

# Estudio de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de mohos y levaduras a itraconazol y voriconazol

Yolanda Morera López<sup>1</sup>, Josep María Torres-Rodríguez<sup>1,2</sup> y Teresa Jiménez Cabello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Recerca en Micologia Experimental i Clínica - URMEC, Institut Municipal d'Investigació Mèdica y  
<sup>2</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

## Resumen

La disponibilidad de una formulación intravenosa de itraconazol ha incrementado el interés por conocer la actividad *in vitro* de este antifúngico en relación al voriconazol. Por esta razón se ha determinado la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 62 aislamientos clínicos de cinco especies de hongos miceliares y de 100 aislamientos del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans*.

El método utilizado ha sido el de microdilución en placa siguiendo los documentos M38-A y M27-A2 del National Committee for Clinical Laboratory Standards.

La CMI<sub>90</sub> de itraconazol y voriconazol para *Aspergillus fumigatus* fue de 0,125 µg/ml. Destaca la elevada sensibilidad de la fase miceliar de *Sporothrix schenckii* al itraconazol (p = 0,001). Voriconazol resultó más activo sobre *Scedosporium apiospermium* mientras que *Scedosporium prolificans* fue resistente a los dos antifúngicos. Algunos aislamientos de *Rhizopus stolonifer* fueron sensibles al itraconazol y resistentes al voriconazol sin significación estadística. La sensibilidad *in vitro* de las nueve especies de *Candida* fue similar para itraconazol y voriconazol, excepto en el caso de *Candida glabrata* para quien voriconazol presentó CMI más bajas. Algunos aislamientos de *Candida albicans* resistentes a fluconazol fueron sensibles a itraconazol y/o voriconazol. Las CMI de itraconazol contra *C. neoformans* fueron menores que las de voriconazol.

*In vitro* itraconazol y voriconazol presentan una actividad antifúngica similar excepto sobre *S. schenckii*. No obstante, existen diferencias entre los aislamientos de una misma especie.

## Palabras clave

Itraconazol, Voriconazol, Sensibilidad *in vitro*, Levaduras, Hongos miceliares

## Dirección para correspondencia:

Dr. Josep M. Torres-Rodríguez  
URMEC/IMIM  
Dr. Aiguader 80  
E-08003, Barcelona, Spain  
Tel.: +34 93 2211009  
Fax: +34 93 2213237  
Correo electrónico: jmtorres@imim.es

Aceptado para publicación el 7 de junio de 2005

## ***In vitro* susceptibility study of micelial fungal and yeast isolates to itraconazole and voriconazole**

**Summary** The interest on the *in vitro* susceptibility to itraconazole, has recently increased due the availability of the intravenous formulation. In this study, comparative MICs of this antifungal with voriconazole were carried out in 62 clinical isolates of filamentous fungi and 100 yeasts isolates using the NCCLS microbroth methods described in M38-A and M27-A2 documents. A MIC<sub>90</sub> of 0.125 µg/ml was observed for itraconazole and voriconazole against *Aspergillus fumigatus*. Higher susceptibility to itraconazole was found for the filamentous form of *Sporothrix schenckii* (p = 0.001). Voriconazole was more effective against *Scedosporium apiospermium* while *Scedosporium prolificans* isolates were resistant to both azoles. Some isolates of *Rhizopus stolonifer* were susceptible to itraconazole and resistant to voriconazole, but without statistical significance. Susceptibility of nine species of *Candida* was similar for both triazoles used in this study. However, *Candida glabrata* was more susceptible to voriconazole. Some fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates were susceptible to itraconazole and / or voriconazole. *Cryptococcus neoformans* was more susceptible to itraconazole than to voriconazole. Itraconazole and voriconazole showed very close *in vitro* activity against the tested fungal isolated, except against *S. schenckii*. In spite of this, there were some differences in susceptibility among isolates within the same fungal species.

**Key words** Itraconazole, Voriconazole, In vitro susceptibility, Yeast, Filamentous fungi

La reciente aparición de la forma inyectable de itraconazol (ITZ) [2,22] ha replanteado su uso en el tratamiento de las micosis oportunistas graves. Si bien existen publicaciones en las que se presentan resultados de la sensibilidad *in vitro* de este triazol [10,17], sólo en un número reducido se pueden comparar los resultados entre itraconazol y voriconazol (VCZ), de más reciente comercialización.

La sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de los hongos filamentosos no ha tenido el mismo desarrollo que en el caso de las levaduras; si bien en los últimos años se han publicado documentos que estandarizan los métodos de estudio [15,16] probablemente no son aplicables a todos los hongos miceliales o dimorfos en su fase micelial.

El conocimiento de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y de las concentraciones mínimas fungicidas (CMF) son un paso ineludible a la hora de elegir el tratamiento más indicado en un paciente con micosis sistémica y es particularmente importante cuando se trata de dos antifúngicos muy similares, como es el caso del ITZ y VCZ, teniendo presente, además de la sensibilidad, otros factores como su farmacodinámica, seguridad y coste económico.

El objetivo del presente estudio fue determinar las CMI de los antifúngicos ITZ y VCZ para mohos y levaduras aislados de pacientes con micosis.

### **Materiales y métodos**

**Microorganismos.** Se han estudiado 62 aislamientos clínicos de hongos miceliales y 100 de levaduras (80 del género *Candida* y 20 de *Cryptococcus neoformans*) aislados de diferentes pacientes con micosis profundas en su mayoría ingresados en los servicios de Enfermedades Infecciosas o de Medicina Intensiva del Hospital del Mar (Barcelona). Los aislamientos estudiados fueron: *Aspergi-*

*llus fumigatus* (19 aislamientos) procedentes de pacientes con aspergilosis pulmonar invasora o aspergiloma, *Scedosporium apiospermium* (7), *Scedosporium prolificans* (9 aislamientos, de los que cuatro fueron cedidos por el Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona), y *Rhizopus stolonifer* (5). Los 22 aislamientos de *Sporothrix schenckii* procedían de enfermos con esporotricosis cutaneolinfática y fueron cedidos por el Instituto de Medicina Tropical Von Humbolt (Lima, Perú).

Las levaduras del género *Candida*, se aislaron de pacientes del Hospital de Mar con candidiasis orofaríngea y/o esofágica, infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, o de candidiasis sistémicas en enfermos ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Las especies estudiadas fueron: *Candida albicans* (25 aislamientos, incluyendo ocho cepas con CMI de fluconazol -FCZ- >64 µg/ml), *Candida glabrata* (15), *Candida krusei* (10), *Candida tropicalis* (6), *Candida guilliermondii* (5), *Candida parapsilosis* (5), *Candida pelliculosa* (5), *Candida lipolytica* (5) y *Candida lusitanae* (4). Las 20 cepas de *C. neoformans* fueron aisladas del líquido cefalorraquídeo de pacientes con criptococosis ingresados en el Servicio de Enfermedades Infecciosas.

Todos los aislamientos fueron conservados en la colección del URMEC hasta el momento de ser utilizadas en que se sembraron en medio de agar glucosado de Sabouraud o Sabouraud diluido, según la especie, para un control de calidad, comprobándose la pureza del cultivo y verificándose que se trataba de la especie indicada.

Como cepas de control de calidad se utilizaron *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

**Metodología del estudio.** El método de microdilución que se empleó fue el descrito en el documento M38-A [16], para los hongos miceliales, y en el documento M 27-A2 [15], para levaduras, del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

**Antifúngicos.** El ITZ fue proporcionado por los laboratorios Janssen (Research-Foundation, Bélgica) y el VCZ por Pfizer Pharmaceuticals (Groton, EE.UU.). Las soluciones madre del antifúngico fueron preparadas en dimetil sulfóxido al 100% (DMSO). Los antifúngicos se disolvieron a una concentración 100 veces mayores que la dosis máxima evaluada (1,6 mg/ml) y fueron conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la inoculación de las placas.

Las concentraciones finales se prepararon para ambos antifúngicos con el medio de cultivo a un rango entre 0,03 y 16  $\mu\text{g/ml}$ .

**Determinación de la CMI.** El estudio de sensibilidad in vitro se realizó en microplacas estériles utilizando el medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, EE.UU.) suplementado con glucosa 18 g/l en 3-[N-Morpholino] ácido propanosulfónico (MOPS) a pH 7.

Fueron añadidos 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión de levaduras a una concentración de  $0,5\text{-}2,5 \times 10^3$  UFC/ml a cada pocillo de la microplaca. Para los hongos miceliarios se inocularon 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de una suspensión de conidias de  $1 \times 10^5$  UFC/ml.

Como control del inóculo se cultivaron diferentes concentraciones de las suspensiones fúngicas en agar glucosado de Sabouraud.

Las placas con levaduras se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h (*Candida*) o 72 h (*Cryptococcus*), mientras que las de los hongos miceliarios se incubaron durante siete días.

Se valoraron las CMIs ( $\geq 50\%$  de inhibición, respecto al control) en el menor tiempo de incubación en el que los controles de crecimiento mostraron un buen desarrollo del hongo. Como término general, *Rhizopus* a las

24 h, *Aspergillus* a las 48 h, y la lectura de los restantes se realizó a las 72 h. Las CMIs se valoraron visualmente y también por espectrofotómetro con un filtro de 414 nm (Multiscan Labsystem MS, Finland) después de la agitación de las placas.

**Análisis estadístico.** Para el análisis estadístico se compararon los valores mediante la prueba de Wilcoxon, la significación estadística se consideró con  $p < 0,05$ . Los resultados se analizaron con el programa SPSS (EE.UU.).

## Resultados

En la tabla 1 se presentan las CMIs para los dos antifúngicos estudiados correspondientes a las cepas de hongos miceliarios. El análisis estadístico global no mostró diferencias significativas entre ITZ y VCZ.

En la tabla 2 se muestran los resultados para las diferentes especies de levaduras. En algunas especies de *Candida* se apreciaron diferencias significativas entre ambos antifúngicos, mientras que en *Cryptococcus* no.

Las CMI del ITZ para las cepas de control de calidad estuvieron dentro de los límites descritos.

*A. fumigatus* presentó los resultados más homogéneos de sensibilidad a ITZ y VCZ. Las CMI no superaron los  $0,25 \mu\text{g/ml}$  ( $\text{CMI}_{90} = 0,125 \mu\text{g/ml}$ ), sin diferencias significativas entre ambos antifúngicos.

Los 22 aislamientos de *S. schenckii* fueron altamente sensibles al ITZ ( $\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$ ). Las CMIs de VCZ fueron  $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ . Estas diferencias resultaron ser estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 1.** Rango, media geométrica,  $\text{CMI}_{50}$  y  $\text{CMI}_{90}$  para itraconazol y voriconazol contra las cepas de hongos miceliarios.

Especies	N	Itraconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )				Voriconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		Rango	MG	$\text{CMI}_{50}$	$\text{CMI}_{90}$	Rango	MG	$\text{CMI}_{50}$	$\text{CMI}_{90}$
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19	0,03-0,25	0,091	0,125	0,125	0,06-0,125	0,095	0,125	0,125
<i>Sporothrix schenckii</i>	22	0,06-1	1	0,5	0,5	2-16	9,364	8	16
<i>Scedosporium apiospermium</i>	7	0,5->16	3,482	1	>16	0,125-0,5	0,185	0,125	0,5
<i>Scedosporium prolificans</i>	9	0,5->16	16	>16	>16	0,5-16	7,336	8	8
<i>Rhizopus stolonifer</i>	5	0,5->16	2,639	1	16	2->16	6,964	8	16

MG: media geométrica

**Tabla 2.** Rango, media geométrica, concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) 50% y 90% para itraconazol y voriconazol contra *Candida* y *Cryptococcus neoformans*.

Especies	N	Itraconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )				Voriconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		Rango	MG	$\text{CMI}_{50}$	$\text{CMI}_{90}$	Rango	MG	$\text{CMI}_{50}$	$\text{CMI}_{90}$
<i>Candida albicans</i>	25 <sup>a</sup>	0,06-2	0,254	0,25	1	0,03-8	0,127	0,06	1
	17 <sup>b</sup>	0,06-1	0,164	0,125	0,5	0,03-1	0,044	0,03	0,5
	8 <sup>c</sup>	0,125-2	0,648	0,5	2	0,03-8	0,863	0,5	8
<i>Candida glabrata</i>	15	0,125-16	0,628	1	2	0,03-8	0,365	0,5	2
<i>Candida krusei</i>	10	0,03-1	0,352	0,5	0,5	0,03-1	0,173	0,25	0,5
<i>Candida tropicalis</i>	6	0,06-0,5	0,197	0,125	0,5	0,03-0,25	0,03	0,03	0,25
<i>Candida parapsilosis</i>	5	0,06-0,125	0,06	0,06	0,125	0,03-0,5	0,03	0,03	0,5
<i>Candida pelliculosa</i>	5	0,25-0,5	0,435	0,5	0,5	0,125-0,25	0,217	0,25	0,25
<i>Candida lipolytica</i>	5	0,25-0,5	0,287	0,25	0,5	0,03-0,06	0,034	0,03	0,06
<i>Candida guilliermondii</i>	5	0,125-0,25	0,143	0,125	0,25	0,03-0,06	0,03	0,03	0,06
<i>Candida lusitanae</i>	4	0,125-0,25	0,148	0,125	0,25	0,03-0,06	0,035	0,03	0,06
<i>Cryptococcus neoformans</i>	20	0,03-0,5	0,075	0,06	0,25	0,03-16	12,699	0,06	8

MG: media geométrica

a: total de aislamientos

b: aislamientos  $< 64 \mu\text{g/ml}$  al fluconazol

c: aislamientos  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$  al fluconazol

Un aislamiento de *S. prolificans* fue sensible a ambos azoles. Cuatro aislamientos de *S. apiospermium* se inhibieron con  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$  de ITZ, mientras que la CMI de VCZ fue  $\leq 0,5$  ( $p = 0,018$ ).

En tres aislamientos de *Rhizopus stolonifer* las CMI de ITZ fueron  $\leq 1$  y elevadas las de VCZ, no mostrando diferencias significativas entre ambos antifúngicos.

La sensibilidad *in vitro* de *Candida* spp al ITZ y VCZ fue variable según la especie considerada. Las especies con medias geométricas más bajas de ITZ fueron *Candida parapsilosis* (0,06  $\mu\text{g/ml}$ ), *C. guilliermondii* (0,143  $\mu\text{g/ml}$ ), *C. lusitaniae* (0,148  $\mu\text{g/ml}$ ) y *C. tropicalis* (0,197  $\mu\text{g/ml}$ ) que también presentaron valores menores para el VCZ (0,03, 0,03, 0,035, y 0,03  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente). En general el ITZ ha presentado valores de CMI paralelos a los obtenidos con VCZ para las especies de *Candida* estudiadas.

La CMI<sub>90</sub> para *C. glabrata* fue la que mostró mayores valores para ambos antifúngicos (2  $\mu\text{g/ml}$ ), si bien la media geométrica resultó menor para VCZ.

En el caso de *C. neoformans* no hubo diferencias significativas entre ambos triazoles, aunque tres aislamientos resistentes a FCZ también lo fueron a VCZ, mientras que resultaron altamente sensibles a ITZ.

## Discusión

Aparte de la anfotericina B, los triazoles ITZ y VCZ son los antifúngicos con más amplio espectro de actividad sobre hongos levaduriformes y miceliales. Hasta hace poco tiempo, ITZ solamente estaba disponible para administración oral, hecho que limitaba considerablemente su administración en pacientes con micosis sistémicas graves. La introducción de una forma intravenosa ha significado un avance importante.

FCZ sigue siendo el antifúngico de mayor uso en el tratamiento de micosis producidas por levaduras. La existencia de aislamientos resistentes [20] obliga a plantearse el empleo de otros fármacos.

De los 80 aislamientos del género *Candida* incluidos en este estudio, 18 (22,5%) habían resultado resistentes a FCZ en un estudio anterior [14]. Cuatro de los ocho aislamientos de *C. albicans* resistentes a FCZ mostraron una CMI  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  para ITZ.

En el presente estudio destaca la alta sensibilidad de las cepas del hongo dimórfico *S. schenckii* a ITZ. Ghosh et al. [9] comunicaron que el 56% de las cepas de este hongo eran sensibles a ITZ. También se ha publicado que *S. schenckii* es mucho más sensible a ITZ que a VCZ [11].

*A. fumigatus* presenta alta sensibilidad a ITZ y VCZ [10,12,13]. En 24 aislamientos de esta especie, cuya sensibilidad se estudió mediante otras técnicas [12], se describió una media geométrica de ITZ de 0,06  $\mu\text{g/ml}$  y una CIM<sub>90</sub> de 0,12  $\mu\text{g/ml}$ , resultados parecidos a los del presente estudio. Otros autores han publicado resultados similares [6-8,21,22]. Pfaller et al. [18] obtuvieron una CMI de ITZ de 1  $\mu\text{g/ml}$  en 12 aislamientos de *S. prolificans*, especie que se considera altamente resistente a los antifúngicos, con un aislamiento sensible al ITZ. Berenguer et al. [1] han estudiado nueve aislamientos de *S. prolificans* que resultaron resistentes a anfotericina B, 5 fluorocitosina, miconazol, FCZ e ITZ con una CIM<sub>90</sub>  $>16$   $\mu\text{g/ml}$ . Cuenca-Estrella et al. [3] estudiaron la sensibilidad de 43 cepas de *S. prolificans* a siete antifúngicos y observaron una actividad *in vitro* muy baja.

*S. apiospermium* presenta un comportamiento muy diferente. De los siete aislamientos estudiados, cuatro fueron sensibles a ITZ. Zeng et al. [25] hallaron un rango de CMI de 1 a 2  $\mu\text{g/ml}$  y una CMI<sub>90</sub> de 1  $\mu\text{g/ml}$  para ITZ. Como en este estudio, la sensibilidad hallada por ese autor ha resultado mucho mayor para VCZ (rango de CMI de  $\leq 0,03$ -0,5  $\mu\text{g/ml}$  y CIM<sub>50</sub> de 0,06  $\mu\text{g/ml}$  y CIM<sub>90</sub> de 0,125  $\mu\text{g/ml}$ ). Espinel Ingroff [7] ha obtenido resultados semejantes para ITZ.

Las CMI de ITZ para *R. stolonifer* resultaron menores que las de VCZ aunque sin significación estadística. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores [4] que obtuvieron rangos de 0,25-32  $\mu\text{g/ml}$ , CIM<sub>50</sub> de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y CMI<sub>90</sub> de 4  $\mu\text{g/ml}$  con 15 aislamientos de esta especie, mientras que para VCZ estos valores fueron muy superiores (4-64, 8 y 16, respectivamente). Pfaller et al. [19] halló unos rangos superiores a los de este estudio para ambos antifúngicos (CMI  $> 4$   $\mu\text{g/ml}$ ) en cuatro aislamientos.

En general, en *Candida* el ITZ ha presentado valores de actividad paralelos a los obtenidos para VCZ. Las medias geométricas más bajas para el ITZ se observaron en *C. parapsilosis* (0,06  $\mu\text{g/ml}$ ), *C. guilliermondii* (0,143  $\mu\text{g/ml}$ ), *C. lusitaniae* (0,148  $\mu\text{g/ml}$ ) y *C. tropicalis* (0,197  $\mu\text{g/ml}$ ), que también fueron las especies que presentaron mayor sensibilidad a VCZ (0,03  $\mu\text{g/ml}$ ).

*C. glabrata* ha sido la única especie que ha mostrado una CMI<sub>50</sub> de ITZ de 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Swinne et al. [21,22] describieron un 17% de resistencias a ITZ de esta especie. Drago et al. [5] estudiaron, empleando Sensititre, 309 aislamientos de *C. glabrata* y 63 de *C. krusei* y encontraron una elevada sensibilidad a VCZ para ambas especies con una CIM<sub>90</sub> de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . En 351 aislamientos de *Candida* sp. estudiados siguiendo el método europeo (EUCAST) [3], el 12% presentaron una baja sensibilidad a ITZ (CIMs  $\geq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Agradecemos a Sergi Mojal (Assessorament Metodològic en investigació Biomèdica, IMIM, Barcelona) por el asesoramiento estadístico y al Dr. Jorge Puig de la Bellacasa del Hospital Clínic de Barcelona y a los doctores Edgar Neyra y Beatriz Bustamante del Instituto de Medicina Tropical Von Humbolt, Lima, Perú, las cepas cedidas.



## Bibliografía

1. Berenguer J, Rodríguez Tudela JL, Richard C, Alvarez M, Sanz MA, Gaztelurrutia L, Ayats J, Martínez Suarez JV. Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*: a report on 16 cases in Spain and a review of the literature. *Medicine* 1997; 76: 256-265.
2. Caillot D, Bassaris H, McGeer A, Arthur C, Prentice HG, Seifert W, De Beule K. Intravenous itraconazole followed by oral itraconazole in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies, chronic granulomatous disease, or AIDS. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 83-90.
3. Cuenca-Estrella M, Rodríguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sánchez F, Ayats J, Jiménez M, Salvado M, Warnock DW, Pahissa A, Rodríguez JL. In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* sp to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 194-199.
4. Dannaoui E, Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Verweij PE, Eurofung network. In vitro susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 45-52.
5. Drago M, Scaltrito MM, Morace G, GISIA-2 Group. In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 619-624.
6. Drago M, Scaltrito MM, Cariani L, Morace G. In vitro testing of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates for susceptibility to voriconazole, amphotericin B and itraconazole comparison of Sensititre versus NCCLS M38-A using two different inocula. *J Chemother* 2004; 16: 474-478.
7. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1360-1367.
8. Garcia-Martos P, Garcia-Agudo L, Gutierrez-Calzada J. Actividad in vitro de anfotericina B, itraconazol y voriconazol frente a 20 especies de *Aspergillus* empleando el método de microdilución Sensititre. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2005; 23: 15-18.
9. Ghosh A, Chakrabarti A, Hemashettar BM, Maiti PK. In vitro susceptibility pattern of *Sporothrix schenckii* strains isolated from three centers in India. *Indian J Med Res* 2001; 113: 214-220.
10. Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 741-745.
11. Mc Ginnis MR, Nordoff N, Li RK, Passarell L, Warnock DW. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med Mycol* 2001; 39: 369-371.
12. Martin-Mazuelos E, Peman J, Valverde A, Chaves M, Serrano MC, Canton E. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel and Etest with the NCCLS M38-A method to determine the activity of amphotericin B and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 365-370.
13. Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Verweij PE. Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric method with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2876-2885.
14. Morera Y, Torres-Rodríguez JM, Jiménez T. Antifungal susceptibilities of 113 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Candida* sp to the new antifungal Albaconazole (UR9825) respect to voriconazole and fluconazole. *Trends in Medical Mycology. Intern Proceedings*. Amsterdam, Monduzzi Ed., 2003:143-147.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: Approved standard M27-A2. 2<sup>nd</sup> Ed. Wayne, PA, NCCLS, 2002.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi: Approved standard M38-A. Wayne, PA, NCCLS, 2002.
17. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones NR. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 78-83.
18. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3359-3361.
19. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp and other filamentous fungi: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1032-1037.
20. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1-8.
21. Swinne D, Watelle M, Van der Flaes M, Nolard N. In vitro activities of voriconazole (UK-109,496), fluconazole, itraconazole and amphotericin B against 132 non *albicans* bloodstream yeast isolates (CANARI study). *Mycoses* 2004; 47: 177-183.
22. Swinne D, Watelle M, Nolard N. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non-*Candida albicans* yeast isolates. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 24-28.
23. Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F, Kuwahara S. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463 against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 57-62.
24. Vandewoude K, Vogelaers D, Decruyenaere J, Jaqmin P, De Beule K, Van Peer A, Woestenberg G, Groen K, Lolardyn F. Concentrations in plasma and safety of 7 days of intravenous itraconazole followed by 2 weeks of oral itraconazole solution in patients in intensive care units. *Antimicrobial Agents Chemother* 1997; 41: 2714-2718.
25. Zeng J, Kamei K, Zheng Y, Nishimura K. Susceptibility of *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermium* to new antifungal agents. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2004; 45: 101-104.