillus* infection in our hospital was 33%, 44% were tracheobronchitis forms with good prognosis. Other factors could be responsible for this variability in the incidence of *Aspergillus* infection in lung-transplanted patients. *Aspergillus* spp. is ubiquitous and

appears to be transmitted by air; thus, one crucial influencing factor is the degree of environmental exposure.<sup>14</sup> The range of *Aspergillus* spore numbers per mm<sup>3</sup> of ambient air was found to be between 0.2 and 3.5 in the western world.<sup>15</sup> Although no published data exist on spore concentrations in the air of Barcelona, 1 study demonstrated that spores of *Aspergillus* spp. were isolated in the dust of almost half the homes of healthy people.<sup>16</sup> The problem could be more undercontrolled in the case of building works. A construction-associated outbreak of *Aspergillus* infection was reported in 1 hospital.<sup>17</sup> Cases that occur within the early post-transplant weeks suggest an excess of exposure during hospitalization, whereas cases that occur later than 2 months post-lung transplantation may be acquired outside the hospital.<sup>18</sup> In our study, 78% of patients who developed *Aspergillus* infection were diagnosed after 2 months post-transplantation, suggesting a source outside the hospital.

Recognized risk factors for *Aspergillus* infection are neutropenia and chronic corticosteroid intake.<sup>14</sup> In lung transplant patients, CMV pneumonitis,<sup>1,19</sup> airway ischemia,<sup>4</sup> and single lung procedure<sup>2,20</sup> have also been recognized as possible risk factors. No relationship with rejection or augmented immunosuppression was discernible, but this possibility cannot be ruled out.<sup>21</sup> In the present study, only CMV infection was found as an independent risk factor. CMV is an immunomodulating virus that induces a state of additional transient immunosuppression, rendering the host more susceptible to suffering an opportunist microorganism-induced infection.<sup>22-28</sup> Duncan et al.<sup>29</sup> showed that the percentage of lung-transplanted patients who had suffered bacterial or fungal pneumonia was significantly higher in those with a previous diagnosis of CMV-pneumonitis. Yeldandi et al.<sup>1</sup> and Husni et al.<sup>19</sup> found a greater incidence of CMV infection in patients who developed *Aspergillus* infection. On the other hand, other variables also recognized as possible risk factors in other reports were not found in the present study. The reason could be the efficacy of nAB prophylaxis which prevents *Aspergillus* spp. colonization of ischemic airways or native lung.

As the most common route of entry of *Aspergillus* is the respiratory tract, HEPA and laminar airflow rooms have been used to reduce the risk of exposure and subsequent development of aspergillosis in patients undergoing bone marrow transplantation.<sup>17,30</sup> High costs are the obvious disadvantage of this strategy, which is only useful for patients who are vulnerable for limited periods of time, and the

protective effect is lost if the patient is moved outside the HEPA-filtered facility, even for short periods of time.<sup>15,30</sup> In lung transplantation, in which it is likely that many patients acquired the infection after they left hospital, this strategy may be not useful. Low-dose prophylactic IV amphotericin B desoxycholate was used in successful bone marrow transplantation during the pre-transplant and peri-transplant periods.<sup>31</sup> In the early era of lung transplantation, some groups used this strategy but data were not published. The main disadvantage of this approach is that in lung-transplanted recipients, the risk of infection due to *Aspergillus* spp. is prolonged. Itraconazol has been used by some lung transplant groups in the prophylaxis of *Aspergillus* infection and other fungal infections. Encouraging results have been obtained in other immunocompromised patients<sup>32,33</sup> but no data on its efficacy in lung transplantation have been reported. Moreover, itraconazol is more expensive than nAB and its interactions with cyclosporine and other drugs may be problematic. Furthermore, this drug has low bioavailability.<sup>14,34</sup>

Prophylaxis with nAB, the gold standard antifungal drug for the treatment of *Aspergillus* infection, could represent an opportunity to avoid amphotericin B systemic adverse effects with efficiency and low cost. The efficacy of nAB in other immunocompromised patients remains controversial.<sup>7-11</sup> In lung-transplanted patients, only 2 references are available: Reichenspurner et al.<sup>12</sup> showed a 2% incidence of invasive disease due to *Aspergillus* spp. in patients who received prophylaxis with nAB in contrast to historical controls with 12% after the first 12 post-operative months; Calvo et al.<sup>13</sup> using fluconazol plus nAB found no fungal infection during the early post-operative period. The present study on nAB prophylaxis appears to prevent *Aspergillus* infection using a study of risk factors for *Aspergillus* infection. At the end of 1999, 2 years after the end of the study period, 111 patients had used nAB as fungal prophylaxis. Sixteen of these patients were diagnosed with *Aspergillus* infection (14.4%) but only 2 developed invasive pulmonary aspergillosis (1.8%). These figures are similar to those found by Reichenspurner et al.<sup>12</sup>

The safety of nAB was acceptable in most studies with immunocompromised patients.<sup>9,35,36</sup> In lung transplantation, the only side effect observed by Reichenspurner et al.<sup>12</sup> with 5 mg three times a day of nAB was nausea in 7.9% of their patients, which led to discontinuation of treatment in 1.6%. The dose and concentration as used in our study (up to

6 mg three times a day, 1 mg/ml) were also well tolerated, although side effects were more important when the dose was increased.<sup>10,35,36</sup> Due to the lack of knowledge about the appropriate nAB regimen, perhaps when the bronchial anastomosis is particularly vulnerable nAB three times a day seems to be the best option, and 3 or 4 months later a more comfortable regimen of nAB once a day could be the best choice.

A further important point of note is the possibility of systemic absorption of nAB, particularly in the case on lung-transplanted patients who receive other nephrotoxic drugs such as cyclosporine or tacrolimus. Diot et al.<sup>37</sup> found undetectable serum levels of amphotericin B in 3 patients with aspergilloma who received a daily dose of 5 mg of nAB. Myers et al.<sup>8</sup> found significant serum levels (2 µg/ml) in 3 of 5 neutropenic patients who received a dose of 20 mg twice daily, but in none of 7 patients who received lower doses. We evaluated this point<sup>38</sup> and found no levels in 5 patients with 6 mg once a day. Thus, systemic absorption is minimal and nAB-related nephrotoxicity has not been a problem.

In summary, CMV disease increases the probability of *Aspergillus* infection and nAB prophylaxis may be efficient and safe in preventing *Aspergillus* infection in lung-transplanted patients. Further studies evaluating efficacy of nAB are required to confirm this preliminary results.

The authors are indebted to Tina Guerrero for her work in statistical analysis, Christine O'Hara for her help in writing the English version of the manuscript, and Rosa Llòria for her secretarial assistance and technical help.

## REFERENCES

- Yeldandi V, Laghi F, McCabe MA, et al. *Aspergillus* and lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:883-90.
- Westney GE, Kesten S, De Hoyos A, Chapparro C, Winton T, Maurer JR. *Aspergillus* infection in single and double lung transplant recipients. *Transplantation* 1996;61:915-9.
- Cahill BC, Hibbs JR, Savik K, et al. *Aspergillus* airway colonization and invasive disease after lung transplantation. *Chest* 1997;112:1160-4.
- Kramer MR, Denning DW, Marshall SE, et al. Ulcerative tracheobronchitis after lung transplantation. A new form of invasive aspergillosis. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:552-6.
- Schmitt HJ, Bernard EM, Hauser M, Armstrong D. Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1676-9.
- Cicogna CE, White MH, Bernard EM, Ishimura T, Sun MTW, Armstrong D. Efficacy of prophylactic aerosol amphotericin B lipid complex in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:259-61.
- Conneally E, Cafferkey MT, Daly PA, Keane CT, McCann SR. Nebulized amphotericin B as prophylaxis against invasive aspergillosis in granulocytopenic patients. *Bone Marrow Transplant* 1990;5:403-6.
- Myers S, Devine SM, Topper RL, et al. A pilot study of prophylactic aerosolized amphotericin B in patients at risk for prolonged neutropenia. *Leuk Lymphoma* 1992;8:229-33.
- Behre GF, Lenz K, Schilling E, et al. Aerosol amphotericin B inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic cancer patients. *Ann Hematol* 1995;71:287-91.
- Erjavec Z, Woolthuis GMH, Sluiter WJ, Daenen SMGJ, de Pauw B, Halie MR. Tolerance and efficacy of amphotericin B inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:364-8.
- Schwartz S, Behre G, Heinemann V, et al. Aerosolized amphotericin B inhalations as prophylaxis of invasive aspergillus infections during prolonged neutropenia: results of a prospective randomized multicenter trial. *Blood* 1999;93:3654-61.
- Reichenspurner H, Gamberg P, Nitschke M, et al. Significant reduction in the number of fungal infections after lung-, heart-lung, and heart transplantation using aerosolized amphotericin B prophylaxis. *Transplant Proc* 1997;26:627-8.
- Calvo V, Borro JM, Morales P, et al. Antifungal prophylaxis during the early postoperative period of lung transplantation. Valencia Lung Transplant Group *Chest* 1999;115:1301-4.
- Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:781-803.
- Beyer J, Schwartz S, Heinemann V, Siegert W. Strategies in prevention of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed or neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:911-17.
- Dronca MA, Calvo A. Aïllaments de fongs a partir de la pols domiciliària en asmàtics i persones sanes. *Ann Med* 1984;70:52-5.
- Loo VG, Bertrand C, Dixon C, et al. Control of construction-associated nosocomial aspergillosis in an antiquated hematology unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:306-64.
- Rubin RH. Fungal and bacterial infections in the immunocompromised host. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12(suppl):S42.
- Husni RN, Gordon SM, Longworth DL, et al. Cytomegalovirus infection is a risk factor for invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1998;26:753-5.
- Sandur S, Gordon SM, Mehta AC, Maurer JR. Native lung pneumonectomy for invasive pulmonary aspergillosis following lung transplantation: a case report. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:810-3.
- Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:789-818.
- Rubin RH, Cosimi AB, Tolkoff-Rubin NE, et al. Infectious disease syndromes attributable to cytomegalovirus and their significance among renal transplant recipients. *Transplantation* 1977;24:458-64.
- Braun WE, Nankervis G. Cytomegalovirus viremia and bacteremia in renal allograft recipients. *N Engl J Med* 1979;299:1318-9.

24. Rand KH, Pollard RB, Merigan TC. Increased pulmonary superinfections in cardiac-transplant patients undergoing primary cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1978;298:951-53.
25. Chatterjee SN, Fiala M, Weiner J, et al. Primary cytomegalovirus and opportunistic infections: incidence in renal transplant recipients. *JAMA* 1978;240:2446-9.
26. Rubin RH. Infectious disease complications of renal transplantation. *Kidney Int* 1993;44:221-36.
27. Rytel MW, Aguilar-Torres FG, Balay J, et al. Assessment of the status of cell-mediated immunity in cytomegalovirus-infected renal allograft recipients. *Infect Immun* 1976;13:1633-7.
28. Linnemann CC Jr, Kauffman CA, Firts MR, et al. Cellular immune response to cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Infect Immun* 1978;22:176-80.
29. Duncan SR, Paradis IL, Similo S, et al. Sequelae of cytomegalovirus pulmonary infections in lung allograft recipients. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1419-25.
30. Sherertz RJ, Belani A, Kramer BS. Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infections. Unique risk of bone marrow transplant recipients. *Am J Med* 1997;83:709-18.
31. Rousey SR, Russler S, Gottlieb M, Ash RC. Low-dose amphotericin B prophylaxis against invasive *Aspergillus* infections in allogeneic marrow transplantation. *Am J Med* 1991;91:484-92.
32. Todeschini G, Murari C, Pizzolo G, et al. Oral itraconazole plus nasal amphotericin B for prophylaxis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:614-8.
33. Mouy R, Veber F, Blanche S, et al. Long-term itraconazole prophylaxis against *Aspergillus* infections in thirty-two patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1994;125:998-1003.
34. Patterson TF, Peters J, Levine SM, et al. Systemic availability of itraconazole in lung transplantation. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2217-20.
35. Dubois J, Barter T, Gryn J, Pratter MR. The physiologic effects of inhaled amphotericin B. *Chest* 1995;108:750-3.
36. Gryn J, Goldberg J, Johnson E, Siegel J, Inzerillo J. The toxicity of daily inhaled amphotericin B. *Am J Clin Oncol* 1993;16:43-6.
37. Diot P, Rivoire B, Le Pape A, et al. Deposition of amphotericin B aerosols in pulmonary aspergilloma. *Eur Respir J* 1995;8:1263-8.
38. Roman A, Monforte V, Gavalda J, et al. Pharmacokinetics and distribution of nebulized amphotericin B (nAmp) in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:54.

## NEBULIZED AMPHOTERICIN B CONCENTRATION AND DISTRIBUTION IN THE RESPIRATORY TRACT OF LUNG-TRANSPLANTED PATIENTS

VÍCTOR MONFORTE,<sup>1</sup> ANTONIO ROMAN,<sup>1,5</sup> JOAN GAVALDÀ,<sup>2</sup> ROSA LÓPEZ,<sup>3</sup> LEONOR POU,<sup>3</sup> MARC SIMÓ,<sup>4</sup> SANTIAGO AGUADÉ,<sup>4</sup> BERNAT SORIANO,<sup>4</sup> CARLES BRAVO,<sup>1</sup> AND FERRAN MORELL<sup>1</sup>

**Background.** A criticism of using nebulized amphotericin B (nAB) as prophylaxis against *Aspergillus* infection after lung transplantation is the lack of knowledge of its pharmacokinetics and distribution in the lung. The aim of this study was to ascertain the concentrations and distribution of nAB in the respiratory tract of patients receiving lung transplantations.

**Methods.** In the drug-concentration study, 120 bronchoscopies were performed in 39 patients receiving lung transplantations after administration of 6 mg of nAB once daily for a minimum of 7 days. Mean nAB concentration in bronchial aspirated secretions (BAS) and bronchoalveolar lavage (BAL) was determined at 4, 12, 24, and 48 hours postnebulization. In the distribution study, 17 patients inhaled 6 mg of <sup>99m</sup>technetium-labeled AB, and pulmonary distribution was measured using a gamma camera. Pulmonary perfusion was also measured. Both tests were quantitatively evaluated.

**Results.** In the drug-concentration study, mean concentrations of 1.46 µg/mL in BAS and 15.75 µg/mL in BAL were reached at 4 hours. At 24 hours, concentrations were 0.37 µg/mL and 11.02 µg/mL in BAS and BAL, respectively. In the distribution study, <sup>99m</sup>technetium-labeled AB distribution was uniform in 12 of 13 allografts without bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) and in 1 of 4 allografts with BOS. A close correlation was observed between regional drug distribution and regional perfusion ( $r=0.82$ ,  $P<0.01$ ).

**Conclusions.** nAB concentrations remained high for the first 24 hours in BAL and for less time in BAS, with distribution of the drug being uniform in patients without BOS. Furthermore, lung-perfusion studies appear to be useful to ascertain nAB distribution in patients receiving lung transplantations.

Patients receiving lung transplantations appear to be particularly susceptible to infection by *Aspergillus* spp. The incidence of invasive aspergillosis in these patients ranges from 5 to 20% (1-8). Despite the advent of several groups of

antifungal drugs in recent years, *Aspergillus* infection is associated with persistently high mortality. Prophylaxis with nebulized amphotericin B (nAB), the gold standard antifungal drug for the treatment of *Aspergillus* infection, could represent an opportunity to avoid AB systemic adverse effects with efficacy and low cost. The efficacy of nAB in other immunocompromised patients remains controversial (9-13). In patients receiving lung transplantations, nAB appears to be a safe and efficacious prophylaxis (2, 7). To date, no studies on pharmacokinetics and distribution of nAB in the respiratory tract of lung-transplant recipients or other immunodepressed patients have been reported. On the other hand, the clinical usefulness of nAB would be limited by renal toxicity if AB passed from the lungs to the blood stream.

The aim of this study was to ascertain the concentration and distribution of nAB in the respiratory tract of patients receiving lung transplantations. The study consisted of two parts: in the first, the objective was to ascertain the drug concentration of nAB in the lung, and in the second, radio-aerosol techniques were used to measure the distribution of nAB deposited in the lungs.

### METHODS

#### Drug-Concentration Study

**Patients.** From June 1998 to September 1999, one hundred and twenty consecutive bronchoscopies were performed in 39 patients receiving lung transplantations. Forty bronchoscopies were performed after 4 hours postnebulization, a further 40 were performed at 12 hours, 25 at 24 hours, and 15 at 48 hours. The interval between bronchoscopies was a minimum of 1 month in patients undergoing more than one. Indications of bronchoscopy were always established because of clinical indication or surveillance. Patients with fever, pneumonia, hypoxemia, hemodynamic instability, or mechanical ventilation were excluded. Patient characteristics are shown in Table 1. All patients were under nAB prophylaxis for a minimum of 7 days at a dose of 6 mg/day. In the first five patients, AB serum concentration was measured after nebulization.

**Drug administration.** Fifty milligrams of AB desoxycholate for injection (Fungizona; Squibb, Barcelona, Spain) was dissolved in 10 mL of sterile water to obtain a concentration of 5 mg/mL, then this solution was diluted in sterile water for a total volume of 50 mL with one final concentration of 1 mg/mL. Six mL of this solution (6 mg of AB) were nebulized by a jet nebulizer (System 22 Acorn with a CR60 compressor, Alerbio, Madrid, Spain; air pressure 27.2 psi and flow 7.3 L/min) with the patient seated until the end of nebulization. Patients were instructed by a trained staff nurse to inhale through a mouthpiece and exhale through the nose to protect the upper airways. The procedure lasted 15 to 20 minutes. All patients received two puffs of salbutamol from a metered dose inhaler before nebulization of AB. The mass-median aerodynamic diameter (MMAD) of nebulized particles was 2.5 µm as measured by an aerodynamic particle size aerosol spectrometer (APS 3320, TSI). A previous study

This study was supported by grant FISS 95/1370 and Fepar-Infecciones 94.

<sup>1</sup> Department of Pneumology, Hospital General Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Department of Infectious Diseases<sup>o</sup>, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup> Department of Biochemistry<sup>o</sup>, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup> Department of Nuclear Medicine<sup>o</sup>, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

<sup>5</sup> Address correspondence to: Dr. Antonio Roman, Servei de Pneumologia, Hospital General Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona. E-mail: aroman@hg.vhebron.es.

Received 13 June 2002. Accepted 6 November 2002.

DOI: 10.1097/01.TP.0000064233.60100.7A

1571

TABLE 1. Characteristics of patients and bronchoscopies performed

Number of patients	39
Mean age (years)	44.2 (range 15-67)
Sex: male/female	33/16
Single/bilateral lung transplantation	15/24
Underlying disease	COPD/emphysema 12, pulmonary fibrosis 9, bronchiectasis 6, cystic fibrosis 5, primary pulmonary hypertension 3, bronchiolitis post NH <sub>3</sub> inhalation 1, histiocytosis×1, lymphangioleiomyomatosis 1, hemosiderosis 1
Number of bronchoscopies	120
Bronchoscopy/patient	Mean 3.23 (range 6-1)
Time from transplant to bronchoscopy	Mean 233 days (range 13-1451)
Bronchoscopy diagnosis	Surveillance 62, bronchitis 35, acute rejection 17, chronic rejection 6, anastomosis complications 6, CMV infection 4, hemoptysis 1
Bronchoscopies in hospitalised patients	24/120 (20%)
Bronchoscopies in patients with BOS	18/120 (15%)
Bronchoscopies in patients with significant stenosis of anastomosis.	18/120 (15%)

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; BOS, bronchiolitis obliterans syndrome; CMV, cytomegalovirus.

showed that AB prepared for nebulization and stored at 4°C remained stable for 30 days (14).

**Bronchoscopic procedure and sample collection.** Bronchoscopy was performed through the nose in most cases. Before sample collection, 10 mL of lidocaine 2% was administered as local anesthetic and immediately aspirated. Samples obtained were bronchial aspirated secretions (BAS) and bronchoalveolar lavage (BAL). For BAS, endobronchial secretions were aspirated and collected during the procedure. For BAL, the tip of the bronchoscope was wedged into a subdivision of a segmental bronchus of the right middle lobe or the lingula. BAL was then performed by instillation of a first aliquot of 20 mL and three separated aliquots of 50 mL of sterile isotonic saline solution. The first aliquot was eliminated for AB assaying. The instilled fluid was then reaspirated by gentle manual suction. Dwell time of the instilled fluid in BAL averaged 20 seconds. The samples were classified in two groups depending on whether the samples stemmed from bronchoscopy where secretions were observed or not.

**Blood samples.** Blood samples from five patients were obtained immediately before the start of AB nebulization and at 30 minutes and 2, 4, 8, and 12 hours after the start of AB nebulization.

**Amphotericin assay and final concentration calculation.** In a previous study, a reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for assaying AB in respiratory secretions (BAS and BAL) was reported (15). BAL was a diluted sample. The final drug concentration was calculated assuming that 1% of the recovered BAL corresponded to the volume of the epithelial lining fluid (ELF):  $C_{ELF/BAL} = (C_{BAL} \times V_{BAL}) / (0.01 \times V_{ELF})$ , where  $C_{ELF/BAL}$  is the final amphotericin concentration present in the ELF of the BAL,  $C_{BAL}$  is the concentration found in BAL analysis, and  $V_{BAL}$  is the volume recovered in BAL. An HPLC method for assaying AB in human serum was described in another study (16).

**Statistical analysis.** Mean and 95% confidence intervals (CI) of AB concentrations from BAS and BAL were calculated at 4, 12, and 24 hours postnebulization. The Mann-Whitney *U* test was used to compare mean concentrations between BAS and BAL at each time and mean concentrations between samples from bronchoscopies with and without secretions at 4 and 12 hours. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

#### Distribution Study

From November 1998 to February 1999, 17 patients (age range 22-60 years; mean 42) were studied. Six patients had received single-lung allografts (5 for idiopathic pulmonary fibrosis and 1 for emphysema) and 11 double-lung allografts (3 for emphysema, 3 for bronchiectasis, 3 for cystic fibrosis, and 1 for primary pulmonary hypertension and another for lymphangioleiomyomatosis, respectively). Mean time elapsed from transplant was 25 months (range

5-55). Four patients had biopsy-proven bronchiolitis obliterans. In these patients, forced expiratory volume in 1 second (FEV<sub>1</sub>) decreased from 51 to 35% (mean 40%). All patients were clinically stable at the time of the study.

**Drug preparation and aerosol generation.** A 0.1 mL solution containing 0.2 mg/mL stannous chloride as reductant agent was added to 25 mg of AB in aqueous solution, after which 400 to 600 MBq of <sup>99m</sup>Tc-pertechnetate was added. With this method, labeling efficiency by HPLC was over 95%, with proven stability for 40 hours. Six milligrams of AB labeled with <sup>99m</sup>Tc (nAB-<sup>99m</sup>Tc) were administered by way of a closed-circuit nebulization system (VENTICIS II) with a CR60 compressor. Inhalation was performed with the patient seated until the end of nebulization (10-20 minutes).

**Regional measurements.** The images were captured with a gamma camera in six different projections (anterior, posterior, right anterior oblique, left anterior oblique, right posterior oblique, and left posterior oblique) with patients in the decubitus position. The gamma camera used was an Elscint Helix, with double head detector, equipped with low-energy and high-resolution collimators, and a detection window of <sup>99m</sup>Tc (140 KeV 1 10%). Images were obtained at 150 seconds per image. The images were registered in the computer for posterior quantification. Pulmonary distribution of nAB-<sup>99m</sup>Tc was expressed in terms of the pulmonary quadrants: upper right, lower right, upper left, and lower left. The amount of nAB-<sup>99m</sup>Tc deposition in a particular quadrant can be expressed as a percentage of the sum of nAB-<sup>99m</sup>Tc activity in the four quadrants. Buccopharyngeal and gastric activity of nAB-<sup>99m</sup>Tc were also measured. Furthermore, regional pulmonary perfusion was measured using 259 MBq of intravenous <sup>99m</sup>Tc-albumin macroaggregates with the same detector equipment, detection conditions, projections, and number of images as in the drug-distribution study. The same regions of interest as in drug distribution were used to determine the percentage of regional perfusion.

**Statistical analysis.** The means of nAB-<sup>99m</sup>Tc aerosol deposition and perfusion among the different quadrants were compared by the Mann-Whitney *U* test. Relationships between regional percentages of aerosol deposition and perfusion were studied by linear regression analysis (17); *P* < 0.05 was considered significant.

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Clinical Research of the Hospital Universitari Vall d'Hebron and the Ministerio de Sanidad y Consumo. Informed written consent was obtained from the patients taking part in the study.

## RESULTS

### Drug-Concentration Study

Mean fluid recovered was 80.1 mL (SD±24.4) in BAL. Mean AB concentrations at each time point in BAS and BAL

are shown in Table 2. At 4 hours, mean concentrations of AB were 1.46  $\mu\text{mL}$  (95% CI 0.81–2.12), and 15.75 (CI 95% 10.93–20.58) in BAS and BAL, respectively. Thereafter, concentrations declined progressively. At 24 hours, concentrations were 0.37  $\mu\text{mL}$  (CI 95% 0.19–0.55) in BAS and 11.02  $\mu\text{mL}$  (CI 95% 6.99–15.05) in BAL. The mean of AB concentration in BAS and BAL in patients with and without respiratory secretion was similar (Table 3). No traces of AB levels were found in serum samples of five patients.

#### Distribution Study

In 13 patients receiving lung transplantations (8 bilateral sequential lung transplantations [BSLT] and 5 single-lung transplantations [SLT]) without bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), the distribution of nAB- $^{99m}\text{Tc}$  was uniform in all allografts (Fig. 1A), except in 1 who had a moderate nonuniform distribution. Three of the 4 patients with BOS (3 BSLT) had a patchy nAB- $^{99m}\text{Tc}$  distribution in the allograft (Fig. 1B). In the fourth patient (SLT), nAB- $^{99m}\text{Tc}$  distribution was uniform. Four of 6 native lungs (3 idiopathic pulmonary fibrosis and 1 emphysema) had nonuniform nAB- $^{99m}\text{Tc}$  distribution (Fig. 1C); in 1, nAB- $^{99m}\text{Tc}$  was not detected (idiopathic pulmonary fibrosis), and the distribution was considered uniform in the last patient (idiopathic pulmonary fibrosis). In the 6 recipients of single-lung allografts, preferential drug deposition occurred in the allograft (72.2%  $\text{SD} \pm 12.6$  of nAB- $^{99m}\text{Tc}$  in the allograft vs. 27.8%  $\text{SD} \pm 12.6$  in native lung,  $P < 0.01$ ) (Fig. 1C), except in 1 who had main bronchus stenosis of allografts (54% nAB- $^{99m}\text{Tc}$  in allograft vs. 46% in native lung). In this last patient, deposition was high in the stenosed bronchus. Symmetrical drug deposition was observed in double-lung allograft recipients.

Less drug deposition was detected in upper compared with lower lobes (57.8%,  $\text{SD} \pm 7.5$ , in lower lobes vs. 42.2%,  $\text{SD} \pm 7.5$  in upper lobes,  $P < 0.01$ ). In four patients, significant deposition of the drug was found in the buccopharyngeal area and in the stomach in two patients (Fig. 1, A and C). A close correlation existed between regional drug distribution and regional perfusion ( $r = 0.82$ ,  $P < 0.01$ ). This close correlation was maintained in the allograft lungs with and without BOS ( $r = 0.79$ ,  $P < 0.01$  and  $r = 0.82$ ,  $P < 0.01$ , respectively) and in native lung ( $r = 0.62$ ,  $P < 0.05$ ).

#### DISCUSSION

The present investigation, to our knowledge the first dealing with the concentrations and distribution of nAB in respiratory tract of lung transplantation patients, was designed to obtain a better scientific basis for the use of AB by this new administration route. The drug-concentration study shows that nAB achieved sufficient concentrations in respiratory samples to be used as a therapeutic tool for *Aspergillus*

TABLE 2. Amphotericin B concentrations/time (mean, CI 95%) in BAS and BAL

Time	n	BAS in $\mu\text{g/mL}$ (CI 95%)	BAL in $\mu\text{g/mL}$ (CI 95%)	P value
4 h	40	1.46 (0.81–2.12)	15.75 (10.93–20.58)	<0.01
12 h	40	0.71 (0.35–1.08)	13.66 (9.53–17.80)	<0.01
24 h	25	0.37 (0.19–0.55)	11.02 (6.99–15.05)	<0.01
48 h	15	0.08 (0.04–0.12)	10.58 (6.56–14.60)	<0.01

CI, confidence interval; BAS, bronchial aspirated secretions; BAL, bronchoalveolar lavage.

TABLE 3. Mean amphotericin B concentrate and CI 95% in BAS and BAL in bronchoscopies with and without respiratory secretion

Time	n	With secretion (CI 95%)	Without secretion (CI 95%)	P value
BAS				
4 h	16/24	1.5 (0.6–2.6)	1.4 (0.8–2.2)	n.s.
12 h	17/23	0.7 (0.2–1.3)	0.7 (0.2–1.2)	n.s.
BAL				
4 h	16/24	15.7 (8.6–22.7)	15.7 (9.2–22.3)	n.s.
12 h	17/23	11.4 (5.4–17.5)	14.9 (9.5–20.3)	n.s.

CI, confidence interval; BAS, bronchial aspirated secretions; BAL, bronchoalveolar lavage.

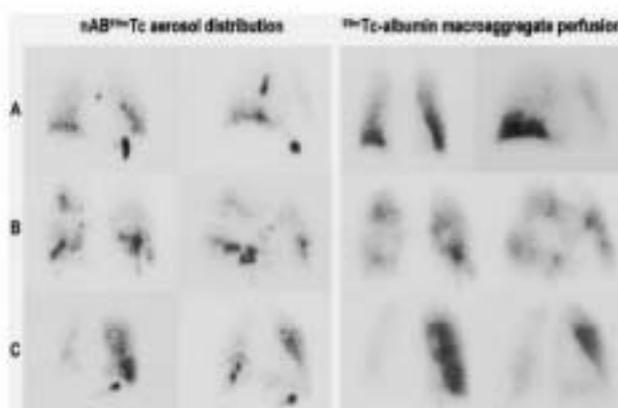


FIGURE 1. Nebulized amphotericin B labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  (nAB- $^{99m}\text{Tc}$ ) aerosol distribution and  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin macroaggregate perfusion images. (A) Bilateral sequential lung transplantation without bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). (B) Bilateral sequential lung transplantation with BOS. (C) Single left-lung transplant.

infection prophylaxis in lung-transplant recipients. The greatest amount of AB was found in BAL and the lowest concentration in BAS. It must be taken into account that BAL provides an optimum sample from the distal airway (18), whereas BAS probably approximates most to real nAB concentrations in the proximal airway where bronchial anastomosis is placed. Interpretation of a BAS sample is difficult, but the fundamental component of BAS appears to be mucosal secretions from submucosal glands, which are predominantly located in trachea and large bronchi (19). Therefore, the AB concentrations that were found were greater in the distal bronchial tree. This difference in concentrations may be caused by the accumulation of nAB in the respiratory tract after multiple doses. If part of the elimination occurs by mucociliary clearance and is more rapid in the proximal tree (20, 21), accumulation of the drug will be more significant in distal zones, as represented in this study by BAL.

These findings should be kept in mind when considering a prophylaxis strategy in patients receiving lung transplantations. The concentration of AB necessary to prevent *Aspergillus* proliferation is not well known. However, the minimum inhibitory concentration ( $\text{MIC}_{90}$ ) of 1  $\mu\text{g/mL}$  could suffice to prevent proliferation of the most sensitive species (22, 23). Thus, with 6 mg/day of nAB, sufficient concentrations are achieved to avoid fungal proliferation in distal zones of the

respiratory tract for more than 24 hours. However, in the most proximal zone where the bronchial anastomosis is located, the concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  is only exceeded during the early hours postnebulization. Therefore, because the bronchial anastomosis is highly susceptible to *Aspergillus* infection (24, 25) during the early weeks postsurgery and until the bronchial healing process is completed, the dose of 6 mg/day would probably need to be increased. It is documented that 6 mg of nAB 3 times a day appears to be effective in reducing the incidence of *Aspergillus* infection in the early postoperative period, whereas 6 mg of nAB once a day might suffice later (2).

The absence of significant systemic absorption of nAB is particularly important in patients receiving lung transplantations because they are under other nephrotoxic treatments, such as cyclosporine or tacrolimus, for life. Data in the literature generally favor poor systemic absorption of AB when inhaled (10, 26). Thus, the absence of nAB-related nephrotoxicity is the real reason why nAB prophylaxis can be maintained for the long term.

A distribution study of nAB- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  showed a uniform distribution in the graft without BOS. However, in the case of grafts with BOS and in residual native lungs, nAB- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  distribution was more patchy. In patients with BOS, where *Aspergillus* infection is one of the common complications (6), determination of the success or failure of inhaled prophylaxis could potentially be influenced by this distribution. These patients may have a combination of nonuniformly distributed restrictive and obstructive processes, which may affect regional drug deposition (17). In addition, in single-lung recipients, the role of the residual native lung could be important in the pathogenesis of *Aspergillus* infection because of the lack of nAB distribution in this lung.

In the present study, the close correlation found between deposition and regional perfusion indicated a cause and effect relationship. This is because of the fact that homeostatic mechanisms of the lung tend to minimize the ventilation-perfusion mismatch, with the best ventilated areas being those that receive proportionally greater perfusion (17). This close correlation implies that good information can be obtained on nAB distribution with a perfusion study. Thus, a nonhomogeneous perfusion scintigraph of the graft in a patient with BOS indicates deficient nAB distribution and may not permit full protection of the whole lung area.

In summary, the concentrations reached by nAB in the distal airway appear sufficient to prevent *Aspergillus* infection. However, in more proximal zones, the concentrations seem insufficient, and an increase in the dose may be required until the bronchial anastomosis is completely remodeled. In the case of a nonuniform perfusion distribution in the perfusion scan as a consequence of BOS, it may be necessary to increase the dose of nAB. Studies on efficacy will be required to confirm this prophylactic strategy.

**Acknowledgments.** The authors thank Merche Catalan for her skillful work in fiberbronchoscopic procedures, María-Jesús Cruz for her work in particle size determination, Christine O'Hara for help in writing the English version of the manuscript, and Rosa Lloria and Maite Valdeolivas for technical assistance.

#### REFERENCES

- Yektaei V, Laghi F, McCabe MA, et al. *Aspergillus* and lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: 883.
- Monforte V, Roman A, Gavaldà J, et al. Nebulized amphotericin B prophylaxis for *Aspergillus* infection in lung transplantation: study of risk factors. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 1274.
- Patterson JE, Peters J, Calhoun JH, et al. Investigation and control of aspergillosis and other filamentous fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2000; 2: 22-28.
- Mehrad B, Paciooco G, Martínez FJ, et al. Spectrum of *Aspergillus* infection in lung transplant recipients: case series and review of the literature. *Chest* 2001; 119: 169.
- Guillemin R, Lavardo V, Amrein C, et al. Invasive aspergillosis after transplantation. *Transplant Proc* 1995; 27: 1307.
- Westney GE, Keeten S, De Hoyos A, et al. *Aspergillus* infection in single and double lung transplant recipients. *Transplantation* 1996; 61: 915.
- Reichenspurner H, Gansberg P, Nitschke M, et al. Significant reduction in the number of fungal infections after lung-, heart-lung, and heart transplantation using aerosolized amphotericin B prophylaxis. *Transplant Proc* 1997; 29: 627.
- Cahill BC, Hibbs JR, Savik K, et al. *Aspergillus* airway colonization and invasive disease after lung transplantation. *Chest* 1997; 112: 1160.
- Connolly E, Caffrey MT, Daly PA, et al. Nebulized amphotericin B as prophylaxis against invasive aspergillosis in granulocytopenic patients. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 403.
- Myers S, Devine SM, Topper RL, et al. A pilot study of prophylactic aerosolized amphotericin B in patients at risk for prolonged neutropenia. *Leuk Lymphoma* 1992; 8: 229.
- Behre G, Leuz K, Schilling E, et al. Aerosol amphotericin B inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic cancer patients. *Ann Hematol* 1995; 71: 287.
- Erjavec Z, Woolthuis GM, Sluiter WJ, et al. Tolerability and efficacy of amphotericin B inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in hematological patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 364.
- Schwartz S, Behre G, Heinemann V, et al. Aerosolized amphotericin B inhalations as prophylaxis of invasive aspergillosis during prolonged neutropenia: results of a prospective randomized multicenter trial. *Blood* 1999; 93: 3654.
- Juarez JC, Lopez RM, Hueto M, et al. Stability of amphotericin B in water solution for inhalation. *Eur Hosp Pharm* 1997; 3: 59.
- Lopez R, Pou L, Andres I, et al. Amphotericin B determination in respiratory secretions by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; 812: 135.
- Lopez-Galera R, Pou-Clave L, Pascual-Mostaza C. Determination of amphotericin B in human serum by liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 674: 298.
- O'Riordan TG, Iacono A, Keenan RJ, et al. Delivery and distribution of aerosolized cyclosporine in lung allograft recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 151: 516.
- Walters EH, Gardiner PV. Bronchoalveolar lavage as a research tool. *Thorax* 1991; 46: 613.
- McCray PB, Walsh MJ. Transport function of airway epithelia and submucosal glands. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, et al., eds. *Fishman's pulmonary diseases and disorders*. New York, McGraw-Hill 1998, pp. 129-137.
- Wilkey DD, Lee PS, Hass FJ, et al. Mucociliary clearance of deposited particles from the human lung: intra- and inter-subject reproducibility, total and regional lung clearance, and model comparisons. *Arch Environ Health* 1980; 35: 294.
- Reznik G, Borgmeyer L. Deposition and clearance of labeled cigarette smoke particles in rat respiratory and digestive tract. *J Toxicol Environ Health* 1980; 6: 433.
- Johnson EM, Ojwang JO, Szekely A, et al. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1412.
- Chandrasekar PH, Cutright JL, Manavathu EK. *Aspergillus*: rising frequency of clinical isolation and continued susceptibility to antifungal agents, 1994-1999. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41: 211.
- Kramer MR, Donning DW, Marshall SE, et al. Ulcerative tracheobronchitis after lung transplantation. A new form of invasive aspergillosis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 552.
- Nathan SD, Shorr AF, Schmidt ME, et al. *Aspergillus* and endobronchial abnormalities in lung transplant recipients. *Chest* 2000; 118: 403.
- Diot P, Rivoire B, Le Pape A, et al. Deposition of amphotericin B aerosols in pulmonary aspergilloma. *Eur Respir J* 1995; 8: 1263.