

Original

¿Es activa la amfotericina B frente a hongos dermatófitos y *Scopulariopsis brevicaulis*?

A.J. Carrillo-Muñoz¹, P. Santos², O. del Valle³, J.B. Casals⁴ y G. Quindós⁵

¹Dpto. de Microbiología, ACIA, Barcelona (España); ²Hospital de Pediatría J.G. Garrahan, Buenos Aires (Argentina);

³Servicio de Microbiología, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona (España); ⁴Rosco Diagnostica, Taastrup (Dinamarca);

⁵Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco, Bilbao (España)

RESUMEN

Se ha evaluado la actividad antifúngica de la amfotericina B, en comparación con la de griseofulvina, ketoconazol, clotrimazol y terbinafina, frente a 193 aislamientos de hongos dermatófitos y *Scopulariopsis brevicaulis* por medio de un método de difusión en agar (NeoSensitabs®) que permite la categorización de los aislamientos en sensible, intermedios y resistentes a los antifúngicos. Con este método comercializado y siguiendo un protocolo estándar adaptado a las condiciones de crecimiento de los hongos dermatófitos y el moho oportunista *S. brevicaulis* (tamaño de inóculo, temperatura y tiempo de incubación), se han obtenido tasas de sensibilidad in vitro del 72%, el 94,3%, el 81,9%, el 72% y el 86% para amfotericina B, terbinafina, griseofulvina, ketoconazol y clotrimazol, respectivamente. Del mismo modo, las tasas de resistencia obtenidas han sido del 12,4%, el 3,6%, el 18,1%, el 10,4% y el 4,1% para los mismos antifúngicos. La amfotericina B no mostró actividad frente a *S. brevicaulis*, y frente a hongos dermatófitos la actividad se sitúa en un rango comparable al obtenido con ketoconazol, siendo ambas inferiores a las de clotrimazol y terbinafina.

Palabras clave: Dermatófitos - Amfotericina B - Clotrimazol - Griseofulvina - Ketoconazol - Terbinafina

*Is amphotericin B active against dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*?*

SUMMARY

The in vitro antifungal activity of amphotericin B was compared with that of griseofulvin, ketoconazole, clotrimazole and terbinafine in 193 clinical isolates of dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. An agar diffusion method was used (NeoSensitabs®) to categorize the susceptibility of the isolates as susceptible, intermediate or resistant to the antifungal agents. Using this method and following a standardized protocol adapted to the growth conditions of the dermatophytes and the opportunistic mold *S. brevicaulis* (inoculum size, temperature and time period of incubation), it was found that the in vitro susceptibility rates were 72%, 94.3%, 81.9%, 72% and 86% for amphotericin B, terbinafine, griseofulvin, ketoconazole and clotrimazole, respectively. Resistance percentages were 12.4%, 3.6%, 18.1%, 10.4% and 4.1% for the same antifungal agents. Amphotericin B showed no antifungal activity against *S. brevicaulis*; its activity against dermatophytes was similar to that of ketoconazole, and lower than that for clotrimazole and terbinafine.

Key words: Dermatophytes - Amphotericin B - Clotrimazole - Griseofulvin - Ketoconazole - Terbinafine

INTRODUCCIÓN

Los cambios sufridos en el patrón de las infecciones por hongos han afectado al número y tipo de especies implicadas. Sin duda alguna, los factores predisponentes, entre los que se encuentran la alteración de la inmunidad del huésped por enfermedades, trasplantes o tratamientos inmunosupresores, apoyan la proliferación del hongo (1-6). Diversos factores favorecen la infección a través de fuentes exógenas, como contacto o traumatismos de distinto origen, y a partir de las fuentes en que está presente el hongo dermatófito. La respuesta a los antifúngicos tópicos no siempre es favorable. Los hongos dermatófitos suelen responder bien a los tratamientos, mientras que los hongos filamentosos no dermatófitos lo hacen generalmente mal a la griseofulvina y el ketoconazol (7). El itraconazol, la amorolfina y la terbinafina son activos (7). Sin embargo, el lugar en que se produce la infección parece ser más importante que el propio hongo a la hora de complicar el tratamiento e incluso desaconsejar el uso de antifúngicos por vía tópica, como es el caso de lesiones extensas, *tinea barbae*, *capitis* y *unguium*, y foliculitis, o fracaso terapéutico e intolerancia dérmica (8). Por otro lado, la aparición de los nuevos azoles (voriconazol, posaconazol, ravuconazol y albaconazol), las nuevas formas de administración y otras familias de antifúngicos (caspofungina, micafungina o anidulafungina) están suponiendo ya una variación en los tratamientos, aunque para algunos de ellos no se contempla la indicación de las dermatofitosis (9-11). La eficacia de los distintos antifúngicos tópicos actualmente disponibles (8, 12, 13) no es similar, como tampoco lo son los espectros de actividad. Sobre estas características influyen factores tales como la viscosidad, la hidrofobicidad y el pH de la formulación, que afectarían a la penetración en los estratos de la piel (13). También son importantes los distintos mecanismos de acción y, por otro lado, la existencia de espectros de acción característicos de cada antifúngico hace que sea necesario llegar a la identificación de los distintos agentes etiológicos. Igualmente, la distinta sensibilidad de los patógenos implicados es un factor a considerar que justifica, en casos excepcionales, el estudio de la sensibilidad *in vitro* del aislamiento a los antifúngicos.

La amfotericina B es un antifúngico considerado de referencia en el tratamiento de diversos tipos de micosis durante varias décadas. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con el ergosterol y otros esteroides de membrana, produciendo una serie de efectos que conducen a la muerte de las células fúngicas (11). A pesar de que su espectro de acción es muy amplio, como corresponde a los antifún-

gicos de su clase (11), su elevada toxicidad renal por vía sistémica y su nula absorción oral hacen que no sea un antifúngico utilizado para el tratamiento de las dermatofitosis. El objetivo del estudio ha sido obtener estos datos por medio de una técnica rápida, estándar y comercializada, de difusión en agar, para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos.

MATERIALES Y MÉTODO

Se ha valorado la actividad antifúngica *in vitro* de la amfotericina B, la griseofulvina, el clotrimazol y el ketoconazol por medio de un método estándar y comercializado (*NeoSensitabs*[®], Rosco, Taastrup, Dinamarca) para la determinación, por difusión en agar, de la actividad de antifúngicos frente a levaduras y hongos dermatófitos. Se han utilizado tabletas con una carga difusible de antifúngico (Tabla 1). El método ha requerido algunas adaptaciones a los requerimientos de los hongos dermatófitos que previamente ya se han utilizado en la adaptación del método de microdilución en medio líquido (14, 15) y del *E-test*[®] (16).

Se ha estudiado la sensibilidad de 193 aislamientos humanos de hongos dermatófitos (Tabla 1). La identificación se realizó por métodos morfológicos (observación de estructuras microscópicas y en cultivo) y bioquímicos estándar (asimilación de urea en medio de cultivo), habituales en el quehacer del laboratorio de micología clínica (17, 18).

Se han utilizado, además, las cepas de referencia *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como controles de calidad de la técnica, si bien en este caso los parámetros experimentales fueron distintos entre levaduras y hongos dermatófitos. Estas dos cepas figuran en el documento M27-2A del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (19) como controles de calidad para ensayos de determinación de la actividad antifúngica *in vitro* frente a levaduras. Igualmente se utilizó la cepa *Paecilomyces variotii* ATCC 36257 (IHEM), que figura en el documento M38-A del NCCLS (20), como referencia para ensayos de determinación de la actividad antifúngica *in vitro* frente a hongos filamentosos.

Como medio de cultivo se utilizó el modificado de Shadomy (glucosa, Merck 10 g/l, Bacto-asparagina 1,5 g/l, extracto de levadura-Difco 6,7 g/l y agar 15 g/l). Se repartió en placas de Petri redondas (10 cm de diámetro) (Greiner, Madrid, España) hasta una altura de 0,5 cm (16 ml).

Para obtener las suspensiones de inóculo se utilizaron cultivos puros obtenidos a partir del crecimiento de 7 a 14 días en medio sólido de patata dextrosa (PDA) (Biolife Ita-

liana, Milán, Italia) a 28 °C en oscuridad. Se emplearon colonias maduras para obtener, por arrastre de la superficie con 1 ml de suero fisiológico (0,85% de NaCl) y Tween (Difco, Detroit, EE.UU.), los elementos fúngicos que servirán de inóculo. Posteriormente, la suspensión de conidios y fragmentos de hifas se retiró con la ayuda de una pipeta y fue transferida a tubos de plástico estériles. Las partículas pesadas se retiraron por precipitación (15-20 minutos a temperatura ambiente) y el sobrenadante fue homogeneizado con un vórtex *mixer* durante 15 segundos. Se ajustó la turbidez del sobrenadante con suero fisiológico hasta 0,5 de la escala de McFarland, correspondiente a una transmitancia del 68% a 70% medida a 530 nm de longitud de onda. Se obtuvieron y utilizaron recuentos de 10⁶ UFC/ml en placa de PDA tras incubar siete días a 28 °C, para validar el ensayo. La presencia de Tween en el suero fisiológico permitió obtener con mayor facilidad una suspensión de inóculo homogénea y no interfiere en la difusión del antifúngico de las tabletas en el ensayo de difusión en agar. Tras agitar los tubos con las suspensiones de conidios se inundó la superficie del agar con 2 ml de ellas. Se permitió un tiempo de contacto de cinco minutos, tras lo cual se retiró el contenido líquido sobrante por absorción con algodón hidrófilo esterilizado. La superficie de las placas se secó en estufa a 37 °C durante diez minutos. Con ayuda del dispensador se depositaron las tabletas de antifúngico sobre la superficie del agar.

La incubación de las placas a 28 °C se realizó en estufa durante siete días, descartándose lecturas posteriores ya que los antifúngicos sólo difunden de forma óptima durante dos a cuatro días, y se utilizaron aquellas en que el crecimiento del inóculo era visible. La lectura se efectuó midiendo los diámetros de los halos de inhibición (mm). Se descartaron las franjas de colonias parcialmente inhibidas con los antifúngicos azólicos, para los cuales se tomaron los halos de diámetro mayor en caso de aparecer dobles zonas de inhibición. El diámetro de estos halos (Tabla 1) se interpretó de acuerdo con las instrucciones para levaduras suministradas por el fabricante (21, 22). La interpretación de los resultados fue cualitativa, clasificando los aislamientos como sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia para cada antifúngico.

RESULTADOS

Los resultados muestran unas tasas de sensibilidad en los 193 aislamientos estudiados del 72%, el 94,3%, el 89,1%, el 72% y el 86% para amfotericina B, terbinafina, griseofulvina y el clotrimazol, respectivamente.

Tabla 1. Actividad antifúngica *in vitro* de la amfotericina B, la terbinafina, la griseofulvina, el ketoconazol y el clotrimazol obtenida por medio de una técnica de difusión en agar (NeoSensitabs®).

Antifúngico (carga difusible)	Amfotericina B (10 µg)			Terbinafina (10 µg)			Griseofulvina (25 µg)			Ketoconazol (15 µg)			Clotrimazol (10 µg)		
	S (9)	I (10-14)	R (>14)	S (>19)	I (12-19)	R (>12)	S (9)	R (<10)	S (>19)	I (12-19)	R (>12)	S (>19)	I (12-19)	R (>12)	
<i>E. floccosum</i>	17	1	1	17	1	1	17	1	17	1	1	17	1	1	
<i>M. audouinii</i>	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	
<i>M. canis</i>	27	2	1	29	1	1	30	1	27	1	2	30	1	1	
<i>M. gypseum</i>	3	3	1	5	1	1	5	1	2	3	1	5	1	1	
<i>M. racemosum</i>	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1	4	16	16	3	1	1	19	1	11	8	6	12	2	
<i>Trichophyton erinacei</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>T. interdigitale</i>	10	2	1	12	1	1	10	2	10	2	1	12	1	1	
<i>T. mentagrophytes</i>	29	8	1	36	1	1	38	7	28	7	3	33	4	1	
<i>T. rubrum</i>	40	8	3	51	1	1	44	7	39	8	4	47	2	2	
<i>T. schoenleinii</i>	9	1	1	9	1	1	8	1	8	1	1	9	1	1	
<i>T. terrestre</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>T. tonsurans</i>	2	2	1	4	1	1	2	3	5	1	1	4	1	1	
<i>T. violaceum</i>	6	1	1	7	1	1	4	3	5	1	2	6	1	1	
Total (n = 193)	139	30	24	182	4	7	158	35	139	34	20	166	19	8	
Total (%)	(72)	(15,5)	(12,4)	(94,3)	(2,1)	(3,6)	(81,9)	(18,1)	(72)	(17,6)	(10,4)	(86)	(9,8)	(4,1)	

vina, ketoconazol y clotrimazol, respectivamente (Tabla 1), mientras que las tasas de resistencia fueron del 12,4%, el 3,6%, el 18,1%, el 10,4% y el 4,1% para los mismos antifúngicos. Tanto las tasas de sensibilidad como de resistencia a los diferentes antifúngicos fueron dependientes del género y la especie estudiados. Los aislamientos de *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton erinacei* y *Trichophyton schoenleinii* mostraron una elevada sensibilidad a las sustancias estudiadas, ya que tan sólo un *T. schoenleinii* fue resistente a griseofulvina y ketoconazol. Los aislamientos de *Scopulariopsis brevicaulis* mostraron una reducida sensibilidad a los antifúngicos azólicos y la griseofulvina, opuestamente a lo sucedido con terbinafina. Considerando únicamente los hongos dermatófitos, la sensibilidad global fue del 79,3%, el 95,4%, el 86,8%, el 79,3% y el 92% para las mismas sustancias. El patrón de actividad y sensibilidad para la amfotericina B fue similar al del ketoconazol en los aislamientos estudiados; con ambos la actividad obtenida es ligeramente inferior a la del clotrimazol y a la de la terbinafina.

DISCUSIÓN

La determinación de la actividad de los antifúngicos frente a hongos dermatófitos requiere un estándar, cuestión que ha sido abordada en diversos trabajos (14-16, 23, 24). Gracias a la propuesta de métodos y protocolos en los cuales se fijan las distintas variables experimentales, es posible obtener una mayor reproducibilidad y correlación entre los datos de distintos laboratorios. Con ello se ha profundizado en el paralelismo existente entre la actuación del antifúngico *in vitro* y en el entorno donde realmente debe ejercer su acción, lo que permite alcanzar una mejor correlación *in vitro-in vivo*. La utilización de métodos comercializados resulta de gran ayuda para el laboratorio; en este caso, la técnica empleada permite clasificar a los aislamientos en sensibles, resistentes o intermedios de forma rápida y menos laboriosa en comparación con otros procedimientos. La aparición de métodos comerciales de sencilla y rápida ejecución, que puedan tener utilidad clínica por medio de valores orientativos, define, una vez aceptado el método de referencia, la utilización en la práctica de laboratorios de un nivel diagnóstico más que de investigación (10, 25-31). Una de las ventajas prácticas que aportan los sistemas comercializados de estudio de la sensibilidad a los antifúngicos es la facilidad con que pueden introducirse en el uso diario del laboratorio de microbiología clínica. Pero debe tenerse en cuenta que son muchas las variables experimentales que pueden afectar a los resultados obtenidos (10, 25-31). Tradicional-

mente, la forma de interpretar la lectura de la concentración de antifúngico capaz de inhibir al inóculo (concentración mínima inhibitoria) ha sido uno de los puntos más críticos. En el caso de los antifúngicos azólicos, y debido al característico efecto de arrastre o crecimiento residual, la lectura que servía como definitoria era la menor concentración capaz de inhibir en un 50% el desarrollo del inóculo con respecto al pocillo control libre de sustancia. En el caso de la amfotericina B, y también por la diferencia entre los mecanismos de acción con respecto a los antifúngicos azólicos, esa misma lectura se asignaba a aquella menor concentración que fuese capaz de inhibir totalmente el desarrollo del inóculo. En la actualidad, tres técnicas comercializadas (10) vienen a solucionar el problema de la lectura, sobre todo con los antifúngicos azólicos, facilitándola por medio de un cambio de color del indicador de pH presente en el medio de cultivo como consecuencia de la actividad metabólica de las células viables del hongo. Los diferentes métodos se caracterizan por un alto grado de reproducibilidad y estandarización, por lo cual su aceptación queda únicamente condicionada, en ocasiones, por la ineludible relación entre coste y beneficio más que por su correlación con el método de referencia.

Sensititre[®] *Yeast One* (Trek Diagnostic Systems Inc., Wetslake, OH, EE.UU.), *ASTY*[®] *colorimetric panel* (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Tokio, Japón) y *Fungites*[®] (Sanofi Diagnostics Pasteur, París, Francia) han venido a completar la serie de técnicas disponibles, junto con las de dilución *ATB-Fungus*[®] y de difusión en agar, como *E-test*[®] y *NeoSensitabs*[®] entre las de mayor implantación (10, 25). Las técnicas comercializadas son apreciadas por el laboratorio medio por su asequibilidad y grado de estandarización, reducción del tiempo de procesado y del coste, así como por la fiabilidad de los resultados que han de orientar al clínico (10, 29, 31). El método de difusión en agar *NeoSensitabs*[®] ha sido ampliamente empleado y evaluado para el estudio de levaduras con un amplio número de antifúngicos (9, 10, 12, 29, 32-38). Este método había sido utilizado previamente en el estudio de sensibilidad de *E. floccosum* (39). Es un sistema rápido, de bajo coste y fácil disponibilidad con tabletas estándar de sertaconazol, adaptando las variables experimentales a las utilizadas en ensayos publicados anteriormente (14-16, 23, 24), que permite disponer de datos cualitativos en hongos dermatófitos frente a antifúngicos. Estas ventajas llevaron a seleccionar el método de difusión en agar *NeoSensitabs*[®] para el presente estudio, aplicando los criterios de lectura e interpretación utilizados para las levaduras (22). Los valores de actividad

obtenidos (16) con *E-test*[®] para *E. floccosum* son de 0,14 y 0,19 mg/l para amfotericina B y ketoconazol, respectivamente, y comparables al 100% de sensibilidad encontrado en las cepas estudiadas con *NeoSensitabs*[®]. En el mismo trabajo (16), las CMI para *M. canis* con ambos antifúngicos (1 y 0,22 mg/l) son superiores a las obtenidas para *E. floccosum*, observándose en nuestro estudio la aparición de aislamientos resistentes, hecho que también se observa en *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*. La actividad antifúngica de la amfotericina B ya se reveló con un método de microdilución en medio líquido (15), pero es menor que la de terbinafina y clotrimazol frente a diversos dermatofitos y del mismo rango que la de ketoconazol, coincidiendo las CMI₅₀ y CMI₉₀ de ambas sustancias.

En conclusión, puede afirmarse que el patrón de sensibilidad a la amfotericina B entre los hongos dermatofitos es similar al del ketoconazol, y aunque se trata de una sustancia que tiene actividad antifúngica frente a este tipo de hongos, ésta es inferior a la del clotrimazol, la terbinafina y la griseofulvina. El método utilizado se ha revelado como una técnica rápida para el estudio de la sensibilidad de hongos dermatofitos, si bien es necesario profundizar en su comparación con otros métodos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lecha-Carralero, M. Onicomicosis. Aula Médica, Madrid 1995.
2. Boisseau-Garsaud, A.M., Desbois, N., Guillermin, M.L., Ossondo, M., Gueho, E., Cales-Quist, D. *Onychomycosis due to Exophiala jeanselmei*. *Dermatol* 2002; 204: 150-152.
3. Filipello-Marchisio, V. *Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates*. En: Kushawa, R.K.S., Guarro, J. (Eds.). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao 2000; 86-92.
4. Nucci, M., Anaissie, E. *Cutaneous infection by Fusarium species in healthy and immunocompromised hosts: Implications for diagnosis and management*. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 909-920.
5. Virgili, A., Zampino, M.R., Mantovani, L. *Fungal skin infections in organ transplant recipients*. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3: 19-35.
6. Ellis, D.H. *Clinical Mycology. The human opportunistic mycoses*. Gillingham Printers Pty, Ltd., Underdale, Australia 1994.
7. Bell-Syer, S.E.M., Hart, R., Crawford, F. y cols. *A systematic review of oral treatments for fungal infections of skin and feet*. *J Dermatol Treat* 2001; 12: 69-74.
8. Del Palacio, A., Garau, M., González-Escalada, A., Calvo, M.T. *Trends in the treatment of dermatophytoses*. En: Kushawa, R.K.S., Guarro, J. (Eds.). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Rev Iberoam Micol 2000; 148-158.
9. Carrillo-Muñoz, A.J., Pemán, J., Gobernado, M. *Nuevos antifúngicos*. Rev Esp Quimioterap 1999; 12: 181-204.
10. Carrillo-Muñoz, A.J., Brió, S., Quindós, G. *Una nueva generación de fármacos antifúngicos*. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 4-7.
11. Carrillo-Muñoz, A.J., Quindós, G., López-Ribot, J.L. *Current developments in antifungal agents: Present and future*. *Curr Med Chem Anti-Infect Agents* 2004; 3: in press.
12. Carrillo-Muñoz, A.J. *Antifúngicos antibióticos de uso tópico*. *Act Dermatol* 1996; 387.
13. Alou-Cervera, L., Maestre, J.R., Moreno-Úbeda, J. y Grupo para el Estudio del Consumo de Antimicrobianos en España. *Use of topical antifungal agents in Spain*. Rev Esp Quimioterap 2002; 14: 340-344.
14. Fernández-Torres, B., Vázquez-Veiga, H., Llovo, X., Pereiro, Jr. M., Guarro, J. *In vitro susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of Trichophyton rubrum*. *Chemother* 2000; 46: 90: 394.
15. Fernández-Torres, B., Carrillo, A.J., Martín, E. y cols. *In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 45: 2524-2528.
16. Fernández-Torres, B., Carrillo-Muñoz, A.J., Ortoneda, M., Pujol, I., Pastor, J., Guarro, J. *Interlaboratory evaluation of the E-test[®] for antifungal susceptibility testing*. *Med Mycol* 2003; 41: 125-130.
17. Cuétara, M. *Procesamiento de las muestras superficiales*. En: Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., Rubio-Calvo, M.C. (Eds.). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. Rev Iberoam Micol 2001; 4.1-5.12.
18. Cabañes, F.J. *Identificación de hongos dermatofitos*. En: Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., Rubio-Calvo, M.C. (Eds.). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Rev Iberoam Micol 2001; 12.1-12.11.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, M38-A. National Committee for Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA 2000.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-A2 Approved Standard-Second Edition. National Committee for Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA 2002.
21. Carrillo-Muñoz, A.J. *Contribución a la estandarización de las pruebas de sensibilidad in vitro a los antifúngicos*. Universitat de Barcelona 1994.
22. Rosco. *User's guide Neo-Sensitabs[®]*, 16th ed. 2003.
23. Carrillo-Muñoz, A.J., Fernández-Torres, B., Cárdenes, D.C., Guarro, J. *In vitro activity of sertaconazole against dermatophyte moulds isolates with reduced fluconazole susceptibility*. *Chemother* 2003; 49: 248-251.
24. Carrillo-Muñoz, A.J., Fernández-Torres, B., Guarro, J. *In vitro activity of sertaconazole against 309 strains of dermatophyte moulds*. *J Chemother* 2003; 15: 555-557.
25. Cantón, E., Martín-Mazuelos, E., Espinel-Ingroff, A. *Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos*. En: Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., Rubio-Calvo, M.C. (Eds.). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Rev Iberoam Micol 2001; 16.1-16.9.
26. LaRocco, M.T., Burgert, S.J. *Fungal infections in the transplant recipient and laboratory methods for diagnosis*. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 143-146.
27. Odds, F.C. *Personal opinion: Can antifungal sensitivity tests predict clinical treatment outcomes?* Rev Iberoam Micol 1997; 14: 83-84.

28. Odds, F.C. *Should resistance to azole antifungals in vitro be interpreted as predicting clinical non-response?* Drug Resistance Updates 1998; 1: 11-15.
29. Carrillo-Muñoz, A.J. *Multicenter evaluation of the reproducibility of Neo-Sensitabs antifungal sensitivity testing.* Rev Iberoam Micol 1994; 11: 56.
30. Pemán, J., Cantón-Lacasa, E. *Las pruebas de sensibilidad antifúngica en un laboratorio de microbiología clínica.* Rev Esp Quimioterap 1996; 9: 17-20.
31. Rex, J.H., Pfaller, M.A., Rinaldi, M.G., Polak, A., Galgiani, J.N. *Antifungal susceptibility testing.* Clin Microbiol Rev 1993; 6: 367-381.
32. Carrillo-Muñoz, A.J., Brió, S., Alonso, R., del Valle, O., Santos, P., Quindós, G. *Ciclopiroxolamine: In vitro antifungal activity against clinical yeasts isolates.* Int J Antimicrob Agents 2002; 20: 375-379.
33. Casals, J.B. *Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi.* J Clin Path 1979; 32: 719-722.
34. Casals, J.B., Pringler, N. *Sensitivity testing of yeast against ketoconazole, itraconazole and fluconazole by an agar diffusion method.* Scand Meet Bact, Gothenburg, May 1989.
35. Ceballos-Salobreña, A., Gaitán-Cepeda, L.A., Orihuela-Cañada, F., Olea-Barrionuevo, D., Ceballos-García, L., Quindós, G. *In vitro antifungal resistance in Candida albicans from HIV-patients with and without oral candidosis.* Rev Iberoam Micol 1999; 16: 194-197.
36. Quindós, G., Abarca, L., Carrillo-Muñoz, A.J. y cols. *Multicenter survey of in vitro antifungal resistance in yeasts of medical importance isolated from Spanish patients.* Rev Iberoam Micol 1996; 16: 97-100.
37. Sandven, P. *Detection of fluconazole resistant Candida strains by a disc diffusion screening test.* J Clin Microbiol 1999; 37: 3856-3859.
38. Carrillo-Muñoz, A.J., Abarca, L., Quindós, G. y cols. *Evaluation of an agar diffusion method for in vitro antifungal susceptibility testing.* Rev Esp Quimioterap 1995; 8: 221-228.
39. Cabañes, F.J., Abarca, L., Bragulat, M., Bruguera, T. *Sensitivity of some strains of the genus Epidermophyton to different antifungal agents.* Mycopathol 1989; 105: 153-156.