



Resistencia *in vitro* al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans*

Alfonso-Javier Carrillo Muñoz¹, Cristina Tur¹, Dolors Estivill¹, Lourdes Montsant¹, Anna Carceller¹, Juan-Manuel Hernández-Molina², Josep M. Torres-Rodríguez¹

¹Laboratori de Microbiologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona y ²Laboratorio de Microbiología, Hospital de La Inmaculada, Huerca-Overa, Almería, España

Resumen

Se ha realizado un estudio de sensibilidad *in vitro* a la anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y tioconazol, en el que se han incluido 181 cepas pertenecientes a seis especies del género *Candida* y 21 de *Cryptococcus neoformans* con el fin de conocer los niveles de resistencia a los nuevos derivados antifúngicos. Se ensayaron aislamientos clínicos procedentes de 200 pacientes del Hospital del Mar (Barcelona) y del Hospital La Inmaculada (Almería) que fueron evaluados mediante una técnica de difusión en agar (NeoSensitabs©, Rosco, Taastrup, Dinamarca), que utiliza tabletas estandarizadas disponibles comercialmente. Destacó la elevada tasa de sensibilidad a la anfotericina B y el porcentaje de resistencia obtenido para la 5-fluorocitosina (19%), especialmente entre las cepas de *C. neoformans* que además fueron sensibles a los derivados azólicos, así como las de *Candida guilliermondii*. Destacaron los altos porcentajes de sensibilidad obtenidos para los mismos antifúngicos en *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*. Los mayores índices de resistencia para el itraconazol, fluconazol y ketoconazol se encontraron entre las cepas de *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata*. Diez de las cepas resistentes resultaron ser sensibles al itraconazol mientras que otras dos resistentes a éste, fueron sensibles para el fluconazol. Estos resultados permiten considerar que la resistencia cruzada entre ambos triazoles no es general.

Palabras clave

Sensibilidad *in vitro*, Antifúngicos, Fluconazol, Itraconazol, Tioconazol, Ketoconazol, Triazoles, Resistencia cruzada

In vitro resistance to fluconazole and itraconazole in clinical isolates of *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*

Summary

An *in vitro* susceptibility testing of 181 strains of six species of *Candida* and 21 strains of *Cryptococcus neoformans* was carried out in order to investigate the resistance to new antifungal drugs. We have studied clinical isolates from 200 different patients of Hospital del Mar (Barcelona) and Hospital La Inmaculada (Almería). An agar diffusion method (NeoSensitabs©, Rosco, Taastrup, Denmark), was employed with fluconazole, itraconazole, and reference drugs amphotericin B, flucytosine, tioconazole and ketoconazole. A high level of susceptibility was found for amphotericin B in *C. neoformans* strains while 19% of them were resistant to flucytosine. All the strains of *C. neoformans* and *Candida guilliermondii* were susceptible to the new azoles derivatives and also *Candida parapsilosis* and *Candida albicans* had a great susceptibility to this antifungals. A greater level of resistance was found for *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* to fluconazole, itraconazole and ketoconazole, but resistance to fluconazole and itraconazole is not always linked because ten resistant strains for fluconazole were susceptible to itraconazole, and two other resistant to itraconazole were susceptible to fluconazole.

Key words

In vitro susceptibility, Antifungals, Fluconazole, Itraconazole, Tioconazole, Ketoconazole, Triazoles, Cross resistance

Dirección para correspondencia:

Dr. Alfonso-Javier Carrillo Muñoz
C/ Valle de Ordesa nº4, 4ª4ª, E-08031 Barcelona,
España.
Fax: (+34 3) 429 7120
E-mail: ajcm.acia@bcn.servicom.es

Aceptado para publicación el 11 de julio de 1996

A consecuencia del aumento de las micosis oportunistas, mayoritariamente en pacientes hospitalizados y en enfermos de sida acompañado de una elevada morbimortalidad [1,2] y aunque de forma no tan espectacular como en el caso de los antibacterianos, se ha producido un gran desarrollo en el campo de la terapia antifúngica. Así, durante la última década se han introducido, nuevos agentes antimicóticos tanto de uso tópico como sistémico [3,4].

El estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos ofrece la posibilidad de obtener datos relativamente fiables a la hora de seleccionar el fármaco más adecuado para el tratamiento de las infecciones fúngicas [5]. Mediante ello se consigue una valoración cuantitativa de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) características de un aislamiento clínico frente a un antifúngico y de forma cualitativa su resistencia o sensibilidad a esta sustancia. La utilidad de estos valores radica en la predicción de la respuesta clínica y la explicación de los fallos terapéuticos [6-11].

Crefimos necesario conocer los niveles de resistencia y sensibilidad de las levaduras de interés clínico, a los nuevos derivados triazólicos de cara a su uso terapéutico hospitalario y a la vista de la polémica desatada sobre la existencia de fenómenos de resistencia cruzada entre diversos antifúngicos azólicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Realizamos un estudio para conocer la sensibilidad *in vitro* de 181 cepas pertenecientes a seis especies del género *Candida* y 21 cepas de la especie *Cryptococcus neoformans*, aisladas de 200 pacientes, por medio de una técnica de difusión en agar que permitiera situar los niveles de resistencia al fluconazol e itraconazol en nuestro entorno.

Antifúngicos. Además del fluconazol e itraconazol se incluyeron anfotericina B, 5-fluorocitosina, tioconazol y ketoconazol como sustancias de referencia. Los antifúngicos fueron suministrados por Rosco (Taastrup, Dinamarca), en forma de tabletas estandarizadas de 9 mm de diámetro (NeoSensitabs®), con carga de antifúngico difusible de 1 µg para la 5-fluorocitosina, de 10 µg para la anfotericina B, itraconazol y tioconazol y de 15 µg para el fluconazol y el ketoconazol.

Cepas. Las cepas fueron aisladas de pacientes diferentes del Hospital del Mar (Barcelona, España) y el Hospital de La Inmaculada de Huércal-Overa (Almería, España). Se emplearon un total de 81 cepas de *Candida albicans*, 3 de *Candida guilliermondii*, 10 de *Candida krusei*, 13 de *Candida parapsilosis*, 36 de *Candida tropicalis*, 38 de *Candida glabrata*, todas ellas aisladas de orina y 21 de *C. neoformans* procedentes de líquidos cefalorraquídeos. La identificación se realizó por medio de métodos morfológicos y bioquímicos estandarizados (API ATB ID 32C, bioMérieux, Francia) [12].

Estudio de la sensibilidad *in vitro*. Se empleó una técnica de difusión en agar que utiliza el medio modificado de Shadomy (base de nitrogenada de levadura, glucosa y asparagina a pH 7) [13]. Los inóculos, preparados en solución salina estéril, se obtuvieron a partir de cultivos de 24 h en agar de Sabouraud cloranfenicol. Estos contenían 5×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml equivalente al grado 0,5 de la escala McFarland, que fue diluida posteriormente en una proporción de 1:1 en solución salina estéril. En el caso de las cepas de *C. krusei*, esa

dilución fue hecha en la relación de 1:10. La incubación se realizó a 35 °C durante 20 a 24 h a excepción de las cepas de *C. neoformans*, que se hizo a 30 °C. La lectura de los halos de inhibición permitió la clasificación de las cepas en sensibles, resistentes o de sensibilidad moderada, siempre de acuerdo a criterios de sensibilidad *in vitro* (Tabla 1). Se utilizó también un criterio mucho más restrictivo, consistente en una reducción de los límites de sensibilidad aplicable para algunos antifúngicos, cuando se trata de aislamientos de micosis sistémicas severas [14].

Tabla 1. Criterios de lectura e interpretación de los halos de inhibición (en mm) de la técnica de difusión en agar para la determinación de la sensibilidad a antifúngicos.

Antifúngico	Sensible	Sensibilidad moderada	Resistente
Anfotericina B	≥ 15 ¹ ≥ 15	10-14 10-14	sin halo ≤ 9
5-fluorocitosina	≥ 20 ¹ ≥ 20	12-19 12-19	≤ 11 ≤ 11
Fluconazol	≥ 20 ¹ ≥ 30	12-19 23-29	≤ 11 ≤ 22
Itraconazol	≥ 15 ¹ ≥ 20	10-14 12-19	sin halo ≤ 11
Tioconazol	≥ 20	12-19	≤ 11
Ketoconazol	≥ 20 ¹ ≥ 30	12-19 23-29	≤ 11 ≤ 22

¹ Criterio restrictivo aplicable para levaduras aisladas de micosis sistémicas severas.

Estadística. Los valores obtenidos se procesaron con paquete estadístico SPSS PC® versión 5.0 (SPSS, USA) para IBM®. El grado de concordancia o grado de acuerdo entre la sensibilidad a los distintos antifúngicos se comprobó mediante el índice de Kappa, mientras que se aplicó el estadístico de modelo de efectos fijos (de hipótesis lineales) para contemplar los niveles aparecidos dentro de un mismo antifúngico. En ambos tests se tomó un valor de $p < 0,01$.

RESULTADOS

Destacaba el elevado porcentaje de cepas sensibles y la ausencia de resistencias obtenidas para la anfotericina B entre las cepas de *Candida* y *Cryptococcus*. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la sensibilidad de las seis especies de *Candida* para este antifúngico (Student-Newman-Keuls). Para la 5-fluorocitosina y los derivados azólicos las tasas de sensibilidad y resistencia obtenidas fueron variables dependiendo de la especie y el antifúngico estudiado (Tabla 2). Todas las cepas de *C. neoformans* y *C. guilliermondii* fueron sensibles a los derivados azólicos, destacando los elevados valores de sensibilidad obtenidos en *C. parapsilosis* y *C. albicans* a estos mismas sustancias. Los niveles de sensibilidad *in vitro* superiores correspondieron al itraconazol (89,1%), seguidos de tioconazol (84,3%), fluconazol (69,7%) y ketoconazol (69%). En cuanto a las tasas de resistencia, obtuvimos un alto porcentaje para la 5-fluorocitosina (19%), sobre todo entre *C. neoformans* (47,6% de resistencia) y *C. tropicalis* (38,9% de resistencia). Los nuevos derivados triazólicos, fluconazol e itraconazol, presentaron valores de resistencia similares entre sí (cerca al 9% y 8%, respectivamente) superiores a los del tioconazol e inferiores a los de ketoconazol. A pesar de esta similitud de los datos de resistencia al fluconazol e itraconazol, dos cepas de *C. parapsilosis* que fueron resis-

Tabla 2. Resultados de sensibilidad obtenidos en 202 cepas de *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans* por medio de una técnica de difusión en agar.

Especie		Anfotericina B	5-fluorocitosina	Fluconazol	Itraconazol	Tioconazol	Ketoconazol
<i>C. albicans</i> (n=81)	S	55	77	77	81	76	76
	I	26	2	4	0	3	4
	R	0	2	0	0	2	1
<i>C. guilliermondii</i> (n=3)	S	2	3	3	3	3	3
	I	1	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i> (n=10)	S	3	7	0	7	3	0
	I	7	0	5	1	7	4
	R	0	3	5	2	0	6
<i>C. parapsilosis</i> (n=13)	S	3	9	10	10	11	9
	I	10	2	3	1	2	4
	R	0	2	0	2	0	0
<i>C. tropicalis</i> (n=36)	S	7	17	22	28	27	20
	I	29	5	10	2	5	4
	R	0	14	4	6	6	12
<i>C. glabrata</i> (n=38)	S	9	18	8	30	29	8
	I	29	13	21	2	5	17
	R	0	7	9	6	4	13
<i>C. neoformans</i> (n=21)	S	19	9	21	21	21	21
	I	2	2	0	0	0	0
	R	0	10	0	0	0	0

S: cepas sensibles; I: cepas con sensibilidad moderada; R: Cepas resistentes.

tentes al itraconazol no lo eran al fluconazol mientras que diez cepas resistentes al fluconazol no lo eran al itraconazol entre ellas cuatro de *C. albicans*. La totalidad de cepas de *C. krusei* tuvieron una sensibilidad intermedia o moderada al fluconazol, siendo ésta la especie que mostró un mayor porcentaje de resistencia para todos los antifúngicos azólicos, a excepción del tioconazol. El resto de cepas resistentes al fluconazol correspondieron a *C. glabrata* (23,7%) y a *C. tropicalis* (11,1%). Para el itraconazol, esos tres géneros resultaron ser también los más resistentes aunque *C. krusei* ofreció una mayor sensibilidad al itraconazol que al fluconazol. De forma comparativa el fluconazol fue el antifúngico al que fueron resistentes un menor número de cepas de *C. tropicalis* entre los derivados azólicos.

DISCUSIÓN

A pesar de que ciertas variables pueden influir sobre la actividad *in vitro* de un antifúngico [15,16], las técnicas de estudio de la sensibilidad *in vitro* tienen un elevado interés [6], haciéndose en este sentido continuos intentos de normalización y estandarización que han fructificado en diversas conclusiones [15-23].

En estudios previos ya se había descrito la utilidad de las técnicas de difusión en agar [18,24,25], para la evaluación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. La relación existente entre los resultados obtenidos por medio de estas técnicas y las de microdilución en medios líquidos ya fue citada por Drouhet y cols [26].

Se ha demostrado la influencia de factores geográficos sobre las tasas de resistencia publicadas para la anfotericina B y la 5-fluorocitosina, al ponerse de manifiesto las diferencias entre los aislamientos de distintos países [27]. Así mismo la existencia de cepas resistentes a la anfotericina B se ha relacionado con un tratamiento previo con derivados azólicos, que caracterizados por afectar a la membrana celular (reducción de la síntesis de ergosterol) pueden provocar la selección de mutantes [28]. Igualmente, este hecho es asociado con tratamientos anti-neoplásicos que mediante la selección de cepas resistentes, podrían evitar el daño causado por procesos oxidativos inducidos por este antifúngico [28]. Algunos

autores apuntan la relación existente entre los mecanismos de resistencia y los factores dependientes del antifúngico y del hongo, entre los que incluyen la posibilidad de inactivar las sustancias, la ausencia, protección o modificación de los puntos de acción que son conocidos como dianas [28,29]. La aparición del fenómeno de resistencia a los antifúngicos, como la anfotericina B, a juicio de algunos investigadores, no parece representar un problema clínico importante [30] por cuanto no se trata de células viables que además suelen ofrecer otro tipo de dianas que podrían ser utilizables para el uso de antifúngicos alternativos [31,32].

No detectamos cepas resistentes para la anfotericina B, aunque algunas de ellas (51%) tuvieron una sensibilidad intermedia por medio de esta técnica de difusión en agar. Coincidimos así con los datos publicados por Arévalo y cols quienes utilizaron un micrométodo de dilución en medio líquido [33]. Confirmamos también los datos obtenidos en nuestro laboratorio, con el mismo método y de cepas de origen clínico aisladas en un periodo anterior [18,24], no habiéndose observado variación. En cuanto a los valores de resistencia para la 5-fluorocitosina (19%), si son superiores a los citados en una revisión de Scholer y Polak [27] y que publicados por otros investigadores procedían de estudios hechos con cepas aisladas en Europa hace más de 20 años.

Para los antifúngicos azólicos la influencia que ejercen variables como el medio de cultivo, el pH, el tamaño de inóculo o los criterios de lectura [15], provoca la aparición de una amplia gama de porcentajes de resistencia en la bibliografía en función tanto del método empleado como del laboratorio que lo practica. No observamos cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol, mientras que los porcentajes de sensibilidad y resistencia obtenidos para esta sustancia coincidieron con los publicados por Sandven y cols [14]. En esta referencia y utilizando la misma técnica con 212 aislamientos de *C. albicans* se describe un 95% de cepas sensibles. Por el contrario resultaron ser notablemente inferiores a los citados por Müller [34] que emplearon también una técnica análoga de difusión en agar.

Obtuvimos diez cepas resistentes al fluconazol que eran sensibles a itraconazol y solo dos que siendo sensi-

bles al fluconazol eran resistentes al itraconazol. Debe añadirse que el estudio estadístico reveló la existencia de una concordancia deficiente entre la sensibilidad a los dos triazoles ($Kappa = 0,30$). En el trabajo publicado por Arévalo y cols [33] el número de cepas de *C. albicans* resistentes a estos dos antifúngicos triazólicos tampoco coincide entre sí, a pesar de obtenerse también valores similares a los nuestros. En la bibliografía, la mayor parte de las resistencias al fluconazol se atribuyen a *C. krusei* y *C. glabrata* especies que se también son citadas por su reducida sensibilidad [35]. No obstante se describen cepas de *C. albicans* resistentes a este antifúngico [14]. En la existencia de cepas con una reducida sensibilidad al fluconazol y sensibles al itraconazol así como la ausencia de resistencia cruzada entre ambas sustancias, podría a estar involucrada la facilidad con la que el itraconazol es capaz de penetrar en el citoplasma a través de la membrana plasmática [36].

Debe señalarse que cuando se aplicó un criterio de interpretación de los halos de inhibición mucho más selectivo (Tabla 1), basado en la necesidad de detectar aislamientos de infecciones sistémicas con una reducida sensibilidad, los porcentajes de resistencia crecieron en el caso del fluconazol. Para este antifúngico se produjo un incremento del 9% al 39,8% mientras que para el itraconazol no se observaron cambios, variando solo el porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia o moderada con un incremento del 3% al 20,9%. Al aplicar ese criterio con las cepas sensibles, la concordancia entre la sensibilidad a las dos sustancias resultó ser más deficiente, existiendo 24 cepas sensibles a itraconazol que eran resistentes a fluconazol, mientras que solo a una cepa le sucedió lo contrario. Este hecho se produjo en *C. albicans* (0% de resistencia y 12,3% al aplicar tamaños de diámetro inferiores) coincidiendo con los datos publicados por Sandven y cols [14], para quienes esta levadura desarrolla una resistencia emergente en pacientes que reciben tratamientos prolongados con fluconazol. Ello podría explicar la existencia de cierto número de cepas que resultan problemáticas durante el tratamiento. La aplicación de este criterio supone un acercamiento a los criterios de sensibilidad y resistencia dominantes en las técnicas de microdilución

en medio líquido, considerándose que las cepas con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ son resistentes a la anfotericina B, CMI ≥ 12 $\mu\text{g/ml}$ lo son al fluconazol, CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ para la 5-fluorocitosina, CMI $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ al itraconazol y CMI ≥ 2 al ketoconazol.

En relación al ketoconazol se demostró la existencia de una sensibilidad (69%) de las cepas estudiadas, inferior a la de los otros cuatro derivados azólicos. Para el tioconazol, antifúngico de tipo imidazólico que no se emplea por vía sistémica y que se incluyó en el estudio por su significativa actividad *in vitro*, observamos la menor tasa de resistencia. La concordancia mejor, obtenida entre la sensibilidad a los derivados azólicos fue la existente entre fluconazol y ketoconazol con un índice Kappa de 0,71 entre los que además obtuvieron porcentajes de cepas sensibles similares. Tanto para ketoconazol como para el tioconazol, entre otros imidazoles, se citan reducidas tasas de resistencia, con la excepción de cepas aisladas tras tratamientos prolongados con azoles o en casos de pacientes afectados de sida [37].

A la vista de estos resultados puede apuntarse la dificultad de afirmar, con certeza, la existencia absoluta de un fenómeno de resistencia cruzada entre los antifúngicos azólicos, fundamentado en la presencia de mecanismos de acción similares entre todos ellos. Además es necesario a la vista de los fenómenos emergentes de resistencia ya detectados [14,29,36], continuar la práctica del estudio de la sensibilidad *in vitro* no sólo a los nuevos derivados triazólicos, sino a cualquier nuevo agente antifúngico una vez sea introducido en la terapia.

Trabajo financiado con una beca de investigación (FIS) del Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social (Proyecto 92/0302).

Bibliografía

- Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:287-291.
- Pontón J, Quindós G. Las micosis en la década de 1990. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1992;10:385-388.
- San Blas G. Antibióticos antifúngicos: hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. *Rev Iberoam Micol* 1991;8:24-34.
- Torres-Rodríguez JM. Estado actual de los antifúngicos de uso sistémico. *Rev Esp Quimioter* 1992;5:162-169.
- Shadomy S, Espinel-Ingroff A, Cartwright RY. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. En: Lennette E, Balows J, Hausler W, Shadomy HJ (Eds). *Manual of Clinical Microbiology* (4ª Ed). Washington DC, American Society for Microbiology, 1985:991-999.
- Kobayashi GS, Spitzer DE. Testing of organisms for susceptibility to triazoles. Is it justified? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 8:387-389.
- Troke PF, Andrews RJ, Pye GW, Richardson K. Fluconazole and other azoles: translation of *in vitro* activity to *in vivo* and clinical efficacy. *Rev Infect Dis* 1990;12 (Suppl 3): S276-280.
- Stiller RL, Bennett JE, Scholler HJ, Wall M, Polak A, Stevens DA. Correlation of *in vitro* susceptibility tests with the *in vivo* response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. *J Infect Dis* 1983;147:1070-1077
- Shadomy S, Pfaller MA. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and quantitation in body fluids. En Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*, (5ª ed) Washington DC, American Society for Microbiology, 1991:1173-1183.
- Quindós G. Terapéutica anticandidiásica. *Gac Med (Bilbao)* 1992;89:186-188.
- Rubio Calvo MC, Gil Tomás J, Benito Ruesca R. Las pruebas *in vitro* en la evaluación de los agentes antifúngicos. *Rev Esp Quimioter* 1993;6:21.
- Hernández-Molina JM, Coque MT, Campos E, Rando C, Leiva EF. Estudio de un método automatizado de identificación de levaduras ATB32C. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1992;10:293-295.
- Casals JB. Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. *J Clin Pathol* 1979;32:719-722.
- Sandven P, Bjorneklett A, Maeland A, and the Norwegian Yeast Study Group. Susceptibilities of Norwegian *Candida albicans* strains to fluconazole: emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:2443-2448.
- LaRocco M. Recent developments in antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Newsletter* 1991;13:81-85.
- Carrillo-Muñoz AJ, Abarca-Salat L, Quindós G. Pruebas de estudio de sensibilidad a los antifúngicos. I. Factores que influyen en su realización en el laboratorio. *Rev Iberoam Micol* 1994;11:77-80.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antifungal susceptibility testing; Committee report. NCCLS document M-20-CR. NCCLS 771 E. Lancaster Ave, Villanova, Pennsylvania, 1985.
- Sabaté M, Torres-Rodríguez JM, Gallach C, Madreny N, Carrillo-Muñoz AJ. Valor de la difusión en agar frente a la concentración mínima inhibitoria en el estudio de la sensibilidad a tres antifúngicos en *Candida* sp y *Torulopsis glabrata*. *Rev Esp Microbiol Clin* 1991;6:229-232.
- Quindós G, Salesa R, Carrillo-Muñoz AJ, et al. Multicenter evaluation of ATB-fungus: A standardized micromethod for yeast susceptibility testing. *Chemother* 1994;40:245-251.
- Pontón J, Torres-Rodríguez JM, Salesa R, et al. Evaluación del Candifast, un nuevo método para la identificación y estudio de la sensibilidad antifúngica de las levaduras de

- interés médico. Rev Iberoam Micol 1994; 11:64-67.
21. Carrillo-Muñoz AJ. Evaluación multicéntrica de la reproductibilidad del antifungigrama NeoSensitabs sensitivity testing. Rev Iberoam Micol 1994;11:56.
22. Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, *et al.* Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:314-319.
23. Odds FC, Vrancks L, Woestenborghs F. Antifungal susceptibility testing of yeasts: evaluation of technical variables for test automation. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2051-2060.
24. Torres-Rodríguez JM, Sabat, M, Gallach C, Carrillo-Muñoz AJ, Madrenys N. Sensibilidad *in vitro* a la 5-fluorocitosina y anfotericina B de levaduras del género *Candida* aisladas en Barcelona. Enferm Infect Microbiol Clin 1990;8:91-93.
25. Espinel-Ingroff A, Shadomy S, White S. Agar diffusion susceptibility tests with cilo-fungin (LY-121019). J Med Vet Mycol 1991;29:93-98.
26. Drouhet E, Dupont B, Improvisi L, Viviani MA, Tortorano AM. Disc agar diffusion and microplate automated technics for *in vitro* evaluation of antifungal agents on yeasts and sporulated pathogenic fungi. En: Iwata K, y Vanden Bossche H (Eds). *In vitro and in vivo* evaluation of antifungal agents. Amsterdam, Elsevier, 1986:31-48.
27. Scholer HJ, Polak AM. Resistance to systemic antifungal agents. Antimicrobial drug resistance 1984;23:393-460.
28. Kerridge D, Vanden Bossche H. Drug discovery: a biochemist approach. En Ryley JF (Ed), Handbook of experimental Pharmacology, vol 96. Chemotherapy of fungal diseases. Berlin, Springer Verlag, 1990:31-76.
29. Currie B, Sandi H, Ibrahim A, Edwards JE, Casadevall A, Gahnoum MA. Sterol composition and susceptibility to amphotericin B of environmental *Cryptococcus neoformans* are changed by murine passage. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1934-1937.
30. Odds FC. Antifungal agents and their use in *Candida* infections. En: Odds FC. *Candida* and Candidosis. A review and bibliography. London, Bailliere Tindall, 1988.
31. Kerridge D, Nicholas RD. Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*. J Antimicrob Chemother 1986;18:39-49.
32. Sugar AM. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs. What are we doing? Antimicrob Agents Chemother 1995;39: 1907-1912.
33. Arévalo P, Arias A, Andreu A, Sierra A. Sensibilidad de 278 aislados de *Candida albicans* frente a anfotericina B, fluconazol e itraconazol. Rev Iberoam Micol 1992;9:94-96
34. Muller J. Resistenzphänomene bei systemisch wirksamen antimykotika und das problem der empfindlichkeitsprüfung. Mycoses 1992;35 (suppl):1-7.
35. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1-8.
36. Polak A. Mode of action studies. En: Ryley JF (Ed). Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases. Berlin, Springer Verlag, 1990:153-182.
37. Johnson EM, Richardson MD, Warnock DW. *In vitro* resistance to imidazole antifungals in *Candida albicans*. J Antimicrob Chemoter 1984;13:547-558.

