

Original

Evaluación y utilidad de los métodos *E-test*[®] y *Neo-Sensitabs*[®] para estudiar la sensibilidad de las levaduras al fluconazol

E. Cantón¹, J. Pemán², M. Sastre¹, A. Valentín², M. Bosch² y A. Espinel-Ingroff³

¹Unidad de Microbiología Experimental del Centro de Investigación y

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ³VCU Medical Center, Richmond, Virginia, Estados Unidos

RESUMEN

Debido a su laboriosidad, ninguno de los métodos de dilución estandarizados es útil para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos de las levaduras en el quehacer diario de un laboratorio de microbiología clínica. Recientemente el CLSI ha estandarizado un método de difusión en disco, más rápido y asequible, para determinar la sensibilidad a fluconazol y voriconazol. Los objetivos del presente estudio fueron conocer: a) la utilidad de las tabletas Neo-Sensitabs[®] para determinar la sensibilidad al fluconazol en la práctica asistencial; b) si el método E-test[®] puede realizarse utilizando el medio de Mueller-Hinton con azul de metileno (MHAG-AM); y c) determinar la interacción del azul de metileno con el medio de cultivo RPMI. Se utilizaron 84 aislamientos procedentes de hemocultivo (25 C. albicans, 7 C. parapsilosis, 10 C. tropicalis, 12 C. glabrata, 7 C. krusei, 4 C. lusitaniae y 19 C. neoformans). Con los medios que contienen azul de metileno, la lectura de los resultados fue más fácil al desaparecer el efecto trailing. Con las tabletas Neo-Sensitabs[®], en el medio MHAG-AM se comete el menor porcentaje de errores, y en el RPMI con glucosa el mayor. Con ambos métodos de difusión y medios de cultivo, los errores muy graves se observaron con C. albicans, C. tropicalis (sólo con Neo-Sensitabs[®]) y C. glabrata. En los medios suplementados con un 2% de glucosa el porcentaje de resistencia fue menor. El método Neo-Sensitabs[®] puede utilizarse para detectar cepas sensibles al fluconazol; sin embargo, se necesitan más estudios antes de recomendar su uso para la detección de aislamientos resistentes. En caso de utilizar este método, el punto de corte a aplicar para definir la resistencia debería ser ≥ 17 mm.

Palabras clave: Sensibilidad - Fluconazol - Método M44-A - Neo-Sensitabs[®] - E-test[®]

Evaluation and utility of the E-test[®] and NeoSensitabs[®] methods in studying fluconazole yeast susceptibility

SUMMARY

Standardized broth dilution methods are cumbersome for routine use in a clinical laboratory to study antifungal yeast susceptibility. Recently, the CLSI has standardized a disk diffusion method faster and more suitable to study fluconazole and voriconazole susceptibility. The objectives of the present study were to determine: a) the suitability of the Neo-Sensitabs[®] tablets to study fluconazole susceptibility; b) whether Mueller-Hinton agar with methylene blue (MHAG-AM) could be used in the E-test[®] method; and c) the interaction of the methylene blue with RPMI medium. A total of 84 blood stream yeast isolates were used (25 C. albicans, 7 C. parapsilosis, 10 C. tropicalis, 12 C. glabrata, 7 C. krusei, 4 C. lusitaniae and 19 C. neoformans). The methylene blue makes sharper inhibition zones both in MHAG-AM and RPMI media. With fluconazole Neo-Sensitabs[®] tablets, the lowest percentage of very major errors was found in MHAG-AM and the greatest in RPMIG. In both diffusion methods and culture media, the very major errors were found in C. albicans, C. tropicalis (only with Neo-Sensitabs[®]) and C. glabrata. The percentage of fluconazole-resistant strains was lower in the media that contained glucose (2%). Neo-Sensitabs[®] tablets are a reliable alternative to the dilution methods to detect fluconazole susceptibility. In the case of resistance, more studies are required; nevertheless, inhibition zone ≥ 17 mm should be applied to define fluconazole resistance.

Key words: Susceptibility - Fluconazole - M44-A method - Neo-Sensitabs[®] - E-test[®]

INTRODUCCIÓN

La incidencia de infecciones sistémicas causadas por levaduras sigue creciendo en todo el mundo, independientemente del tipo y el tamaño de los hospitales y de la edad de los pacientes (1). Aunque *Candida albicans* sigue siendo la especie más aislada en la mayoría de los países, otras especies, como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* o *Candida glabrata*, se están aislando cada vez con mayor frecuencia como causa de infecciones profundas o sistémicas.

Por otra parte, existen marcadas diferencias geográficas tanto en la distribución de las especies aisladas como en su sensibilidad a los antifúngicos, por lo que es conveniente una vigilancia epidemiológica continuada para supervisar la posible aparición de especies emergentes y de nuevas resistencias (2).

Desde la introducción, en la pasada década, del fluconazol como tratamiento de elección de la mayoría de las candidemias y otras infecciones profundas por levaduras, su uso se ha generalizado y ha aumentado la preocupación sobre el posible desarrollo de resistencias. Aunque la aparición de resistencias secundarias al fluconazol ya ha sido documentada en la candidiasis orofaríngea de pacientes VIH positivos (3), en los individuos inmunocompetentes es más infrecuente. Además de monitorizar periódicamente la sensibilidad a los antifúngicos de las levaduras aisladas de muestras profundas en cada institución para detectar la posible aparición de resistencias, también se recomienda realizar estos estudios en todas las especies emergentes e infrecuentes, ya que los datos sobre la sensibilidad de éstas son más escasos.

Para facilitar la comparación de los resultados obtenidos por cada laboratorio, los estudios de sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos se estandarizaron ya hace años, tanto por el *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, antes NCCLS) americano (4) como por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) europeo (5); sin embargo, debido a su laboriosidad, ninguno de los diferentes métodos propuestos por estas entidades es útil para realizarlo habitualmente en un laboratorio de microbiología clínica.

Recientemente el CLSI ha estandarizado un método de difusión en disco (documento M44-A) para determinar la sensibilidad al fluconazol y al voriconazol (6). Este método es más rápido que el de dilución M27-A2 (4) y más asequible para los laboratorios clínicos. Utiliza como medio de cultivo agar Mueller-Hinton suplementado con un 2% de glucosa y 0,5 µg/l de azul de metileno, consiguiendo un crecimiento más rápido de las levaduras por acción de la glucosa y unos halos de inhibición más nítidos y fáciles de leer gracias al azul de metileno.

Los objetivos del presente estudio fueron conocer: a) la utilidad de las tabletas de fluconazol para determinar la sensibilidad a éste en la práctica asistencial; b) si el método *E-test*[®] puede realizarse utilizando el medio de Mueller-Hinton suplementado con glucosa y azul de metileno; y c) determinar la interacción del azul de metileno con el medio de cultivo RPMI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamientos

Se utilizaron 84 aislamientos procedentes de hemocultivos (25 *C. albicans*, 7 *C. parapsilosis*, 10 *C. tropicalis*, 12 *C. glabrata*, 7 *Candida krusei*, 4 *Candida lusitanae* y 19 *Cryptococcus neoformans*). De cada especie se eligió un lote de aislamientos en los que se repitieron los ensayos dos veces en el mismo día y dos veces en diferente día, con el fin de estudiar la reproducibilidad del método.

Métodos de difusión

Neo-Sensitabs[®]

Se siguieron las especificaciones del CLSI, documento M44-A (6), utilizando tabletas de fluconazol de 25 µg (*Neo-Sensitabs*[®], Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Dinamarca) y tres medios de cultivo: 1) agar de Mueller-Hinton suplementado con un 2% de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno (MHAG-AM; Izasa, Barcelona, España); 2) agar RPMI suplementado con un 2% de glucosa (RPMIG; Izasa); 3) agar RPMI suplementado con un 2% de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno (RPMIG-AM). El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 horas en agar de Sabouraud glucosa (Difco) tocando 3-5 colonias, suspendiéndolas en solución salina y ajustándola a una concentración del 0,5 de la escala de McFarlan (10⁶ UFC/ml) con un espectrofotómetro (λ, 550 nm). Las placas se sembraron mojando una torunda de algodón en esta suspensión y extendiéndola uniformemente en la placa con ayuda de un rotor (*Retro C80*, AB Biodisk, Solna, Suecia), y se incubaron a 35 °C durante 24 horas. El diámetro de inhibición (mm) se midió en el punto donde se observó una reducción importante del crecimiento.

E-test[®]

Se utilizaron tiras de fluconazol (AB Biodisk, Solna, Dinamarca). Los medios de cultivo, preparación del inóculo, siembra, incubación y el criterio de lectura de las placas se realizaron como en el método *Neo-Sensitabs*[®].

Con el fin de reducir la variabilidad de la técnica, los ensayos se hicieron en paralelo en los tres medios de cultivo y utilizando el mismo lote. La lectura de las placas se hizo de forma ciega, es decir, sin conocer el resultado obtenido con los otros métodos y medios de cultivo.

En todos los ensayos se incluyeron las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 como controles de calidad. Los puntos de corte aplicados para la clasificación de los aislamientos y la categorización de los resultados se establecieron de acuerdo con los documentos del CLSI, tanto para *Candida* spp. como para *C. neoformans* (4, 6).

Análisis de los datos

Para cada método y especie se calculó el intervalo de concentraciones y la media geométrica de la CMI, el intervalo y la media aritmética del diámetro de inhibición, el porcentaje de cepas sensibles (S), el de sensibles dependiendo de la dosis (SDD) y el de resistentes (R), la concordancia entre los métodos en la categorización de los resultados y los errores cometidos en la categorización. Se consideró error muy grave cuando un aislamiento era R por el método de referencia M27-A2 y S por el de difusión; error grave cuando era S por el método de referencia y R por el de difusión; y error leve cuando era SDD o R por uno de los métodos y R o SDD por el otro, o S según un método y SDD según el otro. Así mismo, se calculó la recta de regresión entre el método de referencia y los de difusión en cada medio de cultivo, enfrentando los diámetros de inhibición a sus respectivas CMI. Para determinar la bondad del ajuste se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se indican los diámetros de inhibición observados en cada medio de cultivo para las cepas control de calidad y las CMI obtenidas por el método *E-test*[®] en los tres medios de cultivo, así como el número de veces que se han realizado. No hubo diferencias significativas entre los medios de cultivo en los diámetros de inhibición, y tuvieron el mismo intervalo que los referenciados en el documento M44-A utilizando discos de fluconazol. Las CMI para *C. parapsilosis* ATCC 22019 obtenidas por los dos medios con azul de metileno son más elevadas que con el medio recomendado por la casa comercial (RPMIG).

En la Tabla 2 se resumen, para cada especie ensayada, método y medio de cultivo, el número de determinaciones, el intervalo y la media geométrica de la CMI, el intervalo y la media aritmética del diámetro de inhibición, el porcentaje de determinaciones S, SDD y R, y el porcentaje de errores en la clasificación de los aislamientos. En total se obtuvieron 208 datos por el método de referencia (M27-A2); por *E-test*[®] 191 en medio MHAG-AM, 177 en RPMIG y 152 en RPMIG-AM; y por *Neo-Sensitabs*[®] 147 en medio MHAG-AM, 95 en RPMI y 94 en RPMIG-AM (Tabla 2).

Por el método de referencia (M27-A2), el porcentaje de resistencias es ligeramente más elevado que el hallado con los métodos de difusión, lo cual puede deberse, además de al diferente método, al elevado contenido de glucosa (2%) de los medios utilizados. Ésta es una constante que también se observa cuando se compara el método de referencia con otros métodos de microdilución con elevado contenido de glucosa (EUCAST y *YeastOne*[®]) (7-10).

Espinel-Ingroff y cols. (11) determinaron la correlación ($R = 0,89$) entre los diámetros obtenidos con los discos de

Tabla 1. Valores obtenidos para las cepas control de calidad por los dos métodos de difusión ensayados.

Especie	Método	Medio cultivo (N°)	Mínimo	Máximo	Promedio	DE
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>E-test</i> [®] (mg/l)	MHAG-AM (8)	48	256	160	103,69
		RPMIG (8)	32	256	118	92,88
		RPMIG-AM (4)	64	192	112	61,28
	Difusión tableta (mm)	MHAG-AM (5)	11,10	13,5	9	2,13
		RPMIG (3)	12,33	16	9	3,51
		RPMIG-AM (3)	13	15	9	3,46
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>E-test</i> [®]	MHAG-AM (12)	3	8	5,4	21,98
		RPMIG (9)	1	3	1,89	0,74
		RPMIG-AM (7)	2	4	3,29	0,95
	Difusión tableta	MHAG-AM (10)	23,6	35,2	28,86	4,37
		RPMIG (3)	28	33,5	29,97	3,07
		RPMIG-AM (3)	26,6	32	28,63	2,94

N°: número de determinaciones; DE: desviación estándar.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos con cada especie y método ensayado.

Especie	Método	Medio cultivo (Nº)	Intervalo	Media	Categoría (%)				Errores (%)				Concordancia (%)
					S	SDD	R	Muy graves	Graves	Leves			
<i>C. albicans</i>	M27-A2	RPMI (61)	0,12-256	0,68	88,52	0	11,48						
	<i>E-test</i> ®	MHAG-AM (60)	0,38-256	2,18	96,72	1,64	1,64	9,84	1,64	1,64			96,721
		RPMIG (60)	0,125-256	1,18	91,67	1,67	6,67	6,67	3,33	1,67			93,333
		RPMIG-AM (49)	0,19-48	1,38	93,88	4,08	2,04	6,12	2,04	4,08			87,755
Difusión tableta	MHAG-AM (44)	19-35,3	30,19	100	0	0	2,27	0	0			97,7	
	RPMIG (32)	23-38,3	30,09	100	0	0	3,17	0	0			96,88	
	RPMIG-AM (32)	12-38,5	31,06	100	0	0	3,13	0	0			96,88	
<i>C. parapsilosis</i>	M27-A2	RPMI (25)	0,25-2	1,03	100								
	<i>E-test</i> ®	MHAG-AM (23)	1-8	3,16	100	0	100	0	0	0			100
		RPMIG (17)	0,75-4	1,57	100	0	100	0	0	0			100
		RPMIG-AM (15)	1-4	1,93	100	0	100	0	0	0			100
Difusión tableta	MHAG-AM (20)	23,6-43	31,18	100	0	0	0	0	0			100	
	RPMIG (8)	28-43	33,61	100	0	0	0	0	0			100	
	RPMIG-AM (8)	22-38	30,61	100	0	0	0	0	0			100	
<i>C. tropicalis</i>	M27-A2	RPMI (35)	0,5-64	1,03	82,86	8,57	8,57						
	<i>E-test</i> ®	MHAG-AM (30)	0,19-256	7,76	81,25	0	12,50	0	3,13	9,38			86,67
		RPMIG (28)	0,094-256	0,6	96,67	0	3,33	0	0	10			89,29
		RPMIG-AM (20)	0,25-256	2,42	77,27	4,55	9,09	0	0	4,55			95
Difusión tableta	MHAG-AM (26)	14-35,5	28,15	100	0	7,69	7,69	0	0			92,31	
	RPMIG (12)	23-39	34,55	216,67	0	0	16,67	0	0			83,33	
	RPMIG-AM (12)	9-32	24,52	100	0	0	16,67	0	0			83,33	
<i>C. glabrata</i>	M27-A2	RPMI (42)	2-64	11,13	71,43	11,90	16,67						
	<i>E-test</i> ®	MHAG-AM (30)	2-48	7,52	76,67	16,67	6,67	16,67	6,67	26,67			50
		RPMIG (26)	1,5-128	11,14	38,46	46,15	15,38	7,69	15,38	42,31			76,92
		RPMIG-AM (26)	26-64	23,25	7,69	65,38	26,92	0	19,23	46,15			30,77
Difusión tableta	MHAG-AM (27)	16-31,4	22,42	81,48	18,52	0	3,70	0	29,63			66,67	
	RPMIG (10)	23-37	29,91	100	0	0	20	0	50			30	
		RPMIG-AM (10)	14-22	17,27	30	50	20	10	30			40	

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos con cada especie y método ensayado. (Continuación.)

Especie	Método	Medio cultivo (Nº)	Intervalo	Media	Categoría (%)				Errores (%)			
					S	SDD	R	Muy graves	Graves	Leves	Concordancia (%)	
<i>C. krusei</i>	M27-A2	RPMI (18)	64	64	0	0	100	0	0	0	0	94,44
	<i>E-test®</i>	MHAG-AM (18)	32-256	105,27	0	5,56	94,44	0	0	5,56	0	94,44
		RPMIG (18)	32-256	120,1	120,1	0	5,56	94,44	0	5,56	0	94,44
		RPMIG-AM (14)	32-192	66,43	66,43	0	7,14	92,86	0	7,14	0	94,44
	Difusión tableta	MHAG-AM (17)	9-26,9	14,09	14,09	5,88	23,53	70,59	5,88	0	23,53	76,47
RPMIG (10)		9-20	14,67	14,67	10	50	40	0	0	50	50	
RPMIG-AM (11)		9-21	15,52	15,52	18,18	54,55	27,27	10	0	50	36,36	
<i>C. lusitanae</i>	M27-A2	RPMI (8)	2-4	1,41	100	0	0	0	0	0	100	
	<i>E-test®</i>	MHAG-AM (8)	0,12-12	0,43	100	0	0	0	0	0	0	100
		RPMIG (7)	0,19-1,5	0,45	100	0	0	0	0	0	0	100
		RPMIG-AM (7)	0,19-8	0,72	100	0	0	0	0	0	0	100
	Difusión tableta	MHAG-AM (4)	20-46	36,5	36,5	100	0	0	0	0	0	100
RPMIG (4)		34-45,5	38,15	38,15	100	0	0	0	0	0	100	
RPMIG-AM (3)		20-39	32,33	32,33	100	0	0	0	0	0	100	
<i>C. neoformans</i>	M27-A2	RPMI (19)	0,06-32	1,61	94,74	5,26	0	0	0	0	31,58	
	<i>E-test®</i>	MHAG-AM (19)	2-32	12,7	26,32	73,68	0	0	0	73,68	42,11	
		RPMIG (19)	1,5-48	11,99	11,99	36,84	57,89	5,26	0	5,26	47,37	
		RPMIG-AM (19)	2-64	17,64	17,64	31,58	52,63	15,79	0	10,53	47,37	
	Difusión tableta	MHAG-AM (19)	9-37	26,37	26,37	94,74	0	5,26	0	11,11	11,11	89,47
RPMIG (19)		9-36	18,84	18,84	47,37	36,84	15,79	0	15,79	21,05	63,16	
RPMIG-AM (19)		17-37	26	26	94,74	5,26	0	0	0	5,26	89,47	
Total	M27-A2	RPMI (208)	0,06-64	2,24	66,83	4,33	28,85	0	0	0	80,63	
	<i>E-test®</i>	MHAG-AM (191)	0,12-256	5,24	64,40	10,99	24,61	5,76	2,09	14,14	84,75	
		RPMIG (177)	0,094-256	3,05	61,02	14,12	24,86	3,39	3,95	14,69	75	
		RPMIG-AM (152)	0,19-256	4,75	52,63	20,39	26,97	1,97	5,26	16,45	85,99	
	Difusión tableta	MHAG-AM (147)	9-46	26,6	26,6	85,99	5,73	8,28	4,76	0,68	8,84	76,04
RPMIG (95)		9-45,5	27,47	27,47	80	12,63	7,37	7,37	3,16	14,74	80,21	
		RPMIG-AM (94)	9-39	26,07	82,11	12,63	5,26	5,32	1,06	9,57		

Nº: número de determinaciones; S: sensibles; SDD: sensibles dependiendo de la dosis; R: resistentes.

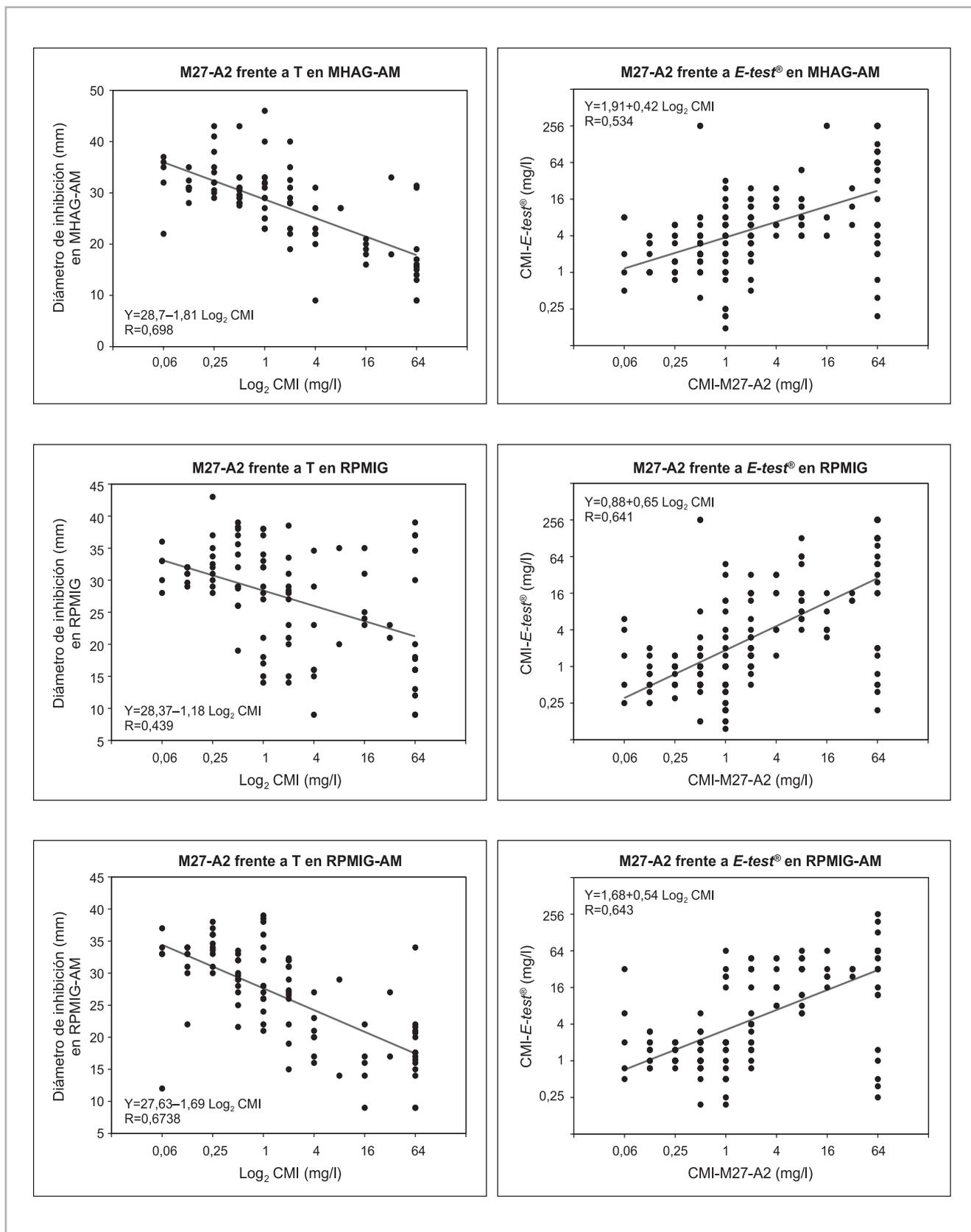


Figura 1. Correlación de los resultados obtenidos para fluconazol en tres medios de cultivo por los métodos de difusión Neo-Sensitabs® y E-test® con los obtenidos por el método de referencia M27-A2. (En la figura, T = tableta de 25 µg de fluconazol.)

fluconazol y con las tabletas *Neo-Sensitabs*®. Los halos de inhibición en el medio RPMIG y RPMIG-AM fueron mayores, en general, que en el medio MHAG-AM, aunque la diferencia sólo fue significativa para *C. glabrata* y *C. krusei* ($p < 0.05$). Con *Neo-Sensitabs*®, al igual que con el método M44-A, los errores en la clasificación de las cepas se cometieron generalmente en *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Con la cepa *C. tropicalis* ATCC 200956, resistente al fluconazol, *Neo-Sensitabs*® produjo unos halos de inhibición entre 14 y 17 mm en MHAG-AM, muy próximos al punto de corte ($R \geq 14$ mm); en los otros medios ensayados los halos fueron mayores y se clasificaron de acuerdo al criterio establecido. La diferencia de tamaño entre la tableta (9 mm) y el disco (6 mm) explicaría el porcentaje de errores cometidos en la clasificación, lo cual nos sugiere que con la tableta el punto de corte para definir la resistencia al fluconazol podría situarse en ≤ 17 mm; no obstante, se requiere ensayar más cepas resistentes para poder determinar este punto de corte.

Los aislamientos que fueron resistentes por el método de referencia (M27-A2) y sensibles por los de difusión se incluyeron en el estudio de reproducibilidad. Hay que destacar que estas cepas fueron sensibles por los métodos de difusión todas las veces que se repitió el ensayo; sin embargo, por el método de referencia algunos fueron sensibles a las 24 horas y resistentes a las 48 horas (*C. albicans* y *C. tropicalis*). Nuestros resultados son difíciles de comparar con los de otros investigadores; no obstante, los valores obtenidos con la tableta son del mismo orden que los publicados por otros autores con los discos (12-17).

Con el *E-test*® las CMI en el medio MHAG-AM fueron significativamente más elevadas ($p \leq 0.05$) que con el método de microdilución M27-A2, en todas las especies ensayadas excepto *C. albicans*; en cambio, en los medios RPMIG y RPMIG-AM la diferencia sólo fue significativa para *C. neoformans*. La concordancia por categorías y los errores en la clasificación dependen de la especie y son del mismo orden que los referidos por otros autores, tanto en el medio RPMIG (13, 18) como en MHAG-AM (12, 15, 19). Sólo se observaron errores muy graves en *C. albicans* (los tres medios) y *C. glabrata* (MHAG-AM y RPMI). Con respecto a la habilidad para detectar la resistencia, la cepa *C. tropicalis* ATCC 200956 fue clasificada como resistentes con los tres medios de cultivo utilizados.

En la Fig. 1 se representan las líneas de regresión, su ecuación y el coeficiente de correlación R de los resultados obtenidos con *E-test*® y con las tabletas *Neo-Sensitabs*®, en los tres medios de cultivo, con los obtenidos por el método de referencia (M27-A2). Con las tabletas, la mejor corre-

lación se obtuvo en los dos medios con azul de metileno ($R > 0,6$), y con *E-test*® en los medios con RPMI ($R > 0,6$), semejantes a los observados por otros autores en estos mismos medios (16, 17).

En resumen, se puede afirmar que en los medios que contienen azul de metileno la lectura de los resultados es más fácil puesto que se elimina el *trailing*. Con las tabletas, en el medio MHAG-AM es en el que se comete el menor porcentaje de errores, y en RPMIG el mayor. Los errores muy graves en los dos métodos de difusión y en los medios de cultivo se cometieron en *C. albicans*, *C. tropicalis* (sólo con *Neo-Sensitabs*®) y *C. glabrata*. En los medios con glucosa (2%) el porcentaje de resistencias es menor. El método *Neo-Sensitabs*® puede utilizarse para detectar cepas sensibles al fluconazol; sin embargo, se necesitan más estudios antes de recomendar su uso para la detección de aislamientos resistentes. En caso de utilizar este método, el punto de corte a aplicar para definir la resistencia debería ser ≤ 17 mm.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfaller, M.A., Pappas, P.G., Wingard, J.R. *Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends*. Clin Infect Dis 2006; 43 (Suppl. 1): S3-S14.
2. Pemán, J., Cantón, E., Calabuig, E. y cols. *Actividad in vitro de voriconazol frente a levaduras ante un nuevo punto de corte del patrón de resistencia*. Rev Esp Quimioterap 2006; 19: 21-33.
3. Sanglard, D., Odds, F.C. *Resistance of Candida species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences*. Lancet Infect Dis 2002; 2: 73-85.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania 2002.
5. Cuenca-Estrella, M., Moore, C.B., Barchiesi, F. y cols. *Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST)*. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 467-474.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast. Approved standard M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania 2004.
7. Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A. y cols. *Multicenter comparison of the sensitive 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.
8. Chryssanthou, E. *Trends in antifungal susceptibility among Swedish Candida species bloodstream isolates from 1994 to 1998: Comparison of the E-test and the Sensitive YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A reference method*. J Clin Microbiol 2001; 39: 4181-4183.

9. Cantón, E., Pemán, J., Bosch, M., Viudes, A., Gobernado, M. *Actividad in vitro de voriconazol sobre levaduras aisladas en hemocultivo determinada por dos métodos*. Rev Esp Quimioterap 2005; 18: 308-312.
10. Espinel-Ingroff, A., Barchiesi, F., Cuenca-Estrella, M. y cols. *International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of Candida spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole*. J Clin Microbiol 2005; 43: 3884-3889.
11. Espinel-Ingroff, A., Cantón, E., Gibbs, D.L., Wang, A. *Correlation of Neo-Sensitabs on three media with NCCLS reference disk diffusion and broth microdilution methods for testing the susceptibility of Candida spp. and Cryptococcus neoformans to fluconazole and voriconazole*. Clin Microbiol Infect 2005; 11 (Suppl. 2): 570-571.
12. Barry, A.L., Pfaller, M.A., Rennie, R.P., Fuchs, P.C., Brown, S.D. *Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, E-test, and disk diffusion methods*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1781-1784.
13. Morace, G., Amato, G., Bistoni, F. y cols. *Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of Candida species*. J Clin Microbiol 2002; 40: 2953-2958.
14. Matar, M.J., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, V.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.
15. Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Boyken, L., Messer, S.A., Tendolkar, S., Hollis, R.J. *Evaluation of the E-test and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of Candida glabrata to fluconazole and voriconazole*. J Clin Microbiol 2003; 41: 1875-1880.
16. Rubio, M.C., Gil, J., De Ocariz, I.R., 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.
17. Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L. y cols. *Evaluation of the NCCLS M44-P disk diffusion method for determining susceptibilities of 276 clinical isolates of Cryptococcus neoformans to fluconazole*. J Clin Microbiol 2004; 42: 380-383.
18. Martín-Mazuelos, E., Gutiérrez, M.J., Aller, A.I. y cols. *A comparative evaluation of E-test and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of Candida spp.* J Antimicrob Chemother 1999; 43: 477-481.
19. Girmenia, C., Pizzarelli, G., D'Antonio, D., Cristini, F., Martino, P. *In vitro susceptibility testing of Geotrichum capitatum: Comparison of the E-test, disk diffusion, and Sensititre colorimetric methods with the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3985-3988.