

Original

Utilidad del *E-test*[®] y sus condiciones de ensayo en el estudio de la interacción de los antifúngicos. Estudio piloto

E. Cantón, J. Pemán, M. Romero y M. Gobernado

*Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación y Servicio de Microbiología,
Hospital Universitario La Fe, Valencia*

RESUMEN

Se presentan los datos preliminares de un estudio piloto para determinar la utilidad del *E-test*[®] en el estudio de la interacción de los antifúngicos, evaluando las condiciones de ensayo y reproducibilidad. Los resultados se comparan con los obtenidos por el método del tablero de ajedrez y por el de curvas de mortalidad-tiempo. Los ensayos se realizaron con una cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028). Las tiras de *E-test*[®] se combinaron en proporción directa, CMI-CMI y en proporción inversa. Los resultados muestran que el método es reproducible, fácil de realizar y que puede ser adecuado para estudiar la interacción in vitro de los antifúngicos sobre las levaduras. La combinación de las tiras en proporción directa e inversa parece la más adecuada. En la predifusión se debe utilizar el antifúngico más soluble en agua. El tiempo de predifusión aconsejable es de una hora para los antifúngicos solubles en agua y dos horas para los insolubles. El *E-test*[®] tiene buena correlación con las curvas de mortalidad-tiempo; no obstante, se requieren estudios de correlación in vivo para poder determinar la utilidad de los resultados in vitro y el método más adecuado para medirla.

Palabras clave: Interacción antifúngicos - Sinergismo antifúngicos - Antagonismo antifúngicos - *E-test*[®] - Curvas de letalidad - M27-A2

Usefulness of the E-test[®] and its assay conditions in the study of the interaction of antifungal agents. A pilot study

SUMMARY

Preliminary data from a pilot study to assess the usefulness of the *E-test*[®] in the study of antimycotics are presented, evaluating assay and reproduction conditions. Results are compared with those obtained using the checkerboard method and mortality-time curves. Trials were carried out with a strain of *Candida albicans* (ATCC 90028). The *E-test*[®] strips were combined in direct proportion, MIC-MIC, and in inverse proportion. The results showed that the method can be reproduced, is easy to carry out and may be suitable for the study of the in vitro interaction of antimycotics on yeast. The directly and inversely proportionate strip combination appeared to be the most suitable. At the prediffusion stage, the most highly water-soluble antimycotic should be used. The recommended time for prediffusion is one hour for water-soluble antimycotics, and two hours for non-water-soluble ones. The *E-test*[®] showed good correlation with mortality-time curves. Nonetheless, in vivo correlation studies are required to determine the usefulness of the results in vitro and the most suitable method of measurement.

Key words: Antifungal agents interaction - Antifungal agents synergy - Antifungal agents antagonism - *E-test*[®] - Mortality curves - M27-A2

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las infecciones fúngicas es más complejo que el de las bacterianas, sobre todo en los pacientes inmunodeprimidos, debido al escaso número de antifúngicos disponibles, a los graves efectos adversos de algunos de ellos y a la progresiva aparición de resistencias, tanto en levaduras como en hongos filamentosos. Con el fin de paliar alguno de estos problemas se utilizan cada vez con más frecuencia las asociaciones de antifúngicos. Con ello se pretende ampliar el espectro de acción, reducir las dosis, acortar el tiempo de tratamiento, evitar la aparición de resistencias y sumar o potenciar la acción antifúngica. Sin embargo, desde el punto de vista microbiológico, en algunos casos la asociación de antifúngicos puede ser contraproducente, ya que es posible que algunos resulten antagonistas.

Para medir la actividad individual de los antifúngicos se dispone de métodos estándar, el M27-A2 (1) y el M38-A (2), pero para evaluar la interacción de antifúngicos no existe ningún método contrastado. Hasta la fecha, entre los métodos que se están aplicando para realizar estos estudios destacan el del tablero de ajedrez, en el cual se aplican la misma tecnología y parámetros que para la determinación de la CMI (1), y el de las curvas de letalidad. Ambos métodos son largos y difíciles de realizar, requieren personal especializado y mucho material. Además, el método M27-A2 tiene el inconveniente de que no detecta las cepas resistentes a la amfotericina B (1), uno de los antifúngicos más utilizados en la práctica clínica y de los pocos que se pueden combinar. Por otro lado, la interacción de los antifúngicos depende de la cepa; así, una misma combinación de antifúngicos puede ser sinérgica o antagonista (3-7). Por ello parece interesante y necesario evaluar nuevos métodos para el estudio de la asociación antifúngica *in vitro*, fáciles de realizar y reproducibles, con el fin de ayudar en la elección de la mejor combinación posible.

El *E-test*® es un método comercializado, sencillo y rápido, para determinar la sensibilidad a los antifúngicos, tanto de levaduras como de hongos filamentosos, que presenta una buena correlación con los métodos estándar M27-A2 y M38-A (8, 9). Además, se ha documentado que puede ser el método más adecuado para determinar la sensibilidad a la amfotericina B de las levaduras del género *Candida* (10), y también puede detectar la resistencia al itraconazol en los hongos filamentosos (11).

En el presente trabajo se presentan los datos preliminares de un estudio piloto cuyo objetivo es establecer la utilidad del *E-test*® para el estudio de la interacción de los antifúngicos, evaluando las condiciones de ensayo y su reproducibilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo

Todas las pruebas se realizaron sobre una cepa de *Candida albicans* ATCC 90028.

Actividad antifúngica individual

La CMI de amfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol y 5-fluorocitosina se determinó por el método *E-test*® (AB Biodisk, Solna, Suecia) (12), siguiendo las indicaciones del fabricante. El medio utilizado fue agar de RPMI 1640 con un 2% de glucosa (AES Laboratories, Combourg, Francia). Las tiras de *E-test*® y las placas de agar RPMI (9 cm de diámetro) fueron suministradas por IZASA (Barcelona, España). La lectura de la CMI se realizó a las 24 y 48 horas de incubación.

Actividad antifúngica combinada

La actividad de las asociaciones de antifúngicos se determinó por el método de difusión y por el método de dilución-difusión que combina el de dilución en agar con el *E-test*®. Las asociaciones de antifúngicos ensayadas fueron itraconazol más amfotericina B, 5-fluorocitosina más amfotericina B, fluconazol más amfotericina B, voriconazol más amfotericina B y 5-fluorocitosina más fluconazol. El antifúngico citado en primer lugar es el que se retiró después del tiempo de difusión.

Método de difusión (*E-test*®)

El medio de cultivo utilizado fue el mismo que para la CMI. El inóculo se preparó a partir de un crecimiento de 24 horas en agar de Sabouraud glucosa, tocando con el asa de cultivo 2-4 colonias de 2 mm de diámetro y resuspendiendo en suero fisiológico. La suspensión se ajustó a 0,5 unidades de turbidez de la escala de McFarland con un espectrofotómetro de 530 nm de longitud de onda. Con esta suspensión estándar se inocularon las placas de RPMI con tres tipos de inóculo:

- 1) Siembra uniforme de la placa con 100 µl de la suspensión estándar con la ayuda de bolas de cristal.
- 2) Inundación de la placa con 5 ml de una dilución 1:5 de la suspensión estándar, que se mantuvo durante un minuto para que las células impregnaran la superficie de la placa y posteriormente se retiró el exceso de líquido con un aspirador de vacío o una pipeta.

- 3) Siembra de la placa con un hisopo de algodón previamente introducido en la suspensión estándar (el exceso de líquido del hisopo se retiró rozando éste con las paredes del tubo). El hisopo se deslizó por toda la superficie de la placa, posteriormente se rotó 60° y se volvió a deslizar; esta maniobra se repitió dos veces.

Las placas inoculadas se dejaron secar a temperatura ambiente o en estufa a 35 °C durante 15 minutos y se aplicaron las tiras de antifúngico. Para cada asociación de antifúngicos se utilizaron dos placas (9 cm de diámetro), una para determinar la CMI de los antifúngicos individualmente y la otra para la CMI de los antifúngicos combinados.

Aplicación de las tiras de E-test®

La tira de *E-test*® del primero de los antifúngicos asociados (A) se aplicó sobre la superficie del agar, después de inoculada y seca la placa. Posteriormente se comprobó que toda la superficie de la tira estaba en contacto con el agar y que no existían burbujas de aire. Las placas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante un tiempo predeterminado (una, dos o tres horas) para comprobar si el tiempo de difusión influye en los resultados. Transcurrido el tiempo fijado se retiró la tira de *E-test*®, marcando previamente el lugar donde estaba la tira, y se aplicó la tira del segundo antifúngico (B) (Fig. 1). Las placas se incubaron durante 48 horas a 35 °C. La lectura de las CMI se realizó a las 24 y a las 48 horas.

Combinaciones de las tiras de E-test®

Las tiras de *E-test*® se combinaron de distintas formas:

- 1) En el mismo sentido, es decir, la tira del segundo antifúngico (B) se sitúa en la misma dirección que la del primero (A). En esta posición los antifúngicos están en

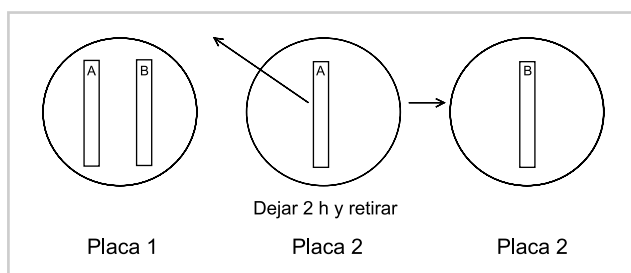


Figura 1. Método *E-test*® para determinar la interacción de los antifúngicos. Placa 1: se determina la CMI de los antifúngicos individualmente. Placa 2: se deja difundir el antifúngico A (dos horas), posteriormente se retira y se sobrepone la tira del antifúngico B.

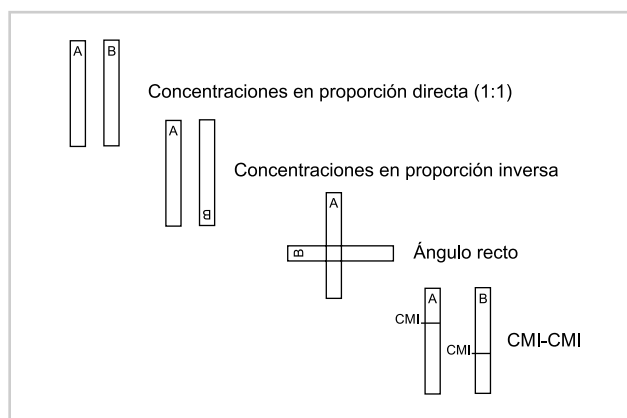


Figura 2. Esquema de las combinaciones de las tiras de *E-test*®.

la proporción 1:1 si ambos tienen la misma escala de concentraciones.

- 2) En sentido inverso, de modo que la concentración más elevada del antifúngico A coincide con la concentración más baja del B.
- 3) Coincidiendo ambas CMI, para lo que se requiere conocer previamente la CMI de los antifúngicos y marcar en la placa el lugar donde se encuentra.
- 4) En ángulo recto o cruz, en cuyo caso también debe conocerse previamente la CMI de los antifúngicos y cruzar las tiras por la CMI de éstos (Fig. 2).

Método de dilución-difusión

Por este método se estudió la interacción de terbinafina con fluconazol, itraconazol, voriconazol, 5-fluorocitosina y amfotericina B. Se prepararon placas de RPMI con 1 mg/l de terbinafina y, sobre ellas, se colocaron las tiras de *E-test*® de los antifúngicos.

Curvas de letalidad

Se realizaron siguiendo el método descrito previamente (13), ensayando los antifúngicos, solos o en combinación, a las concentraciones y pares que se exponen en la Tabla 1.

Interpretación de los resultados

Los criterios seguidos para definir la interacción fueron los recomendados por el fabricante:

- Efecto sinérgico: descenso de al menos tres diluciones en la CMI de la combinación con respecto a la CMI individual de cada antifúngico.

Tabla 1. Concentraciones de antifúngicos ensayadas.

Antifúngico	Concentraciones (mg/l)
Amfotericina B	8, 2, 1, 0,12, 0,06
5-Fluorocitosina	2, 0,12
Fluconazol	32, 2
Itraconazol	1, 0,5, 0,06, 0,03
Voriconazol	16, 0,25
Terbinafina	8, 2, 1
Combinaciones de antifúngicos	Concentraciones ensayadas
Amfotericina + itraconazol	8 + 0,03 2 + 0,03 0,06 + 0,5
Amfotericina + 5-fluorocitosina	0,12 + 1 1 + 0,12
Fluconazol + terbinafina	32 + 8 32 + 2 32 + 0,5 2 + 2
Itraconazol + terbinafina	1 + 1 0,06 + 1
Voriconazol + terbinafina	16 + 1 0,25 + 1

- Efecto aditivo: descenso de dos diluciones.
- Efecto indiferente: descenso de la CMI de la combinación menos de dos diluciones.
- Efecto antagonico: aumento de la CMI tres diluciones o más.

Todas las pruebas se repitieron tres veces, pero con la asociación de amfotericina B más itraconazol se hicieron nueve veces por ser los antifúngicos menos solubles de los ensayados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos no influyó el tipo de inoculación de las placas ni el tiempo de predifusión de los antifúngicos. Todos los métodos y las combinaciones estudiadas fueron reproducibles.

El intervalo de la CMI, su media geométrica y la CMI modal obtenidos para cada antifúngico por *E-test*® se detallan en la Tabla 2.

Azoles y amfotericina B

La combinación de los azoles con amfotericina B fue indiferente o antagonica. La CMI de amfotericina B au-

Tabla 2. Sensibilidad de *C. albicans* ATCC90028 determinada por *E-test*® o M27-A2.

Antifúngico	CMI (mg/l)		
	Intervalo	Moda	Media geométrica
Amfotericina B	0,12-0,25	0,25	0,18
Itraconazol	0,016-0,047	0,023	0,029
Fluconazol	0,25-0,75	0,38	0,39
Voriconazol	0,008-0,23	0,012	0,013
5-Fluorocitosina	1,5-4	2	2,17
Terbinafina**	>16	>16	>16

*Los datos son la media de nueve determinaciones. **Establecida según el método M27-A2.

mentó entre una y tres diluciones, dependiendo del azol empleado. El antagonismo fue sólo en una dirección, es decir, la CMI del azol no cambió en presencia de amfotericina B, y en cambio la de amfotericina B sí aumentó en presencia del azol. El antagonismo no sólo se detectó por un aumento de la CMI sino también por la forma de la elipse de inhibición. Por ejemplo, cuando se combinó itraconazol con amfotericina B en proporción directa la elipse fue muy estrecha, el diámetro de la zona de inhibición medido en la zona correspondiente a 32 mg/l de amfotericina B (la parte más ancha) pasó de 19-20 mm, con el antifúngico solo, a 9 mm en presencia de itraconazol (la tira de *E-test*® mide 5 mm de ancho) (Fig. 3). Cuando los antifúngicos se colocaron en posición inversa apareció una figura en punta de flecha con una elipse de inhibición igual de ancha que con amfotericina B sola (Fig. 4). Esto indica que el antagonismo entre el itraconazol y la amfotericina B depende de la concentración. Las concentraciones de itraconazol muy bajas (0,002-0,008 mg/l) no influyeron en la actividad de la amfotericina B (ancho de la elipse de inhibición igual al de la amfotericina B sola). A partir de 0,12 mg/l de itraconazol empieza a apreciarse el antagonismo con la amfotericina B. La significación del estrechamiento de la elipse de inhibición se desconoce, aunque puede estar relacionado con una disminución de la tasa de letalidad o velocidad con que la amfotericina B mata a las células, ya que las curvas de letalidad-tiempo realizadas combinando concentraciones elevadas y subinhibidoras de amfotericina B (8, 2 y 0,06 mg/l) con concentraciones de itraconazol superiores a la CMI (0,5 y 0,03 mg/l) así parecen indicarlo (Fig. 4). Por otro lado, las curvas de letalidad también muestran que la amfotericina B es menos letal en presencia de itraconazol, ya que cuanto mayor es la concentración de amfotericina B más letalidad pierde. Con 2 y 8 mg/l de amfotericina B, a

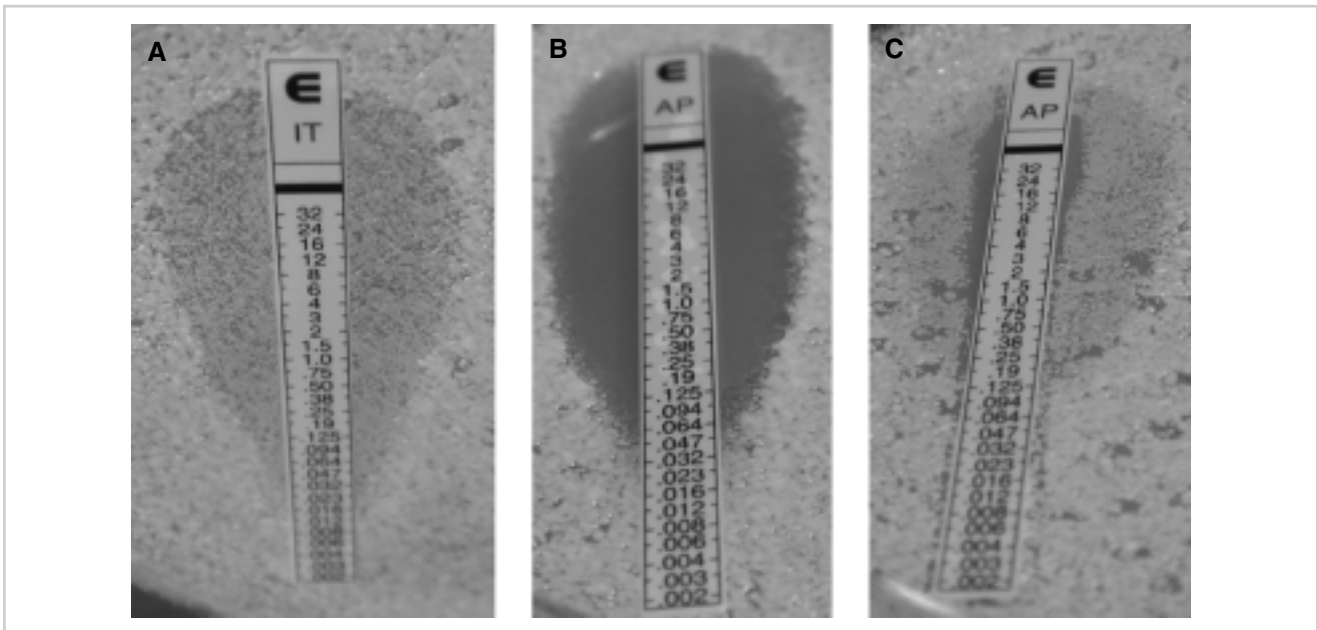


Figura 3. Antagonismo entre itraconazol y amfotericina B. Tiras en proporción directa. El itraconazol fue el antifúngico que se difundió (dos horas) y retiró.

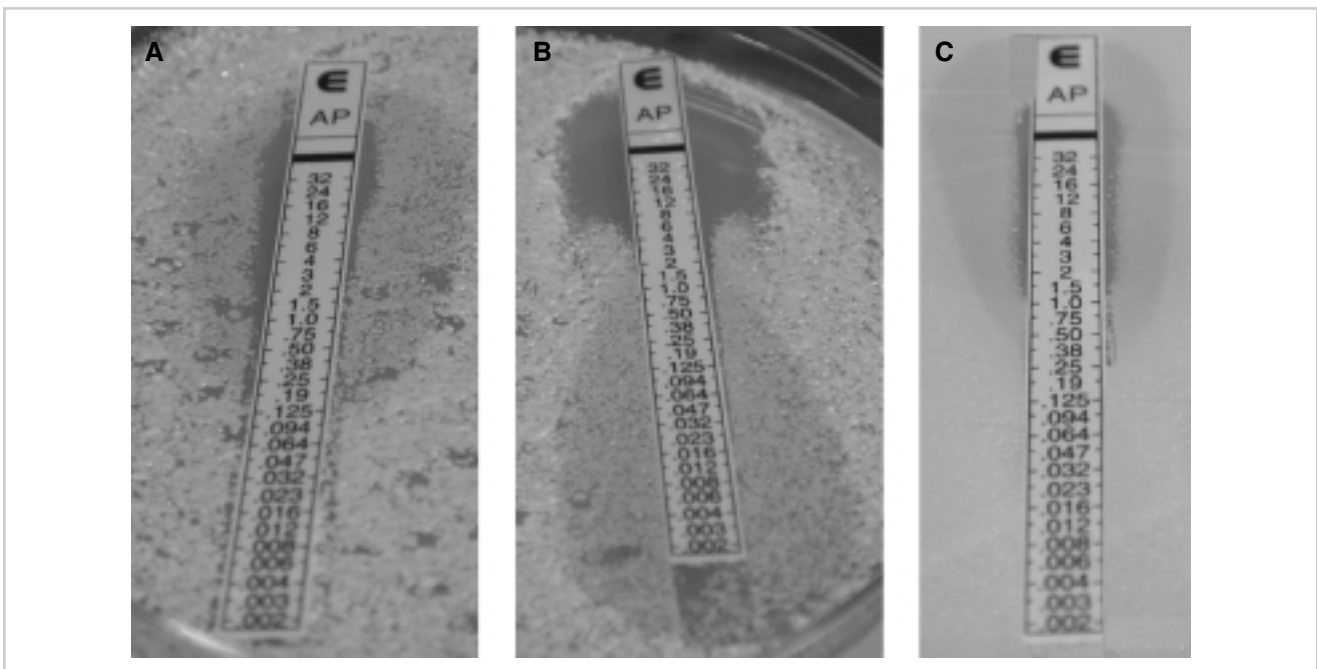


Figura 4. A: ejemplo del antagonismo del itraconazol y la amfotericina B cuando las tiras se colocan en diferentes posiciones. B: ejemplo del sinergismo entre la 5-fluorocitosina y la amfotericina B cuando las tiras se colocan en diferentes posiciones (directa, inversa y CMI-CMI).

las dos horas de incubación no quedan células viables, mientras que si se combina con 0,03 mg/l de itraconazol la tasa de letalidad disminuye y hay un recrecimiento después de 24 horas (Fig. 5A).

5-Fluorocitosina y amfotericina B

La interacción de 5-fluorocitosina y amfotericina B fue sinérgica (Fig. 6). En este caso también es en una sola dirección. La CMI de amfotericina B no cambió en presencia

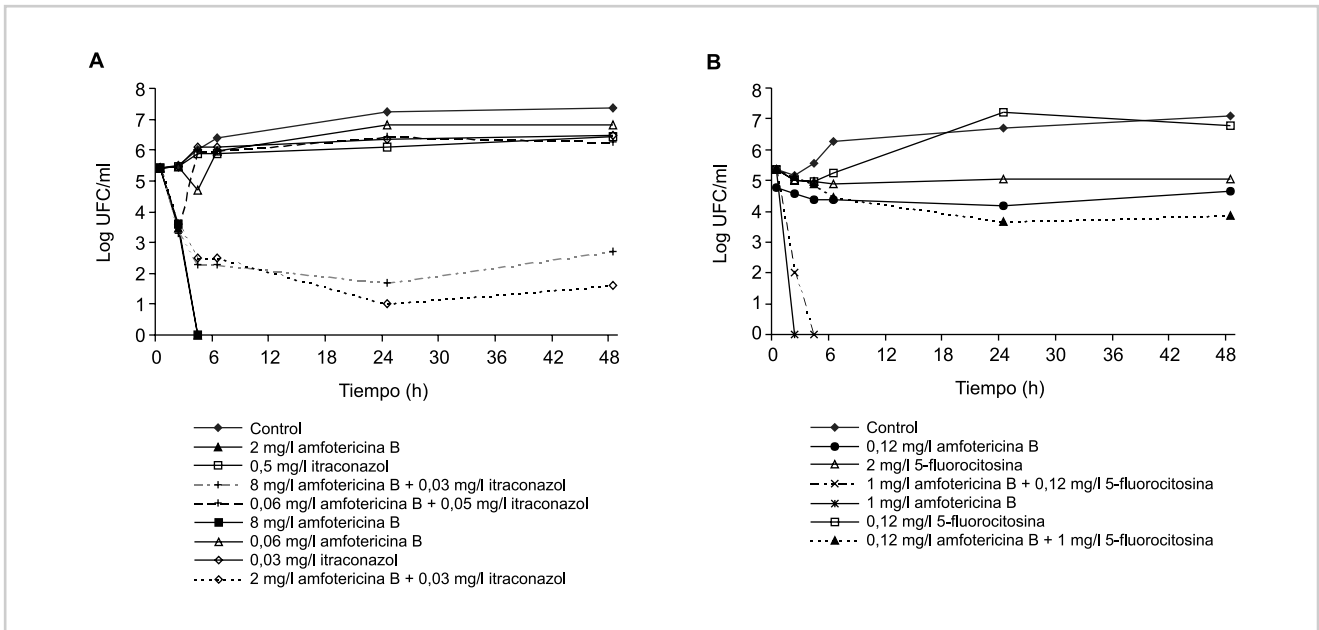


Figura 5. Curva de letalidad-tiempo de itraconazol y amfotericina B, solos y combinados, sobre *C. albicans* ATCC90028 (A), y de amfotericina B con 5-fluorocitosina (B).

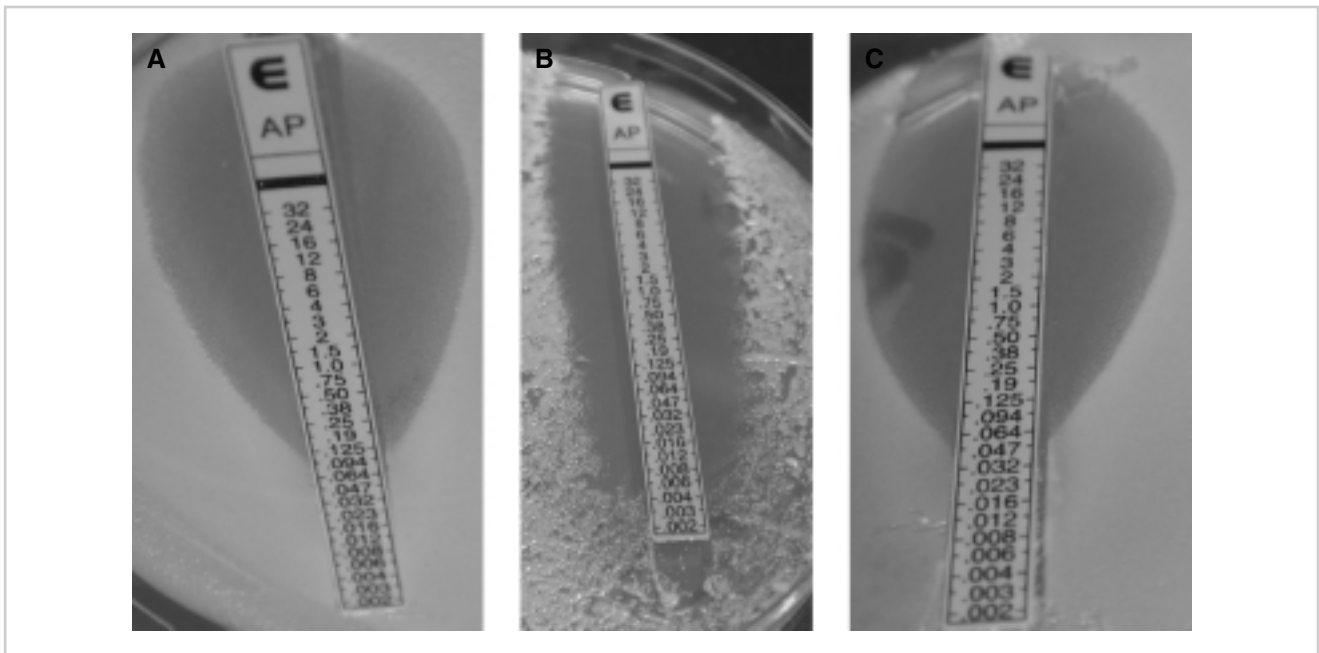


Figura 6. Sinergismo entre la 5-fluorocitosina y la amfotericina B. Tiras en proporción directa. La 5-fluorocitosina fue el antifúngico que se difundió (dos horas) y retiró.

de 5-fluorocitosina, pero la de 5-fluorocitosina bajó más de tres diluciones (de 2 mg/l a 0,25 mg/l) en presencia de amfotericina B. El sinergismo también se puede observar por el ancho de la elipse de inhibición. Mediante las curvas de mortalidad no se observó un aumento de la letalidad al com-

binar los antifúngicos; únicamente con la combinación de 0,12 mg/l de amfotericina B y 1 mg/l de 5-fluorocitosina a las 48 horas hay una diferencia de 0,76 log en las UFC/ml con respecto al antifúngico más letal (0,12 mg/l de amfotericina B) (Fig. 5B).

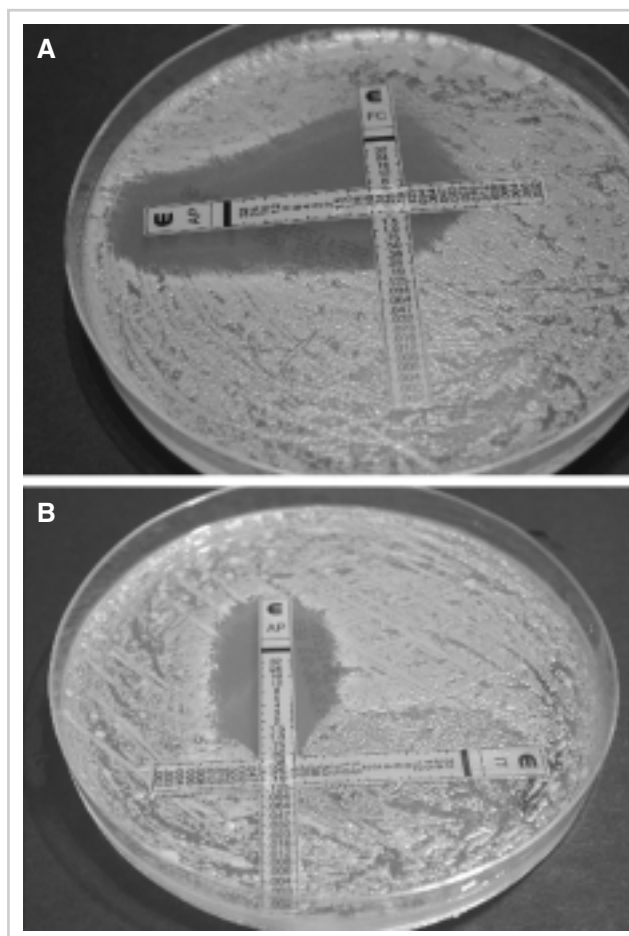


Figura 7. A: sinergismo entre la amfotericina B y la 5-fluorocitosina. B: antagonismo del itraconazol y la amfotericina B. Las tiras de *E-test*® se cruzan a la altura de la CMI de los antifúngicos.

Tanto en caso de sinergismo como de antagonismo, los resultados de la CMI de los antifúngicos combinados eran los mismos cuando las tiras se colocaban en proporción directa o CMI-CMI.

La Fig. 7 muestra el sinergismo entre 5-fluorocitosina y amfotericina B y el antagonismo entre itraconazol y amfotericina B cuando los antifúngicos se colocan en ángulo recto. En este caso la interpretación es más difícil y el antagonismo o sinergismo no se observa tan claramente como cuando las tiras se superponen. En caso de indiferencia, las elipses de inhibición deberían cortarse donde se cruzan las tiras de *E-test*®; en el sinergismo, las elipses de inhibición se cortan por debajo del cruce de las tiras, y en el antagonismo las elipses de inhibición se cortan antes del cruce.

Terbinafina y azoles

La combinación de terbinafina con los azoles fue sinérgica o indiferente. La CMI del azol se mantuvo igual o bajó

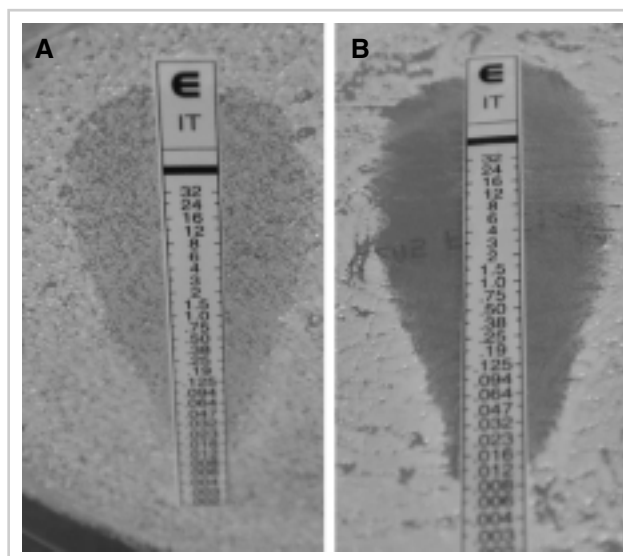


Figura 8. Interacción de la terbinafina y el itraconazol. La placa de RPMI agar contiene 1 mg/l de terbinafina. A: CMI de itraconazol. B: CMI de itraconazol en presencia de 1 mg/l de terbinafina.

una a tres diluciones, dependiendo del antifúngico; sin embargo, la reducción del crecimiento fue mayor en presencia de terbinafina (Fig. 8). Este sinergismo también se observó con las curvas de letalidad (Fig. 9). El fluconazol fue el azol que mayor inhibición del crecimiento produjo cuando se combinó con terbinafina. La inhibición aumentó al aumentar la concentración del azol, de la terbinafina o de ambos. Tanto los azoles como la terbinafina individualmente fueron fungistáticos (Fig. 9). Otros autores también han encontrado sinergismo o efecto aditivo, por el método del tablero de ajedrez, combinando terbinafina con azoles (14, 15).

Los resultados obtenidos por nosotros coinciden con los publicados por otros autores (16, 17), aunque ellos han evaluado la interacción con las tiras en proporción directa. Otros autores han estudiado la interacción de amfotericina B e itraconazol en *Aspergillus fumigatus* utilizando el método de dilución-difusión (18). Hasta la fecha, la colocación de las tiras de *E-test*® en ángulo recto sólo ha sido ensayada en bacterias (19). Al igual que Lewis y cols. (16), no hemos encontrado correlación entre el método *E-test*® y el del tablero de ajedrez, aunque en nuestro caso sólo se ha ensayado una cepa por los tres métodos. Basándonos en los resultados obtenidos con otras cepas por el método del tablero de ajedrez (datos no mostrados) podemos confirmar estos resultados. Cuando la amfotericina B es uno de los antifúngicos de la combinación, la correlación del *E-test*® con el método del tablero de ajedrez no es buena. Por el contrario, tiene mejor correlación con las curvas de letali-

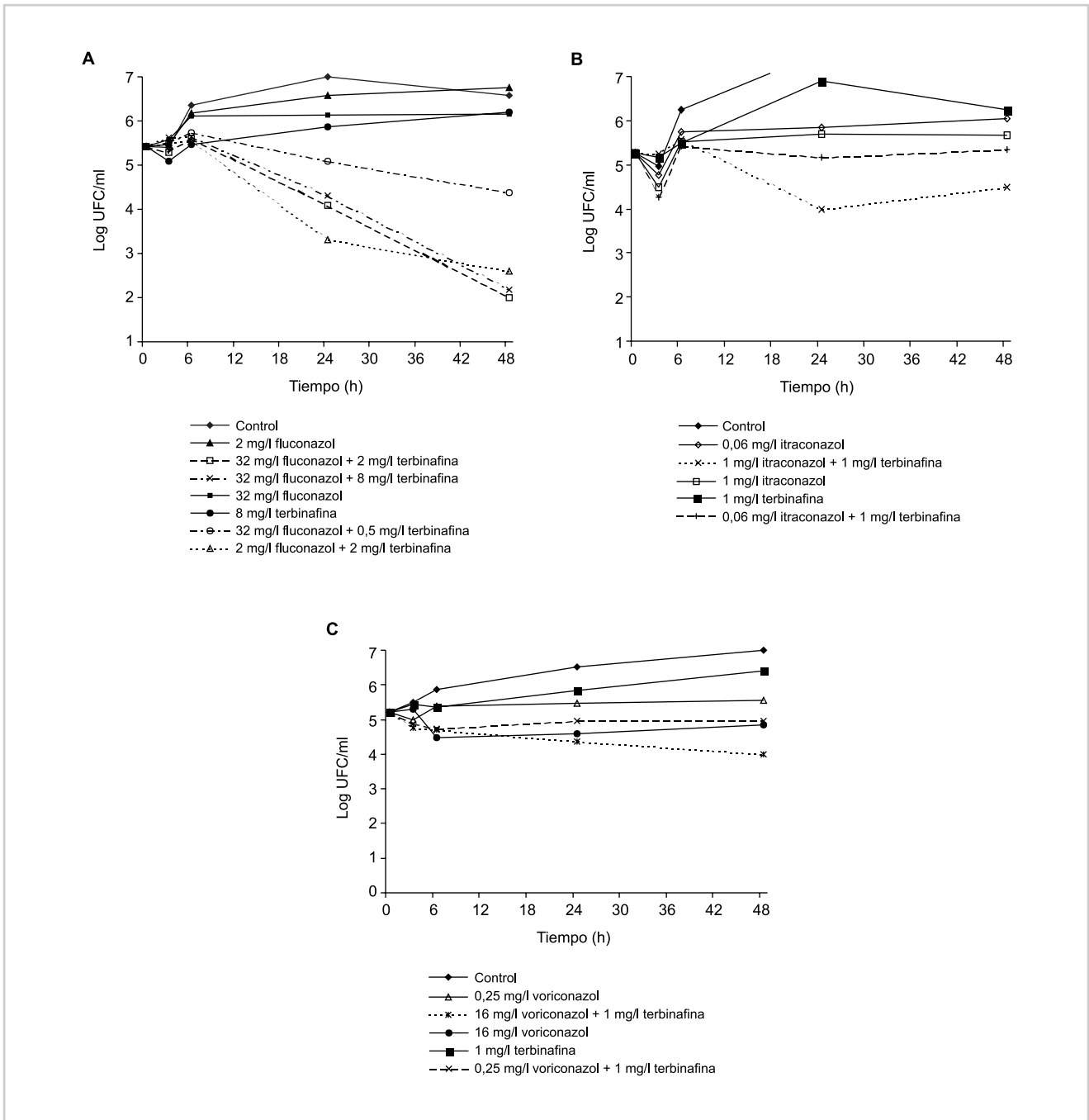


Figura 9. Curva de letalidad-tiempo de azoles y terbinafina, solos y combinados, sobre *C. albicans* ATCC90028. **A:** terbinafina más fluconazol. **B:** terbinafina más itraconazol. **C:** terbinafina más voriconazol.

dad-tiempo, lo cual coincide con Ernst y cols. (20), que también encuentran una buena correlación entre la CMI determinada por *E-test*® y las curvas de letalidad. La baja correlación hallada es lógica si se tiene en cuenta que el método de microdilución M27-A para determinar la sensibilidad a la amfotericina B no es adecuado para diferenciar las cepas sensibles de las resistentes (1, 10).

La utilidad clínica de los resultados obtenidos en los estudios de interacción están por determinar para los tres métodos (tablero de ajedrez, curvas de letalidad y *E-test*®).

En resumen, según nuestros datos y los de otros estudios preliminares (16-19), el *E-test*® es un método reproducible y fácil de realizar que puede ser adecuado para estudiar en el laboratorio la interacción de los antifúngicos

sobre las levaduras. Aunque no hay normas establecidas sobre qué antifúngico debe utilizarse en la predifusión, que dependerá de las propiedades de los antifúngicos a combinar, como el coeficiente de difusión, el tamaño de la molécula, el peso molecular, el mecanismo de acción, la solubilidad en agua y otros, consideramos, como norma general, utilizar en la predifusión el antifúngico más soluble en agua o el que difunde más rápidamente. El método de inoculación de la placa y el tiempo de difusión no influyen en los resultados. Dos horas parece un tiempo adecuado, sobre todo para los antifúngicos insolubles en agua, y una hora para los solubles. La utilización de las tiras en proporción directa e inversa parece lo más adecuado y fácil; además, tiene la ventaja de que puede hacerse el estudio sin conocimiento previo de las CMI de los antifúngicos, con lo cual el tiempo de ensayo se acorta y puede obtenerse una respuesta más rápida. No obstante, se requieren estudios de correlación *in vivo* para poder determinar la utilidad de los resultados *in vitro* y del método más adecuado para medirla.

Correspondencia: Dra. Emilia Cantón, Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avenida Campanar 21, 46009 Valencia. Tfno. 96 197 3111; e-mail: canton_emi@gva.es

BIBLIOGRAFÍA

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, approved standard—Second edition. NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2002.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: Approved standard M38-A. NCCLS, Wayne, Pa, USA, 2002.
- Barchiesi, F., Falconi Di Francesco, L., Scalise, G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1812-1814.
- Meletiadiis, J., Mouton, J.W., Meis, J.F., Verweij, P.E. *In vitro* drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 106-117.
- Viudes, A., Pemán, J., Cantón, F., López-Ribot, J., Gobernado, M. *Actividad de las asociaciones de antifúngicos sistémicos*. *Rev Esp Quimioterap* 2001; 14: 30-39.
- Te Dorsthorst, D.T., Verweij, P.E., Meletiadiis, J. y cols. *In vitro* interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2982-2989.
- Weig, M., Muller, F.M. *Synergism of voriconazole and terbinafine against Candida albicans isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 966-968.
- 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.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Mills, K., Bolmström, A. *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of E-test® and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3359-3361.
- Wanger, A., Mills K, Nelson, P.W., Rex, J.H. *Comparison of E-test® and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method for antifungal susceptibility testing: Enhanced ability to detect amphotericin B-resistant Candida isolates*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2520-2522.
- 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.
- Martín-Mazuelos, E., Cantón, E., Espinel-Ingroff, A. *Métodos alternativos a los procedimientos estándar publicados por el National Committee for Clinical Laboratory Standard*. En: Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., Rubio-Calvo, M.C. (Eds). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao 2001; 16.1-16.9.
- Cantón, E., Pemán, J. *Curvas de letalidad en antifúngicos*. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 82-85.
- Barchiesi, F., Di Francesco, L.F., Compagnucci, P., Arzeni, D., Giacometti, A., Scalise, G. *In-vitro* interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 59-65.
- Perea, S., González, G., Fothergill, A.W. y cols. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* with decreased susceptibility to azoles. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1831-1833.
- Lewis, R.E., Diekema, D.J., Messer, S.A. y cols. *Comparison of E-test, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against Candida species*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 345-351.
- Bertout, S., Lebecq, J.C., Bastide, J.M., Mallié, M. *Evaluation de l'activité antifongique in vitro des associations flucytosine-fluconazole et flucytosine-amphotéricine B sur diverses espèces de Candida*. *J Mycol Med* 2002; 12: 157-162.
- Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., Sagar, N. y cols. *Itraconazole-amphotericin B antagonism in Aspergillus fumigatus: An E-test®-based strategy*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2915-2918.
- White, R.L., Burgess, D.S., Manduryu, M., Bosso, J.A. *Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-killing, checkerboard, and E-test®*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1914-1918.
- Ernst, E.J., Yodoi, K., Roling, E.E., Klepser, M. *Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against Candida lusitanae determined by microdilution, E-test®, and time-kill methods*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 578-581.