

# Ponencia

## Criterios de sensibilidad a los azoles

J. Gil Tomás, C. Rubio Calvo y R. Benito Ruesca

*Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza*

### INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo la sensibilidad de los hongos a los antifúngicos apenas se estudió con detalle, de tal manera que en la década de 1980 no disponíamos de métodos estándar y reproducibles de valoración de la sensibilidad a los antifúngicos, a pesar de que ya existían desde hacía tiempo para los antibióticos. El desfase entre las pruebas de evaluación *in vitro* de los antifúngicos con respecto a los antibióticos puede explicarse por los siguientes motivos:

- La evolución histórica de las infecciones fúngicas, ya que los principales problemas de salud ocasionados por los hongos durante muchos años fueron, fundamentalmente, las dermatomicosis, pero con la aparición del sida y el avance de la medicina se produce un incremento en la prevalencia de las micosis y un cambio en su etiología, pasando los microorganismos saprófitos o ambientales a ser los causantes de cuadros muchas veces mortales.
- El desarrollo de los antifúngicos, de forma paralela a la evolución de las micosis, y la similitud de algunas estructuras fúngicas con las del huésped explican el arsenal terapéutico antifúngico existente hoy día, su evolución desde la década de 1950 y el número de publicaciones referentes a los antifúngicos (1).

El interés despertado hacia las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos como consecuencia del incremento de las infecciones fúngicas, del desarrollo de otros antifúngicos o de nuevas formulaciones sigue manteniéndose debido a la aparición de cepas resistentes, de procesos infecciosos producidos por nuevos microorganismos y a la amplia utilización de los antifúngicos, bien en pautas profilácticas, en tratamientos prolongados de mantenimiento o en combinaciones sinérgicas.

Este interés ha obligado al desarrollo de métodos reproducibles y estándar de evaluación *in vitro* que sirvan de guía en la instauración del tratamiento.

### DESARROLLO DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LOS ANTIFÚNGICOS

#### Estudio de la concentración mínima inhibitoria para las levaduras

Ante la falta de un método estándar para el estudio de la sensibilidad, en 1982 el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) formó un subcomité con el objeto de establecer una normativa para las pruebas de sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos. Dicho subcomité, basándose en estudios previos (2, 3), enfocó el problema de la estandarización hacia el uso de un método en caldo para levaduras de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*. Como consecuencia del trabajo de varios años surgen los documentos M27-P en 1992 (4), M27-T en 1995 (5) y M27-A en 1997 (6).

Con la publicación de este último se dispone de un sistema estándar para el estudio de la sensibilidad antifúngica *in vitro* de las levaduras, basado en un método de macrodilución y microdilución en caldo en el cual se definen las condiciones en que tiene que realizarse y los puntos de corte para fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina.

Este procedimiento muestra algunas limitaciones. Uno de los problemas es la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los azoles debido al fenómeno “arrastre”. En esta situación la lectura visual hace especialmente difícil la determinación de la CMI, al tiempo que subjetiva. Con el fin de evitar esto se han propuesto numerosas sugerencias, como la lectura a las 24 horas, el descenso del pH a 5, el aumento del tamaño del inóculo, la suplementación del medio de cultivo con glucosa y la lectura espectrofotométrica para la determinación del punto de corte, entre otras (7-12).

El documento M27-A2, publicado en 2002 (13), aunque hace referencia a la posibilidad de añadir glucosa al medio con el fin de simplificar la lectura del punto de corte, no aporta soluciones sobre el problema del crecimiento residual. Destaca la influencia que ejerce el tiempo en la determinación de la CMI de ciertas cepas y cómo la lectura a las 24 horas puede tener más relevancia clínica, sobre todo para cepas con fenómeno “arrastre”, tal y como corroboran diversos autores con modelos animales (7, 14, 15).

En el año 2002, el subcomité para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos creado dentro del *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST) publicó el estándar *EUCAST Discussion Document E.Dis 7.1* (16). Este documento, basado en el del NCCLS, propone una alternativa para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos de las levaduras fermentadoras. Este método, reproducible y con buena concordancia con el estándar del NCCLS, permite dar una respuesta más rápida, simplifica la determinación de la CMI y la libera de subjetividad (17). Las discrepancias entre ambos métodos, cuando se producen, se deben a cepas de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*, algunas de ellas mostrando un manifiesto “arrastre”, de tal manera que las CMI por el método del NCCLS son mucho más altas a las 48 que a las 24 horas (18). Arthington-Staggs y cols. (19), en un estudio llevado a cabo con el método M27-A, sugieren que la lectura visual a las 24 horas y la espectrofotométrica a las 48 horas se relacionan mejor con los resultados *in vivo* para aquellas cepas que a las 48 horas tienen un marcado crecimiento residual.

### **Estudio de la concentración mínima inhibitoria para los hongos filamentosos**

El interés del NCCLS se centró también en los hongos filamentosos. Basándose en dos estudios previos (20, 21) surgió el documento M38-P, en 1998, como método de referencia para el estudio de la sensibilidad de los hongos filamentosos productores de conidias (22). Las condiciones de dicho documento hacen referencia a un método de macrodilución y microdilución para el estudio de sensibilidad de *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Sporothrix schenckii* y *Pseudallescheria boydii*.

Odds y cols. (23), aunque ponen de manifiesto la existencia de cierto grado de correlación entre lo que sucede *in vitro* y la respuesta al tratamiento en modelos animales para *Aspergillus* spp. y *Rhizopus* spp., no fueron concluyentes con *Fusarium* spp. y *P. boydii*, ya que no establecían condiciones *in vivo* por las limitaciones del modelo animal. Además, las CMI de las cepas infectantes se encontraban en un rango muy estrecho, tanto si los modelos animales respondían o no al tratamiento. Por lo tanto, el valor clínico del documento M38-P necesitaba ser establecido.

Surgen diversos trabajos que estudiando diferentes variables (medio de cultivo, inóculo, tiempo de incubación, criterio de lectura) con distintas especies de hongos filamentosos, entre los que se incluyen especies no comprendidas en el documento M-38P, intentan establecer cuáles son las condiciones con que se pueda obtener una buena concordancia interlaboratorio, se detecten resistencias y se logre una buena correlación con lo que sucede *in vivo* (24-32).

Las conclusiones derivadas de todos estos trabajos quedan recogidas en un nuevo documento del NCCLS, el M38-A, publicado en el año 2002 como método de referencia para el estudio de la sensibilidad de los hongos filamentosos (33). Este documento incluye, entre los hongos filamentosos, a los no formadores de conidias.

### **Estudio de la concentración mínima fungicida para los hongos filamentosos**

Como un antifúngico con actividad fungicida ofrece ventajas terapéuticas sobre un fungistático, sobre todo en inmunodeprimidos, y considerando que *Aspergillus* spp. es el causante del 85% a 90% de las infecciones fúngicas por filamentosos, numerosos trabajos han evaluado durante los últimos años la actividad fungicida de los nuevos triazoles mediante

métodos no estándar. Espinel y cols. (31, 32), basándose en el documento M38-A, concluyen que la concentración fungicida mínima para diferentes especies de filamentosos, entre los que se encuentran dematiáceos y especies poco frecuentes, con amfotericina B, itraconazol y los nuevos triazoles, puede determinarse tras alcanzar la CMI con el método M38-A y con el criterio de menos de tres colonias vivas o del 99% a 99,5% de muerte celular.

### Método de difusión en disco para el estudio de sensibilidad de las levaduras

El NCCLS, en su interés por disponer de métodos de estudio de la sensibilidad que por su sencillez técnica puedan llevarse a cabo en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica, publica en el año 2003 el documento M44-P para el estudio de sensibilidad de *Candida* spp. mediante el método de difusión en disco frente a fluconazol, utilizando como medio de cultivo agar Mueller-Hinton con un 2% de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno (33, 34).

Es un método no laborioso, barato y de lectura fácil, ya que el fenómeno de “arrastre” es bajo, con un alto grado de reproducibilidad, buena correlación con el documento M27-A y útil para detectar los aislamientos de *Candida* spp. sensibles al fluconazol, debiendo determinar la CMI para aquellos con sensibilidad disminuida (35-38).

Aunque el NCCLS no ha establecido los puntos de corte para voriconazol, se ha valorado la viabilidad del método disco-placa para el estudio de sensibilidad de *Candida* spp. a este antifúngico, con un porcentaje global de concordancia con el NCCLS del 99,4% (39).

### Métodos comerciales de estudio de la sensibilidad

#### Métodos colorimétricos

Uno de los procedimientos tendentes a facilitar la determinación de las CMI son los métodos colorimétricos. Aunque se han utilizado varios indicadores colorimétricos de óxido-reducción, el Alamar Bleu es el analizado con más detalle. *Sensititre YeastOne*® es un método de microdilución basado en el NCCLS que lleva incorporado Alamar Bleu, posee buena reproducibilidad y concordancia con el estándar del NCCLS, permite dar resultados más rápidos para los azoles y la determinación visual del punto de corte está facilitada por la presencia del indicador (40-42).

#### E-test®

El *E-test*® está basado en la difusión de distintas concentraciones de antifúngico incorporadas en una tira de plástico inerte, que da lugar a la formación de una elipse de inhibición del crecimiento. Es una técnica fácil de realizar, con un alto grado de reproducibilidad y una buena concordancia con el NCCLS. Con los hongos filamentosos se obtienen elipses de inhibición claras y más fáciles de interpretar que con las levaduras (39, 42-47). Autores como Matar y cols. (48) han mostrado el buen funcionamiento del medio de Mueller-Hinton con glucosa y azul de metileno para eliminar o disminuir el efecto “arrastre” presentado por algunas cepas.

En la Tabla 1 se resumen las técnicas de estudio de sensibilidad de los hongos.

**Tabla 1. Métodos para el estudio de sensibilidad.**

1) Métodos estándar
a) Para levaduras:
– CMI en caldo: NCCLS, documento M27-A2 EUCAST, documento E.Dis 7.1
– Difusión en disco para fluconazol: NCCLS, documento M44-P
b) Para hongos filamentosos:
– CMI en caldo: NCCLS, documento M38-A
2) Métodos comercializados
CMI en caldo: <i>Sensititre YeastOne</i> ®
CMI por difusión: <i>E-test</i> ®
Difusión en disco (sólo para levaduras)

### INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

La capacidad de generar un resultado de CMI tiene poco valor sin la correspondiente interpretación de su significado clínico. Sin embargo, este proceso no es fácil, ya que tanto el huésped como el agente causal desempeñan un papel importante.

Aunque la correlación entre las pruebas *in vitro* de sensibilidad a los antifúngicos y la respuesta al tratamiento de los enfermos con micosis no es muy elevada, se han llevado a cabo estudios que han permitido establecer los puntos de corte

**Tabla 2. Puntos de corte (en mg/l) establecidos por el NCCLS, en su documento M27-A, para *Candida* spp. y azoles.**

Antifúngico	Sensible	S-DD	Resistente
Fluconazol	≤8	16-32	≥64
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	≥1

S-DD: sensible dependiendo de la dosis.

aumento en el fracaso terapéutico, sensibles dependiendo de la dosis (S-DD) con CMI de 16-32 mg/l y su sensibilidad depende de las concentraciones plasmáticas alcanzadas con dosis >800 mg/día de fluconazol, y cepas sensibles aquellas con CMI ≤8 mg/l (Tabla 2). Estos puntos de corte no son aplicables para *C. krusei* (49).

Con el itraconazol los puntos de corte se determinaron con cepas de *Candida* spp. obtenidas de pacientes con sida y candidiasis orofaríngea. Se estudió la relación entre las CMI, la respuesta clínica y las concentraciones plasmáticas. Son cepas resistentes aquellas con una CMI ≥1 mg/l y predicen un aumento en el fracaso terapéutico, con CMI de 0,25-0,5 mg/l son consideradas S-DD y su sensibilidad depende de concentraciones séricas ≥0,5 mg/l, y cepas con CMI ≤0,125 mg/l son consideradas sensibles (Tabla 2) (49).

No se ha encontrado una correlación tan clara en las candidiasis profundas; en general ha sido ligera y en ocasiones inversa (49, 50). Trabajos con modelos animales han demostrado que se produce un descenso de la respuesta al fluconazol con CMI >8 mg/l, y con itraconazol el fallo terapéutico se ha asociado con CMI >0,25 mg/l (7, 51).

Los puntos de corte establecidos en el documento M27-A para *Candida* spp., dentro de su valor, tienen ciertos puntos débiles: 1) hay pocos seguimientos clínicos con cepas con CMI elevadas; 2) los estudios se han realizado fundamentalmente en pacientes con sida y con candidiasis orofaríngea, habiendo pocos datos con pacientes no neutropénicos y con candidiasis invasora; y 3) no se ha realizado estratificación por enfermedades de base o dosis de antifúngico.

**Tabla 3. Puntos de corte (en mm de diámetro del halo de inhibición) mediante difusión en disco establecidos por el NCCLS, en su documento M44-P, para *Candida* spp. y fluconazol.**

Antifúngico	Sensible	S-DD	Resistente
Fluconazol	≥19	15-18	≤14

S-DD: sensible dependiendo de la dosis.

de sensibilidad para fluconazol, itraconazol y flucitosina aplicables únicamente en infecciones por *Candida* spp., que quedan recogidos en el documento M27-A del NCCLS (6).

Para el fluconazol, los puntos de corte se determinaron con cepas de *Candida* spp. obtenidas fundamentalmente de pacientes con sida y candidiasis orofaríngea, y en menor medida de pacientes no neutropénicos con episodios de candidemia o candidiasis sistémica. Se concluyó que son cepas resistentes aquellas con CMI ≥64 mg/l y predicen un

En el documento M44-P se establecen los puntos de corte para el fluconazol (Tabla 3). Se consideran sensibles aquellas cepas con un diámetro del halo de inhibición ≥19 mm, que se corresponde con una CMI ≤8 mg/l, S-DD con 15-18 mm equivalente a una CMI de 16-32 mg/l, y resistentes con un halo de inhibición ≤14 mm y CMI ≥64 mg/l (34). Aunque no se han establecido los puntos de corte para voriconazol, diferentes estudios con *Candida* spp. y una carga de 1 µg de voriconazol establecieron que todas las cepas con una CMI ≤1 mg/l tenían un halo de inhibición >13 mm de diámetro (39, 48).

Respecto a las infecciones por hongos miceliales no se han propuesto puntos de corte para los azoles. Denning y cols. (52-54) han comunicado fracasos terapéuticos con itraconazol en enfermos de aspergilosis cuyas cepas de *Aspergillus fumigatus* tenían CMI ≥8 mg/l, lo que corroboraron en modelos murinos.

## ¿SON LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD LA BASE PARA LA INDICACIÓN TERAPÉUTICA?

En la actualidad, muchos expertos se plantean si las pruebas de sensibilidad antifúngica pueden ser la base para la indicación de la terapia antifúngica (55). Si bien los tests de sensibilidad a los antifúngicos están menos desarrollados y son menos utilizados que los de las bacterias, éstos se han beneficiado de las bases científicas de las pruebas antibacterianas que permiten, mediante extrapolación, explicar ciertas cuestiones.

Según Odds (56), cierto dogmatismo ha envuelto a las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, de tal manera que si una bacteria es sensible a un determinado agente, éste se considera automáticamente el tratamiento adecuado para la erradicación del patógeno, y si la bacteria es resistente a un compuesto concreto, éste es inmediatamente excluido para tratar al paciente infectado por dicho microorganismo. En realidad se trata de una interpretación simplista de las pruebas de sensibilidad, al tiempo que se les otorga, muchas veces, un valor predictivo superior al que poseen. Son pruebas que proporcio-

nan una información útil para la instauración del tratamiento, pero no predicen ni pueden hacerlo de forma definitiva cuándo un determinado antimicrobiano supone o no el éxito del tratamiento en un paciente infectado.

### Principios para la indicación terapéutica

A la hora de utilizar las CMI como un valor predictivo de la respuesta clínica al tratamiento debemos considerar tres principios (49): 1) la CMI no es una medida física ni una determinación química; 2) hay muchas razones por las que un patógeno puede no responder al tratamiento instaurado con una molécula que *in vitro* ha funcionado, pues la farmacocinética y la farmacodinamia del antimicrobiano, la localización del proceso infeccioso, la formación de abscesos, la presencia de catéteres, las prótesis, la naturaleza del huésped y los factores de virulencia del agente etiológico son condicionantes; y 3) también hay razones por las cuales un microorganismo considerado como resistente *in vitro* puede responder al tratamiento instaurado con esta molécula: puede que el patógeno probado no sea en realidad el causante de la infección, o que el efecto subinhibitorio de un determinado compuesto permita que el sistema inmunitario erradique al microorganismo. Esto, que puede considerarse una exageración del fracaso de las pruebas de sensibilidad en la predicción del tratamiento, es algo que queda reflejado en la literatura. Las infecciones por un microorganismo sensible responden al tratamiento adecuado aproximadamente el 90% de las veces, y las producidas por microorganismos resistentes y las infecciones tratadas inadecuadamente responden aproximadamente en un 60% (57). Es obvio que otros factores distintos a la sensibilidad influyen en la respuesta clínica. Así, el valor predictivo de la categoría sensible o resistente según las pruebas de sensibilidad depende de la farmacocinética del antimicrobiano en un determinado huésped, de la naturaleza de éste y de los factores de virulencia.

### Criterios para la indicación terapéutica

En la interpretación de los resultados debemos tener presentes los criterios establecidos en 1997 por el NCCLS (49) para las pruebas de sensibilidad:

- La CMI no es una medida física ni química.
- Los factores del huésped son, a veces, más importantes que los resultados de las pruebas en la determinación de la respuesta clínica.
- La sensibilidad de un microorganismo *in vitro* no predice necesariamente el éxito *in vivo*.
- La resistencia *in vitro* pronostica con frecuencia el fracaso terapéutico, al ser este hecho una causa importante de patogenicidad, sobre todo en el enfermo con las defensas disminuidas.

A estos principios, todavía vigentes, habría que añadir la consideración de la farmacocinética y la farmacodinamia en la mejor interpretación de las CMI.

Dada la creciente importancia de la farmacocinética y la farmacodinamia en la mejor interpretación de las CMI, y basándonos una vez más en las bacterias (58, 59), se empezaron a valorar para los antifúngicos estos parámetros con la intención de encontrar un método más adecuado para integrar las pruebas de sensibilidad y la respuesta al tratamiento (60). Al comienzo, diversos estudios realizados en modelos animales mostraron cómo la relación entre el área bajo la curva (ABC) y la CMI es el parámetro que mejor predice la respuesta al tratamiento con fluconazol (61, 62). Estudios posteriores llevados a cabo con los clásicos y nuevos triazoles han demostrado que un índice ABC/CMI de 20-25 en azoles y candidiasis orofaríngea y micosis profundas predice un éxito del tratamiento tanto en cepas sensibles como con sensibilidad disminuida (63-67).

Por lo tanto, es simplista realizar la elección del tratamiento o el rechazo de un determinado fármaco basándonos solamente en los resultados *in vitro*, sin tener en cuenta al sujeto del proceso infeccioso. Pero, sin duda alguna, tampoco actuaríamos responsablemente si las obviásemos. Las pruebas de sensibilidad deben concebirse como una parte dentro del proceso de predecir si un paciente responderá o no al tratamiento, y de ahí la importancia de disponer de métodos estándar que permitan la detección de resistencias.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Swartz, M.N. *Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2009-2016.
2. Calhoun, D.L., Roberts, G.D., Galgiani, J.N. y cols. *Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B*. J Clin Microbiol 1986; 23: 298-301.
3. Galgiani, J.N., Reiser, J., Brass, C., Espinel-Ingroff, A., Gordon, M.A., Kerkering, T.M. *Comparison of relative susceptibilities of Candida species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods*. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1343-1347.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard NCCLS document M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1992.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative standard NCCLS document M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 1995.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 1997.
7. Rex, J.H., Nelson, P.W., Paetznick, V.L., Lozano-Chiu, M., Espinel-Ingroff, A., Anaissie, E.J. *Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 129-134.
8. Marr, K.A., Rustad, T.R., Rex, J.H., White, T.C. *The trailing endpoint phenotype in antifungal susceptibility testing is pH-dependent*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1383-1386.
9. Odds, F.C., Vranckx, L., Woestenborghs, F. *Antifungal susceptibility testing of yeasts: Evaluation of technical variables for test automation*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2051-2060.
10. Pfaller, M.A., Messer, S.A., Coffman, S. *Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870*. J Clin Microbiol 1995; 33: 1094-1097.
11. Rodríguez-Tudela, J.L., Berenguer, J., Martínez-Suárez, J.V., Sánchez, R. *Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1998-2003.
12. Cuenca-Estrella, M., Díaz-Guerra, T.M., Mellado, E., Rodríguez-Tudela, J.L. *Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of Candida spp.* J Clin Microbiol 2001; 39: 525-532.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 2nd ed. Approved Standard NCCLS document M27-A2, Wayne, Pa 2002.
14. Revankar, S.G., Kirkpatrick, W.R., McAtee, R.K. y cols. *Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method*. J Clin Microbiol 1998; 36: 153-156.
15. Arthington-Staggs, B.A., Warnock, D.W., Morrison, C.J. *Quantitation of Candida albicans ergosterol content improves the correlation between in vitro antifungal susceptibility test results and in vivo outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2081-2085.
16. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. EUCAST Discussion document E, Dis 7.1 ESCMID, Taufkirchen 2002.
17. Cuenca-Estrella, M., Moore, C.B., Barchiesi, F. y cols. *Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST)*. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 467-474.
18. Cuenca-Estrella, M., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A. y cols. *Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of Candida species*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3644-3647.
19. Arthington-Staggs, B.A., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A. y cols. *Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC endpoint determination and evolution of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing Candida isolates*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2477-2481.
20. Espinel-Ingroff, A., Dawson, K., Pfaller, M. y cols. *Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 314-319.
21. Espinel-Ingroff, A., Bartlett, M., Bowden, R. y cols. *Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 35: 139-143.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed Standard NCCLS document M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 1998.
23. Odds, F.C., Gerven, F.V., Espinel-Ingroff, A. y cols. *Evaluation of possible correlation between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 282-288.
24. Gehrt, A., Peter, J., Pizzo, P.A., Walsh, T.J. *Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MIC of antifungal agents by broth microdilution method*. J Clin Microbiol 1995; 33: 1302-1307.
25. Pujol, L., Guarro, J., Sala, J., Riba, M.D. *Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against Fusarium*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 808-811.
26. Llop, C., Pujol, I., Aguilar, C., Sala, J., Riba, D., Guarro, J. *Comparison of three methods of determining MIC for filamentous fungi using different endpoint criteria and incubation periods*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 239-242.
27. Pujol, I., Fernández-Ballart, J., Guarro, J. *Effect of inoculum from on in vitro antifungal susceptibilities of Aspergillus spp.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 47: 715-718.

28. Rambali, B., Fernández, J.A., Nuffel, L.V. y cols. *Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: A process analysis of test variables.* J Antimicrob Chemother 2001; 48: 163-177.
29. Papithou, N.I., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, V.L., Rodríguez, J.R., Chen, E., Rex, J.H. *In vitro activities of investigational triazoles against Fusarium species: Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3298-3300.
30. Espinel-Ingroff, A., Bartlett, M., Chaturvedi, V. y cols. *Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in Aspergillus spp. NCCLS collaborative evaluation.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1828-1835.
31. Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M.G., Walsh, T.J. *Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp. NCCLS collaborative study.* J Clin Microbiol 2002; 40: 3204-3208.
32. Espinel-Ingroff, A., Chaturvedi, V., Fothergill, J., Rinaldi, M.G. *Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study.* J Clin Microbiol 2002; 40: 3776-3781.
33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard NCCLS document M38-A.* National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 2002.
34. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Proposed Guideline NCCLS document M44-P.* National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 2003.
35. Barry, A.L., Brown, S.D. *Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of Candida species.* J Clin Microbiol 1996; 34: 2154-2157.
36. May, J.L., King, A., Warren, C.A. *Fluconazole disk diffusion testing for the routine laboratory.* J Antimicrob Chemother 1997; 40: 511-516.
37. Meis, J., Petrou, M., Bille, J., Ellis, D., Gibbs, D., and the Global Antifungal Surveillance Group. *A global evaluation of the susceptibility of Candida species to fluconazole by disk diffusion.* Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 36: 215-223.
38. Rubio, M.C., Gil, J., Ramírez de Ocariz, I., Benito, R., Rezusta, A. *Comparison of results obtained by testing with three different agar media and by the NCCLS M27-A method for in vitro testing of fluconazole against Candida spp.* J Clin Microbiol 2003; 41: 2665-2668.
39. Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Messer, S.A., Boyken, L., Hollis, R.J. *Activities of fluconazole and voriconazole against 1586 recent clinical isolates of Candida species determined by broth microdilution, disk diffusion, and E-test methods: Report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001.* J Clin Microbiol 2003; 41: 1440-1446.
40. Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A. y cols. *Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging Candida spp., Cryptococcus spp., and other yeasts and yeast-like organisms.* J Clin Microbiol 1999; 37: 591-595.
41. Yamaguchi, H., Uchida, K., Nagino, K., Matsunaga, T. *Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of Aspergillus species to voriconazole.* J Infect Chemother 2002; 8: 374-377.
42. Martín-Mazuelos, E., Pemán, J., Valverde, A., Chaves, M., Serrano, M.C., Cantón, E. *Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel and E-test 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.
43. Arendrup, M., Lundgren, B., Jensen, I.M., Hanse, B.S., Frimodt-Møller, N. *Comparison of E-test and tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of Candida isolates.* J Antimicrob Chemother 2001; 47: 521-526.
44. Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M. *Comparison of the antifungal susceptibility testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species.* J Clin Microbiol 2002; 40: 3841-3844.
45. Maxwell, M.J., Messer, S.A., Hollis, R.J. y cols., International Fungal Surveillance Participant Group. *Evaluation of E-test method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of Candida species infrequently isolated from blood.* J Clin Microbiol 2003; 41: 1087-1090.
46. Pfaller, J.B., Messer, S.A., Hollis, R.J., Diekema, D.J., Pfaller, M.A. *In vitro susceptibility testing of Aspergillus spp. Comparison of E-test and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs.* J Clin Microbiol 2003; 41: 1126-1129.
47. Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Diekema, D.J. *In vitro susceptibility of filamentous fungi: Comparison of E-test and reference M38-A microdilution methods for determining posaconazole MICs.* Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45: 241-244.
48. Matar, M.J., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, L., Rodríguez, J.R., Chen, E., Rex, J.H. *Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole.* Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1647-1651.
49. Rex, J.H., Pfaller, M.A., Galgiani, J.N. y cols., Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: Conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and Candida infections.* Clin Infect Dis 1997; 24: 235-247.
50. Lee, S.C., Fung, C.P., Huang, J.S. y cols. *Clinical correlates of antifungal macrodilution susceptibility test results for non-AIDS patients with severe Candida infections treated with fluconazole.* Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2715-2718.
51. Law, D., Moore, C.B., Denning, D.W. *Discrepancies associated with the measurement of itraconazole serum concentrations by bioassays.* J Antimicrob Chemother 1999; 44: 577-578.
52. Denning, D.W., Radford, S.A., Oakley, K.L., Hall, L., Johnson, E.M., Warnock, D.W. *Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of Aspergillus fumigatus infection.* J Antimicrob Chemother 1997; 40: 401-414.
53. Denning, D.W., Venkateswarlu, K., Oakley, K.L. y cols. *Itraconazole resistance in Aspergillus fumigatus.* Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1364-1368.
54. Denning, D.W. *Invasive aspergillosis.* Clin Infect Dis 1998; 26: 781-803.

55. Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L. *¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad?* Rev Iberoam Micol 2002; 19: 133-138.
56. Odds, F.C. *Personal opinion: Can antifungal sensitivity tests predict clinical treatment outcomes?* Rev Iberoam Micol 1997; 14: 83-84.
57. Rex, J.H., Pfaller, M.A. *Has antifungal susceptibility testing come of age?* Clin Infect Dis 2002; 35: 982-989.
58. Craig, W.A. *Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men.* Clin Infect Dis 1998; 26: 1-12.
59. Mouton, J.W., van Ogtrop, M.L., Andes, D., Craig, W.A. *Use of pharmacodynamic indices to predict efficacy of combination therapy in vivo.* Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2473-2478.
60. Rex, J.H., Pfaller, M.A., Walsh, T.J. y cols. *Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges.* Clin Microbiol Rev 2001; 14: 643-658.
61. Louie, A., Drusano, G.L., Banerjee, P. y cols. *Pharmacodynamics of fluconazole in a murine model of systemic candidiasis.* Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1105-1109.
62. Andes, D., van Ogtrop, M. *Characterization and quantitation of the pharmacodynamics of fluconazole in a neutropenic murine disseminated candidiasis infection model.* Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2116-2120.
63. Burgess, D.S., Hastings, R.W. *A comparison of dynamic characteristics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against Cryptococcus neoformans using time-kill methodology.* Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 38: 87-93.
64. Patterson, T.F. *Fungal susceptibility testing: Where are we now?* Transpl Infect Dis 2002; 4 (Suppl. 3): 38-45.
65. Andes, D., Marchillo, K., Stamstad, T., Conklin, R. *In vivo pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model.* Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1193-1199.
66. Andes, D., Marchillo, K., Stamstad, T., Conklin, R. *In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model.* Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3165-3169.
67. Andes, D., Marchillo, K., Coklin, R. y cols. *Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis.* Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 137-142.