

Original

Estudio de la actividad *in vitro* de caspofungina sobre especies de levaduras diferentes de *Candida albicans*, determinada por dos métodos: M27-A2 y EUCAST

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

Unidad de Microbiología Experimental y Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe,
Avda. Campanar 21, 46009 Valencia

RESUMEN

Se ha estudiado la actividad *in vitro* de caspofungina sobre 147 cepas de levaduras no *Candida albicans*, aisladas de hemocultivo, por dos métodos de microdilución en caldo: M27-A2 y EUCAST. Para todas se determinaron las concentraciones mínimas que produjeron una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ y del 100% (CMI_2 y CMI_0 , respectivamente) y una reducción del número de colonias viables $\geq 99\%$ respecto al inóculo inicial (CMF). Con ambos métodos la caspofungina muestra una buena actividad (CMI_2 y $\text{CMI}_0 \leq 2$ mg/l para el 90% de las cepas) sobre las especies estudiadas, incluidas aquellas que habitualmente son resistentes o que presentan un porcentaje elevado de resistencia a los azoles (*Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*). Sin embargo, la actividad fungicida es menor ($\text{CMF} \leq 2$ mg/l en el 73,47% de las cepas por el método M27-A2 y en el 62,59% por el EUCAST), sobre todo para *Candida guilliermondii* y *Candida parapsilosis*. Los dos métodos ensayados tienen buena correlación para la CMI y menor para la CMF. El acuerdo esencial y la concordancia (± 2 log) entre los dos métodos, para el total de las cepas probadas, fueron respectivamente: 73,47% y 93,20% para la CMI_2 , 74,8% y 91,84% para la CMI_0 , y 57,1% y 74,15% para la CMF. Por el método EUCAST las CMI suelen ser entre una y tres diluciones más bajas y las CMF son más elevadas que por el M27-A2.

Palabras clave: Caspofungina - Sensibilidad - Concentración mínima fungicida - *Candida no albicans* - M27-A2 - EUCAST

Study of *in vitro* activity of caspofungin on non-*Candida albicans* yeast strains determined by two methods: M27-A2 and EUCAST

SUMMARY

The *in vitro* activity of caspofungin against 147 non-*Candida albicans* yeasts isolated from blood culture was studied using two broth micro-dilution methods: M27-A2 and EUCAST. The minimum concentrations that produced a growth inhibition of $\geq 50\%$ and of 100% (MIC_2 and MIC_0 , respectively) and a reduction in the number of viable colonies $\geq 99\%$ versus the initial inoculum (MFC) were determined for all strains. Caspofungin demonstrated good activity (MIC_2 and $\text{MIC}_0 \leq 2$ mg/l for 90% of the strains) against the species studied, including those that are normally resistant or have a high percentage of azole resistance (*Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*). Nevertheless, the antifungal activity is lower ($\text{MFC} \leq 2$ mg/l in 73.47% of the strains with the M27-A2 method versus 62.59% with EUCAST), particularly for *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. The two methods tested demonstrated good correlation for the MIC and lower correlation for the MFC. Essential agreement and concordance (± 2 log) between both methods for all strains tested were: 73.47% and 93.20% for MIC_2 ; 74.8% and 91.84% for MIC_0 ; and 57.1% and 74.15% for MFC, respectively. MICs determined by the EUCAST method are one- to three-fold dilutions lower, while the MFC are higher than those obtained by the M27-A2 method.

Key words: Caspofungin - Susceptibility - Minimum fungicidal concentration - *Candida non-albicans* - M27-A2 - EUCAST

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha producido un considerable aumento de las infecciones sistémicas graves causadas por hongos, debido al incremento en el número de pacientes susceptibles a ellas como consecuencia de la mayor expectativa de vida en la población, la mayor facilidad para controlar la infección bacteriana y el estado de inmunodepresión en los receptores de órganos, los tratamientos antineoplásicos y las enfermedades autoinmunitarias. En este sentido, distintos hongos levaduriformes están emergiendo como patógenos, aunque *Candida albicans* sigue siendo la levadura aislada con mayor frecuencia (1, 2).

El tratamiento convencional de este tipo de infecciones ha consistido en el uso de antifúngicos que interactúan con la membrana por unión al ergosterol o bien inhiben la biosíntesis de esteroides.

La amfotericina B es un polieno que se une al ergosterol y que presenta actividad fungicida con un amplio espectro de acción, pero sus efectos adversos limitan su utilización, aunque las nuevas formulaciones liposomales los reducen en parte y permiten aumentar la dosis que puede ser administrada.

Los azoles actúan en el último paso de la biosíntesis del ergosterol por inhibición de la enzima lanosterol desmetilasa y son menos tóxicos que la amfotericina B. Esto ha favorecido su amplio uso, pese a la existencia de cepas intrínsecamente resistentes, y ha condicionado la aparición de cepas con resistencia adquirida. Además, muchas de las cepas resistentes presentan resistencia cruzada a todos los azoles, con la necesidad de terapias adicionales que tengan mecanismos de acción completamente distintos (3, 4).

Las equinocandinas son un nuevo grupo de antifúngicos que actúan inhibiendo la 1,3- β -glucano sintetasa. Esta enzima es la encargada de formar polímeros de glucano, componente esencial de la estructura de la pared fúngica, y además constituye una diana no compartida por las células de los mamíferos, evitando así los posibles efectos tóxicos. De este grupo de antifúngicos, el primero en comercializarse ha sido la caspofungina, un lipopéptido de uso parenteral, sintetizado a partir de un producto de fermentación de *Glarea lozoyensis*, que presenta buena actividad incluso frente a hongos que habitualmente son resistentes a otros antifúngicos (1-7).

El propósito de este estudio fue determinar la actividad *in vitro* de la caspofungina sobre especies de levaduras distinta de *C. albicans*. Aunque no existen métodos estándar para ello, se siguieron las recomendaciones del M27-A2 y el EUCAST (8-13), y se determinó también la concentración mínima fungicida (CMF).

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos

Se estudiaron 147 cepas de levaduras no *C. albicans* aisladas de hemocultivos, pertenecientes a 14 especies diferentes: 5 *Candida famata*, 34 *Candida glabrata*, 13 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida inconspicua*, 22 *Candida krusei*, 1 *Candida lambica*, 3 *Candida lusitanae*, 17 *Candida parapsilosis*, 42 *Candida tropicalis*, 1 *Candida sake*, 3 *Blastoschizomyces capitatus*, 1 *Pichia ohmeri*, 2 *Saccharomyces cerevisiae* y 2 *Yarrowia lipolytica*.

Las levaduras se identificaron con las tarjetas YEAST-ID® del sistema automatizado VITEK 2 (BioMerieux Inc.) y se mantuvieron en suspensión acuosa a temperatura ambiente. En el momento de la determinación de su sensibilidad se realizaron previamente dos siembras consecutivas en agar de Sabouraud glucosa (SDA). Como cepa control de calidad se empleó *C. krusei* ATCC 6258.

Preparación del antifúngico

Se partió de caspofungina en forma de polvo valorado, que se obtuvo por gentileza de los laboratorios Merck, Sharp & Dohme (Madrid) y se diluyó en agua destilada para obtener una solución inicial de 1280 mg/l. Se conservó en alícuotas a -70 °C hasta su utilización (menos de seis meses). Las concentraciones ensayadas fueron de 64 a 0,12 mg/l.

Estudio de la sensibilidad

Método M27-A2

La CMI se determinó siguiendo las indicaciones del NCCLS (8). Como medio de cultivo se utilizó RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Madrid) con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS, Sigma) 0,164 M y ajustado a pH 7 $\pm$ 0,1. Las concentraciones de antifúngico se elaboraron por el método de las diluciones dobles aditivas. El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 horas en SDA, resuspendiendo las levaduras en agua destilada y ajustando a una densidad óptica de 0,5 Mc Farland en un espectrofotómetro (530 nm) y con posterior dilución 1:1000 con RPMI (concentración final en las placas de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/ml). El tamaño del inóculo se comprobó mediante siembra de 10 μ l del pocillo control de crecimiento en SDA. Las placas se incubaron a 35 °C y se realizó lectura visual a las 48 horas.

Método EUCAST

El medio utilizado fue RPMI con un 2% de glucosa (RPMI 2%). El inóculo se ajustó entre $0,5 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^5$

UFC/ml. Las diluciones del antifúngico se realizaron por el método de diluciones dobles seriadas y la lectura de los resultados se realizó por espectrofotometría, transcurridas 24 horas de incubación a 35 °C (9-13).

Se definieron dos concentraciones mínimas inhibitorias, la CMI₂ y la CMI₀, que fueron las concentraciones de antifúngico que produjeron una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ y del 100%, respectivamente, en comparación con el crecimiento del pocillo control. Las CMI para ambos métodos se determinaron en paralelo.

Estudio de la actividad fungicida

La actividad fungicida se determinó según método descrito previamente (14). De todos los pocillos sin crecimiento de las placas de microdilución se sembraron, previa agitación, 100 μ l (método M27-A) o 10 μ l (método EUCAST) en placas de SDA, y tras incubación a 35 °C durante 48 horas se contaron las UFC/ml.

La CMF se definió como la concentración más baja de antifúngico que produjo una reducción del número de colonias viables $\geq 99\%$ con respecto al inóculo inicial.

Análisis de los datos

Con cada método se determinaron el intervalo y la media geométrica de la CMI₂, la CMI₀ y la CMF, la concentración que inhibe al 50% (CMI₂50, CMI₀50) y al 90% (CMI₂90, CMI₀90) de las cepas, y la CMF para el 50% y el 90% de las cepas (CMF50 y CMF90). Los valores fuera de escala (≥ 64 mg/l) se incluyeron en los cálculos como 64 mg/l.

Para la comparación entre los dos métodos se consideró el mismo resultado cuando la diferencia entre la CMI₂, la CMI₀ o la CMF era ≤ 2 diluciones logarítmicas en base 2. También se calculó el acuerdo esencial (± 1 log).

En muchas de las cepas se observó efecto paradójico (ligero crecimiento a concentraciones superiores a la CMI₀), previamente descrito para el grupo de las equinocandinas (15). Este efecto no se tuvo en cuenta al interpretar la CMI₀ ni la CMF si entre el primer pocillo negativo (CMI₀) y el pocillo con crecimiento a concentración superior a la CMI₀ (efecto paradójico) había más de tres diluciones.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se resumen los resultados de la actividad in vitro (CMI₂, CMI₀ y CMF) de la caspofungina obtenidos por los métodos M27-A2 y EUCAST. Por el método M27-

A2, la CMI₂ fue ≤ 2 mg/l para el 100% de las cepas. La CMI₀ sólo fue > 2 mg/l en el 8,16% de las cepas (cinco *C. guilliermondii*, una *C. krusei*, dos *C. parapsilosis*, una *C. famata* y dos *B. capitatus*). En estas cepas el valor más frecuente de CMI₀ fue 64 mg/l. La CMI₂ fue igual a la CMI₀ en el 51,02% de las cepas, y en el 6,8% hubo una diferencia entre ellas ≥ 3 diluciones, que se observó con mayor frecuencia en *C. guilliermondii* (38,46%) y *C. parapsilosis* (11,76%).

Por el método EUCAST las CMI fueron en general más bajas: la CMI₂ y la CMI₀ fueron ≤ 2 mg/l para el 100% y el 91,16% de las cepas, respectivamente. La CMI₀ fue igual a la CMI₂ en el 30,61% de las cepas y hubo una diferencia ≥ 3 diluciones en el 9,52% de ellas, con mayor frecuencia en *C. guilliermondii* (38,46%) y *C. parapsilosis* (17,65%).

La CMF de la caspofungina por el método M27-A2 fue ≤ 2 mg/l para el 73,47% de las cepas, aunque fue ≥ 64 mg/l en el 17,69%, sobre todo en *C. guilliermondii* (69,23%) y *C. parapsilosis* (41,18%). La CMF fue igual a la CMI₀ en el 73,83% de los casos y $\geq 8 \times$ CMI₀ en el 14,29%.

Por el método EUCAST la actividad fungicida de la caspofungina fue menor: la CMF fue ≥ 64 mg/l en el 23,13% y ≤ 2 mg/l en el 62,59% de los casos. Igual que ocurrió con el método M27-A2, los valores más altos fueron para *C. guilliermondii* (53,85%) y *C. parapsilosis* (64,71%). La CMF fue igual a la CMI₀ en el 58,5% y $\geq 8 \times$ CMI₀ en el 25,85%. Las especies que presentaron más cepas con valores de CMF $\geq 8 \times$ CMI₀ fueron *C. parapsilosis* (52,94%) y *C. glabrata* (29,41%), y en el 36,84% de las cepas del grupo misceláneo (una *C. famata*, tres *C. lusitaniae*, un *B. capitatus*, un *S. cerevisiae* y una *Y. lipolytica*).

El acuerdo esencial entre los métodos para la CMI₂ del total de las cepas estudiadas fue del 73,47%, oscilando entre el 94,12% en *C. parapsilosis* y el 59,1% en *C. krusei*. Para la CMI₀ fue del 74,8% (100% para *C. guilliermondii* y 55,9% para *C. glabrata*). La concordancia (± 2 log) entre los dos métodos fue superior al 90% tanto para la CMI₂ como para la CMI₀. Por especies, *C. parapsilosis* presentó los valores de concordancia más elevados (100% y 94,1%, respectivamente) y *C. tropicalis* los más bajos (90,48% y 85,7%). El acuerdo esencial en la CMF fue del 57,1% y la concordancia a ± 2 log más elevada se obtuvo con *C. krusei* (90,91%). En las otras especies osciló entre el 64,75% para *C. parapsilosis* y el 78,95% en el grupo misceláneo (Tabla 2).

La frecuencia con que se observó efecto paradójico (aparición de ligero crecimiento en alguno de los pocillos a concentraciones superiores a la CMI₀) se expone en la Tabla 3. Este efecto se produjo con los dos métodos, aunque con

Tabla 1. Actividad fungistática y fungicida de la caspofungina sobre 147 cepas de levaduras determinada por los métodos M27-A2 y EUCAST.

Especie (n)	Método	CMI ₂ (mg/l)				CMI ₀ (mg/l)				CMF (mg/l)			
		MG	Intervalo	50%	90%	MG	Intervalo	50%	90%	MG	Intervalo	50%	90%
<i>C. glabrata</i> (34)	M27-A2	0,65	0,25-2	0,5	2	1,47	0,5-2	2	2	2,40	0,5-≥64	2	≥64
	EUCAST	0,29	≤0,12-1	0,25	0,5	0,68	0,25-32	0,5	1	2,72	0,25-≥64	1	≥64
<i>C. guilliermondii</i> (13)	M27-A2	1,05	1-2	1	1	6,13	1-≥64	2	≥64	20,89	1-≥64	≥64	≥64
	EUCAST	0,90	≤0,12-2	1	2	5,81	0,5-≥64	4	≥64	9,90	0,5-≥64	≥64	≥64
<i>C. krusei</i> (22)	M27-A2	1,33	0,5-2	1	2	1,76	0,5-8	2	2	2,66	1-≥64	2	8
	EUCAST	0,48	0,25-1	0,5	1	1,37	0,5-2	1	2	1,82	0,5-≥64	2	2
<i>C. parapsilosis</i> (17)	M27-A2	1,63	1-2	2	2	2,89	1-≥64	2	≥64	9,81	2-≥64	4	≥64
	EUCAST	1,33	0,5-2	1	2	3,40	1-≥64	2	≥64	21,28	2-≥64	≥64	≥64
<i>C. tropicalis</i> (42)	M27-A2	0,62	≤0,12-2	0,5	1	0,89	0,5-2	1	1	1,24	0,5-≥64	1	2
	EUCAST	0,28	≤0,12-2	0,25	0,5	0,52	≤0,12-≥64	0,5	1	1,53	≤0,12-≥64	0,5	≥64
Miscelánea (19)	M27-A2	1,11	≤0,12-2	1	2	2,49	1-≥64	2	≥64	4,30	1-≥64	2	≥64
	EUCAST	0,57	≤0,12-2	1	1	1,44	≤0,12-≥64	1	≥64	5,76	0,25-≥64	8	≥64
Total (147)	M27-A2	0,89	≤0,12-2	1	2	1,72	0,5-≥64	2	2	3,10	0,5-≥64	2	≥64
	EUCAST	0,45	≤0,12-2	0,5	1	1,12	≤0,12-≥64	1	2	3,41	≤0,12-≥64	2	≥64

Media geométrica (MG), intervalo y mínima concentración que produce una inhibición del crecimiento ≥50% (CMI₂) o del 100% (CMI₀) o que es fungicida (CMF) para el 50% y el 90% de las cepas (50 y 90, respectivamente).

Tabla 2. Concordancia entre los métodos M27-A2 y EUCAST.

Especie (n)	Concordancia CMI ₂ (%)		Concordancia CMI ₀ (%)		Concordancia CMF (%)	
	AE	±2 log	AE	±2 log	AE	±2 log
<i>C. glabrata</i> (34)	70,59	94,12	55,88	91,18	35,29	67,65
<i>C. guilliermondii</i> (13)	92,31	92,31	100	100	69,23	69,23
<i>C. krusei</i> (22)	59,09	90,91	95,45	100	72,73	90,91
<i>C. parapsilosis</i> (17)	94,12	100	94,12	94,12	58,82	64,75
<i>C. tropicalis</i> (42)	64,29	90,48	64,29	85,71	57,14	73,81
Miscelánea (19)	84,21	94,74	73,68	89,47	68,42	78,95
Total (147)	73,47	93,20	74,83	91,84	57,14	74,15

Acuerdo esencial (AE) y concordancia ± 2 diluciones logarítmicas₂ (± 2 log).

Tabla 3. Frecuencia (expresada en porcentaje) de aparición de efecto paradójico con los métodos M27-A2 y EUCAST.

Especie (n)	M27-A2	EUCAST
<i>C. glabrata</i> (34)	14,71	17,65
<i>C. guilliermondii</i> (13)	23,08	30,77
<i>C. krusei</i> (22)	13,64	9,09
<i>C. parapsilosis</i> (17)	58,82	58,82
<i>C. tropicalis</i> (42)	52,38	76,19
Miscelánea (19)	21,05	26,32
Total (147)	31,97	40,14

mayor frecuencia con el método EUCAST y en las especies *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, y siempre a concentraciones ≥ 8 mg/l.

DISCUSIÓN

En la actualidad no se dispone de un método estándar para determinar la actividad de la caspofungina sobre levaduras. Diversos autores han estudiado la actividad de este antifúngico utilizando el método M27-A y aplicando distintas definiciones de CMI (reducción del crecimiento $\geq 50\%$, 90% o 100% con respecto al control) y diferentes tiempos de lectura (24 o 48 horas) (1, 3-5, 7, 16-19). Así mismo, tampoco se dispone de un método estándar para determinar la actividad fungicida (CMF) en levaduras y, al igual que ocurre con la CMI, se han utilizado distintas definiciones de la CMF (letalidad $\geq 90\%$ o 99%) (1, 5, 17). En este trabajo se estudia la actividad antifúngica y fungicida de la caspofungina por dos métodos, M27-A2 y EUCAST. El método EUCAST, estandarizado por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* para los azoles y la 5-fluorocitosina, se diferencia del M27-A2 en el medio de cultivo (RPMI + 2% de glucosa), la lectura espectrofotométrica de los resultados a las 24 horas de incubación y el tamaño del inóculo (10^5 UFC/ml) (8-13).

Las concentraciones utilizadas en este estudio y los volúmenes sembrados para determinar la CMF son superiores a los empleados por otros autores; por otra parte, el criterio aplicado para definir la CMF ha sido más estricto (99% de letalidad). Además, la determinación de la CMI por ambos métodos se ha realizado en paralelo con el fin de disminuir la variabilidad.

Los resultados muestran que la caspofungina es muy activa sobre levaduras distintas de *C. albicans*, con $\text{CMI}_2 \leq 2$ mg/l para el 100% de las cepas por ambos métodos. Así mismo, la CMI_0 que inhibe al 90% de las cepas es ≤ 2 mg/l para la mayoría de las especies estudiadas, excepto para al-

gunas cepas de *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. famata* y *B. capitatus*. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en estudios con especies y número de aislamientos similares a los nuestros (1, 5). En general, la inhibición del crecimiento por caspofungina a la CMI suele ser del orden del 80% , y en la mitad de las cepas la inhibición del crecimiento fue total.

La actividad fungicida de la caspofungina depende de la especie y de la cepa, siendo mayor para *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, especies que presentan el mayor porcentaje de cepas resistentes a los azoles (20-22). Esta actividad es menor en presencia de glucosa: 8 mg/l es una concentración fungicida para el 80% de las cepas estudiadas por el método M27-A2, mientras que con EUCAST esta concentración es fungicida para el $65,7\%$. Las CMF obtenidas por el método M27-A2 son más elevadas que las publicadas en otros estudios (1, 5) que utilizan volúmenes menores para su determinación (10 μ l), probablemente demasiado bajos para poder apreciar la actividad fungicida real. No obstante, también obtienen valores más altos para *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*. Otros autores (23) han descrito que la adición de glucosa no afecta a la CMI de la caspofungina, pero nuestros datos no indican esto. Tal discrepancia puede deberse a la utilización del mismo inóculo en los dos medios (10^3 UFC/ml). La caspofungina pierde la actividad fungicida a concentraciones elevadas (≥ 8 mg/l), por el denominado "efecto paradójico", ampliamente descrito en otros grupos de antibióticos, por ejemplo las quinolonas (24, 25). El efecto paradójico lo distinguimos del *trailing* en que en el primero hay una negativización del crecimiento en varios pocillos, reapareciendo en algún pocillo aislado pero siempre a concentraciones ≥ 8 mg/l, mientras que en el *trailing* el crecimiento se observa en todos o varios pocillos sucesivos a concentraciones superiores a la CMI. La relevancia clínica que pueda tener esta pérdida de actividad fungicida se desconoce. Otros autores no han descrito el efecto paradójico, seguramente porque las concentraciones por ellos utilizadas eran ≤ 8 mg/l.

Cuando comparamos los dos métodos observamos que las CMI son entre una y tres diluciones más bajas por el EUCAST; en cambio, las CMF son ligeramente más elevadas por este método. La concordancia (± 2 log) entre los métodos es buena ($>90\%$) para la CMI_2 y la CMI_0 . Por el contrario, para las CMF depende de la especie: es muy buena para *C. krusei* ($90,91\%$) y más baja en *C. parapsilosis* ($64,75\%$). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (13).

En resumen, la caspofungina tiene una buena actividad antifúngica sobre especies de levaduras distintas de *C. albicans*, incluidas aquellas que habitualmente son resisten-

tes o que presentan un porcentaje elevado de resistencia a los azoles, como *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* (19); sin embargo, es menor para *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*. Los dos métodos estudiados tienen buena correlación para la CMI y menor para la CMF.

BIBLIOGRAFÍA

- Espinel-Ingroff, A. *Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeast*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2950-2956.
- Bouza, E., Muñoz, P. *Papel de la caspofungina en la infección fúngica. Aspectos actuales de la infección fúngica*. Enf Infec Microbiol Clin 2002; 1: 38-42.
- Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J. y cols. *Discovery of novel antifungal (1,3)- β -glucan synthase inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 368-377.
- Krishnarao, T.V., Galgiani, J.N. *Comparison of the in vitro activities of the echinocandin LY 303366, the pneumocandin MK-0991 and fluconazole against Candida species and Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1957-1960.
- Bartizal, K., Gill, C.J., Abruzzo, G.K. y cols. *In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L743-872)*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2326-2332.
- Denning, D.W. *Echinocandins and pneumocandins, a new antifungal class with a novel mode of action*. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 611-614.
- Marco, F., Pfaller, M.A., Messer, S.A., Jones, R.N. *Activity of MK-0991 (L743,872), a new echinocandin, compared with those of LY303366 and four other antifungal agents tested against blood stream isolates of Candida spp.* Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32: 33-37.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast*. Approved standard M27-A. NCCLS, Villanova, PA 1997.
- Cuenca-Estrella, M., Moore, C.B., Barchiesi, F. y cols. *AFST Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). 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.
- Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., Díaz-Guerra, T.M., Mellado, E. *Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology*. J Clin Microbiol 2001; 39: 2513-2517.
- Rodríguez-Tudela, J.L., Berenguer, J., Martínez-Suárez, J.V., Sánchez, R. *Comparison of a spectrophotometric 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.
- Cuenca-Estrella, M., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A. y cols. *Comparative evaluation of NCCLS and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing Candida species*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3644-3647.
- 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.
- Cantón, E., Pemán, J., Viudes, A., Quindós, G., Gobernado, M., Espinel-Ingroff, A. *Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream Candida species*. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45: 203-206.
- Carrillo-Muñoz, A.J., Pemán, J., Gobernado, M. *Nuevos antifúngicos. Presente y futuro*. Rev Esp Quimioterap 1999; 12: 181-204.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Mills, K., Bolmström, A., Jones, R.N. *Evaluation of E-test method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of Candida species*. J Clin Microbiol 2001; 39: 4387-4389.
- Moore, C.B., Oakley, K.L., Denning, D.W. *In vitro activity of a new echinocandin, LY303366, and comparison with fluconazole, flucytosine and amphotericin B against Candida species*. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 11-16.
- Letscher-Bru, V., Herbrecht, R. *Caspofungin: The first representative of a new antifungal class*. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 513-521.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Messer, S.A., Hollis, R.J., Jones, R.N. *In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3959 clinical isolates of Candida spp., including 157 fluconazole-resistant isolates*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1068-1071.
- Denning, D.W. *Echinocandins: A new class of antifungal*. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 889-891.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Hollis, R.J., Jones, R.N., Diekema, D.J. *In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6970 clinical isolates of Candida spp.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1723-1727.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L. y cols. *Variation in susceptibility of bloodstream isolates of Candida glabrata to fluconazole according to patient age and geographic location*. J Clin Microbiol 2003; 41: 2176-2179.
- Laverdiere, M., Restieri, C., Habel, H. *Adding 2% glucose to culture media does not influence the activity of caspofungin against Candida species*. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 183-184.
- Ramón, M.S., Jiménez, M.T., Gobernado, M., Martínez, J.P., Cantón, E. *Actividad bactericida y efecto paradójico de fleroxacin y lomefloxacino sobre los estafilococos*. Rev Esp Quimioterap 1993; 6: 75-79.
- Cantón, E., Ramón, M.S., Jiménez, M.T., Martínez, J.P. *Killing kinetics of four quinolones against gram-positive cocci*. Chemotherapy 1993; 39: 394-399.