

# Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes

Pedro García-Martos, Inmaculada Domínguez, Pilar Marín, Rebeca García-Agudo, Sami Aoufi y José Mira

Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

**FUNDAMENTO.** Estudiar la sensibilidad a antifúngicos de las levaduras patógenas emergentes para conocer su posible resistencia ante la necesidad de aplicar un tratamiento.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Se investiga la sensibilidad *in vitro* de 69 cepas de levaduras aisladas de muestras clínicas, pertenecientes a 24 especies diferentes, frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y

5-fluorocitosina, utilizando el método Sensititre YeastOne.®

**RESULTADOS.** Solamente 9 especies se mostraron sensibles a todos los antifúngicos: *Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. holmii*, *C. kefyri*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. zeylanoides* y *Trichosporon cutaneum*; las demás presentaron resistencia a algún antifúngico.

*C. haemulonii*, *Pichia farinosa* y *Trichosporon mucoides*, fueron resistentes a anfotericina B; *C. haemulonii*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. pintolepesii*, *C. valida*, *P. ohmeri*, *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron resistentes a derivados azólicos; *Blastoschizomyces capitatus* y *C. lipolytica* fueron resistentes a 5-fluorocitosina.

**CONCLUSIONES.** La resistencia de las levaduras patógenas emergentes a anfotericina B y 5-fluorocitosina es escasa, mientras que para los azoles es bastante significativa, especialmente al fluconazol (36%). Muchas de estas levaduras plantean problemas de resistencia intrínseca. En las infecciones por levaduras, es importante la correcta identificación de las especies y el estudio de sensibilidad *in vitro* para elegir el tratamiento antifúngico más adecuado.

**Palabras clave:** levaduras, antifúngicos, *Candida*, fluconazol.

Antifungal susceptibility of emerging yeast pathogens

**BACKGROUND.** To study the antifungal susceptibility of emerging yeast pathogens to know their possible resistance under the need of applying a treatment.

**MATERIAL AND METHODS.** We investigated the *in vitro* susceptibility of 69 yeast strains isolates of clinical samples, belonging to 24 different species, to amphotericin B, fluconazole, itraconazole, ketoconazole and 5-fluorocytosine.

**RESULTS.** Only 9 species showed susceptibility to all antifungal agents: *Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. holmii*, *C. kefyri*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. zeylanoides* y *Trichosporon cutaneum*; the rest of them presented resistance to some antifungal agent.

*C. haemulonii*, *Pichia farinosa* and *Trichosporon mucoides* were resistant to amphotericin B; *C. haemulonii*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. pintolepesii*, *C. valida*, *P. ohmeri*, *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* were resistant to azoles; *Blastoschizomyces capitatus* and *C. lipolytica* were resistant to 5-fluorocytosine.

**CONCLUSIONS.** The resistance of emerging yeast pathogens to amphotericin B and 5-fluorocytosine is low, while resistance to azoles is significant, especially to fluconazole (36%). Many of these yeasts present problems of intrinsic resistance. In yeast infections, the correct identification of species and the study of the *in vitro* susceptibility is important in order to choose the most adequate antifungal treatment.

**Key words:** Yeasts, antifungal agents, *Candida*, fluconazole.

## Introducción

Las levaduras forman parte de la flora normal de la piel, mucosas y tracto digestivo del hombre y están presentes con frecuencia en las muestras clínicas, como flora comensal muchas veces, otras como resultado de colonización, y en ocasiones a causa de la existencia de un proceso infeccioso de etiología fúngica. Las especies del género *Candida* son las que se relacionan más a menudo con patología humana, principalmente *C. albicans*, pero desde hace unos años se refieren otras muchas especies como patógenas emergentes.

Las infecciones por levaduras han adquirido una gran importancia en las últimas décadas, debido no sólo a su mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos o pacientes sometidos a técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas, sino también a su alta morbilidad y mortalidad. Paralelamente se ha observado un incremento en la aparición de nuevas especies patógenas difíciles de

Correspondencia: Dr. P. García-Martos.  
C/ Ana de Vía, 13-2B.  
11009 Cádiz.

Manuscrito recibido el 2-1-2001; aceptado el 18-4-2001.

*Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 249-256

diagnosticar y tratar<sup>1-4</sup>.

Debido al uso frecuente de antifúngicos para el tratamiento de estas infecciones y al aumento de las dosis terapéuticas, se ha constatado la aparición de resistencias, especialmente a derivados azólicos<sup>5-13</sup>, lo que ha conducido a la necesidad de efectuar estudios de sensibilidad *in vitro* para predecir la eficacia de los antifúngicos, antes de instaurar un tratamiento.

La dificultad para realizar pruebas de sensibilidad a antifúngicos ha limitado su utilidad hasta hace unos años. Actualmente, el método de referencia M27-A propuesto por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)<sup>14</sup> permite obtener resultados aceptables y reproducibles. La aparición en el mercado de técnicas comerciales ha facilitado aún más la realización de estas pruebas<sup>15-21</sup>; concretamente, el sistema Sensititre YeastOne®, de microdilución en caldo muestra una excelente correlación con el método de referencia.

El objetivo de este trabajo es determinar la sensibilidad a antifúngicos de un amplio número de levaduras poco frecuentes en clínica y patógenas oportunistas, utilizando el sistema Sensititre YeastOne®, ya que existen escasos estudios al respecto y es importante conocer su espectro de sensibilidad ante la necesidad de aplicar un tratamiento empírico.

## Material y métodos

Analizamos 69 cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Blastoschizomyces* (6), *Candida* (42), *Pichia* (5), *Rhodotorula* (6), *Saccharomyces* (6) y *Trichosporon* (4) aisladas de diversas muestras clínicas: 14 de secreciones respiratorias, 11 de exudado vaginal, 10 de exudado de cavidad oral, 8 de heces, 6 de exudado ótico, 5 de sangre, 5 de orina, 4 de exudado cutáneo, 3 de líquido peritoneal, 2 de exudado cutáneo y 1 de líquido ascítico. Estas cepas procedían de pacientes atendidos en el Hospital Universitario Puerta del Mar

de Cádiz durante los años 1996-1999. La edad media de los pacientes era de 49 años, un 55,1% eran varones, un 52,2% estaban hospitalizados, un 30,0% presentaban enfermedad inmunodepresora, un 60,9% habían recibido tratamiento antimicrobiano previo y un 14,5% profilaxis con antifúngicos.

Las cepas fueron identificadas utilizando métodos convencionales y el sistema comercial de asimilación de compuestos de carbono ID 32C®, (Biomérieux, France), perteneciendo a un total de 24 especies diferentes (tabla 1).

La sensibilidad a antifúngicos se realizó por el método comercial Sensititre YeastOne®, (Alamar Blue) (AccuMed International Ltd, UK), consistente en una microplaca que contiene 5 antifúngicos a diluciones crecientes: anfotericina B (0,008-16 µg/ml), fluconazol (0,125-256 µg/ml), itraconazol (0,008-16 µg/ml), ketoconazol (0,008-16 µg/ml) y 5-fluorocitosina (0,03-64 µg/ml). El sistema incorpora un indicador de crecimiento de óxido-reducción (colorante Alamar Blue) que facilita la lectura de los puntos finales por un cambio de color, de azul (negativo) a rojo (positivo).

El inóculo se obtuvo tras cultivo de las levaduras durante 48 horas en agar de Sabouraud, preparando una suspensión en agua destilada estéril de turbidez igual al punto 0,5 de la escala de McFarland. A partir de este primer inóculo, se añadieron 20 µl a tubos con 10 µl de medio RPMI 1640 tamponado con MOPS a pH 7. La inoculación de los pocillos de la placa Sensititre se efectuó con 100 µl de esta suspensión en medio RPMI. Los paneles se incubaron a 35 °C durante 24 y 48 horas, antes de realizar la lectura definitiva, interpretando el cambio de color azul (no crecimiento) a rojo (crecimiento) en el caso de anfotericina B, y de azul a rojo o púrpura (crecimiento inhibido) para azoles y 5-fluorocitosina<sup>18</sup>. Los puntos de corte utilizados para categorizar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes antifúngicos fueron los propuestos por el NCCLS y el fabricante, considerando resistentes a anfotericina B y ketoconazol las cepas con una CMI ≥ 2 µg/ml, resistentes a fluconazol las cepas con una CMI ≥ 32 µg/ml, resistentes a itraconazol las cepas con una CMI ≥ 1 µg/ml, y resistentes a 5-fluorocitosina las que presentaron una CMI ≥ 64 µg/ml<sup>14,22</sup>.

Se incluyeron también en el estudio las cepas de control de calidad *C. albicans* ATCC 68548 y *C. krusei* ATCC 6258, realizando en ellas las mismas determinaciones.

TABLA 1. Sensibilidad de 24 especies de levaduras a anfotericina B

Especie	Cepas	Intervalo (µg/ml)	CMI50	CMI90	Cepas resistentes
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	6	0,25-0,5	0,25	0,5	0
<i>Candida famata</i>	3	0,06-0,25	0,125	0,25	0
<i>Candida guilliermondii</i>	3	0,06-0,125	0,125	0,125	0
<i>Candida haemuloni</i>	1	2	2	2	1
<i>Candida holmii</i>	2	0,25-0,5	0,25	0,5	0
<i>Candida inconspicua</i>	2	0,125-0,25	0,125	0,25	0
<i>Candida kefir</i>	5	0,25-0,5	0,25	0,5	0
<i>Candida lipolytica</i>	3	0,25-0,5	0,25	0,5	0
<i>Candida lusitanae</i>	3	0,25-0,5	0,25	0,5	0
<i>Candida norvegensis</i>	4	0,03-0,25	0,06	0,25	0
<i>Candida pelliculosa</i>	5	0,06-0,125	0,125	0,125	0
<i>Candida pintolepesii</i>	3	0,125-0,5	0,125	0,5	0
<i>Candida rugosa</i>	2	0,25	0,25	0,25	0
<i>Candida utilis</i>	1	0,06	0,06	0,06	0
<i>Candida valida</i>	3	0,03-0,5	0,125	0,5	0
<i>Candida zeylanoides</i>	2	0,03-0,06	0,03	0,06	0
<i>Pichia farinosa</i>	2	1-2	1	2	1
<i>Pichia ohmeri</i>	3	0,125-0,25	0,125	0,25	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	0,125-0,25	0,125	0,25	0
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	0,03	0,03	0,03	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	0,03-0,5	0,5	0,5	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	0,25-0,5	0,25	0,5	0
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2	0,06-0,125	0,06	0,125	0
<i>Trichosporon mucoides</i>	2	0,5-4	0,5	4	1

CMI: concentración mínima inhibitoria.

## Resultados

Los resultados de las CMI obtenidas para la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 68548 fueron: 0,25 µg/ml para anfotericina B; 2 µg/ml para fluconazol; 0,06 µg/ml para itraconazol y ketoconazol; y 0,25 µg/ml para 5-fluorocitosina. Para *C. krusei* ATCC 6258 las CMI fueron: 0,5 µg/ml para anfotericina B; 32 µg/ml para fluconazol; 0,125 µg/ml para itraconazol y ketoconazol; y 8 µg/ml para 5-fluorocitosina. Estos valores están dentro de los rangos aceptados por el NCCLS en el documento M27-A<sup>14</sup>.

La sensibilidad de las cepas ensayadas frente a cada uno de los antifúngicos, expresando el intervalo encon-

trado, la CMI50 y la CMI90, se exponen en las tablas 1-5. De las 24 especies de levaduras estudiadas, solamente 9 de ellas se mostraron sensibles a todos los antifúngicos: *C. famata*, *C. guillermondii*, *C. holmii*, *C. kefyfyr*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. zeylanoides* y *T. cutaneum*; las demás presentaron resistencia a algún antifúngico en mayor o menor grado.

Frente a la anfotericina B se detectaron 3 cepas resistentes, lo que supone una resistencia global del 4%. Dos de estas cepas, pertenecientes a *C. haemulonii* y *P. farinosa*, presentaron una CMI de 2 µg/ml, y la tercera, correspondiente a *T. mucoides*, una CMI de 4 µg/ml.

TABLA 2. Sensibilidad de 24 especies de levaduras a fluconazol

Especie	Cepas	Intervalo (µg/ml)	CMI50	CMI90	Cepas resistentes
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	6	1-8	2	8	0
<i>Candida famata</i>	3	4-16	8	16	0
<i>Candida guillermondii</i>	3	2-4	2	4	0
<i>Candida haemulonii</i>	1	≥ 256	≥ 256	≥ 256	1
<i>Candida holmii</i>	2	0,25-0,5	0,25	0,5	0
<i>Candida inconspicua</i>	2	128- ≥ 256	128	≥ 256	2
<i>Candida kefyfyr</i>	5	0,25-0,5	0,25	0,5	0
<i>Candida lipolytica</i>	3	8	8	8	0
<i>Candida lusitaniae</i>	3	0,125- ≥ 256	64	≥ 256	1
<i>Candida norvegensis</i>	4	16-128	32	128	2
<i>Candida pelliculosa</i>	5	1-2	2	2	0
<i>Candida pintolepesii</i>	3	8-16	16	16	0
<i>Candida rugosa</i>	2	1-2	1	2	0
<i>Candida utilis</i>	1	1	1	1	0
<i>Candida valida</i>	3	≥ 256	≥ 256	≥ 256	3
<i>Candida zeylanoides</i>	2	1	1	1	0
<i>Pichia farinosa</i>	2	1-2	1	2	0
<i>Pichia ohmeri</i>	3	128- ≥ 256	128	≥ 256	3
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	64- ≥ 256	64	≥ 256	2
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	≥ 256	≥ 256	≥ 256	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	64- ≥ 256	128	≥ 256	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	≥ 256	≥ 256	≥ 256	6
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2	1-2	1	1	0
<i>Trichosporon mucoides</i>	2	1-2	1	1	0

CMI: concentración mínima inhibitoria.

TABLA 3. Sensibilidad de 24 especies de levaduras a itraconazol

Especie	Cepas	Intervalo (µg/ml)	CMI50	CMI90	Cepas resistentes
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	6	0,06-0,25	0,06	0,25	0
<i>Candida famata</i>	3	0,25-0,5	0,5	0,5	0
<i>Candida guillermondii</i>	3	0,06-0,5	0,125	0,5	0
<i>Candida haemulonii</i>	1	≥ 16	≥ 16	≥ 16	1
<i>Candida holmii</i>	2	0,06	0,06	0,06	0
<i>Candida inconspicua</i>	2	0,03-0,06	0,03	0,06	0
<i>Candida kefyfyr</i>	5	0,016-0,03	0,03	0,03	0
<i>Candida lipolytica</i>	3	0,016	0,016	0,016	0
<i>Candida lusitaniae</i>	3	0,016- ≥ 16	1	≥ 16	2
<i>Candida norvegensis</i>	4	0,125-0,5	0,25	0,5	0
<i>Candida pelliculosa</i>	5	0,03-0,06	0,06	0,06	0
<i>Candida pintolepesii</i>	3	0,5-1	1	1	2
<i>Candida rugosa</i>	2	0,03	0,03	0,03	0
<i>Candida utilis</i>	1	0,06	0,06	0,06	0
<i>Candida valida</i>	3	0,125- ≥ 16	1	≥ 16	2
<i>Candida zeylanoides</i>	2	0,016-0,03	0,016	0,016	0
<i>Pichia farinosa</i>	2	0,06-0,125	0,06	0,125	0
<i>Pichia ohmeri</i>	3	≥ 16	≥ 16	≥ 16	3
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	0,06-0,25	0,06	0,25	0
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	≥ 16	≥ 16	≥ 16	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	0,03-0,5	0,125	0,5	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	≥ 16	≥ 16	≥ 16	6
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2	0,03	0,03	0,03	0
<i>Trichosporon mucoides</i>	2	0,06	0,06	0,04	0

CMI: concentración mínima inhibitoria.

TABLA 4. Sensibilidad de 24 especies de levaduras a ketoconazol

Especie	Cepas	Intervalo (µg/ml)	CMI50	CMI90	Cepas resistentes
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	6	0,06-0,25	0,06	0,25	0
<i>Candida famata</i>	3	0,125-0,25	0,125	0,25	0
<i>Candida guilliermondii</i>	3	0,06-0,25	0,06	0,25	0
<i>Candida haemuloni</i>	1	≥ 16	≥ 16	≥ 16	1
<i>Candida holmii</i>	2	0,016-0,03	0,016	0,03	0
<i>Candida inconspicua</i>	2	0,016-0,03	0,016	0,03	0
<i>Candida kefyr</i>	5	0,016-0,03	0,016	0,03	0
<i>Candida lipolytica</i>	3	0,125-0,25	0,25	0,25	0
<i>Candida lusitaniae</i>	3	0,016-≥ 16	2	≥ 16	2
<i>Candida norvegensis</i>	4	0,25-1	0,5	1	0
<i>Candida pelliculosa</i>	5	0,03-0,125	0,06	0,125	0
<i>Candida pintolepesii</i>	3	0,25-1	0,5	1	0
<i>Candida rugosa</i>	2	0,016-0,03	0,016	0,03	0
<i>Candida utilis</i>	1	0,06	0,06	0,06	0
<i>Candida valida</i>	3	1-≥ 16	2	≥ 16	2
<i>Candida zeylanoides</i>	2	0,008	0,008	0,008	0
<i>Pichia farinosa</i>	2	0,03	0,03	0,03	0
<i>Pichia ohmeri</i>	3	4-≥ 16	8	≥ 16	3
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	0,125	0,125	0,125	0
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	0,125	0,125	0,125	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	0,06-0,25	0,06	0,25	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	≥ 16	≥ 16	≥ 16	6
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2	0,03-0,06	0,03	0,06	0
<i>Trichosporon mucoides</i>	2	0,06-0,125	0,06	0,125	0

CMI: concentración mínima inhibitoria.

TABLA 5. Sensibilidad de 24 especies de levaduras a 5-fluorocitosina

Especie	Cepas	Intervalo (µg/ml)	CMI50	CMI90	Cepas resistentes
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	6	≤ 0,03- ≥ 64	≤ 0,03	> 64	2
<i>Candida famata</i>	3	≤ 0,03-0,06	≤ 0,03	0,06	0
<i>Candida guilliermondii</i>	3	≤ 0,03-0,06	≤ 0,03	0,06	0
<i>Candida haemuloni</i>	1	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	0
<i>Candida holmii</i>	2	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	0
<i>Candida inconspicua</i>	2	0,125	0,125	0,125	0
<i>Candida kefyr</i>	5	≤ 0,03-0,125	≤ 0,03	0,125	0
<i>Candida lipolytica</i>	3	≥ 64	≥ 64	≥ 64	3
<i>Candida lusitaniae</i>	3	≤ 0,03-0,5	≤ 0,03	0,5	0
<i>Candida norvegensis</i>	4	2-8	4	8	0
<i>Candida pelliculosa</i>	5	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	0
<i>Candida pintolepesii</i>	3	0,25	0,25	0,25	0
<i>Candida rugosa</i>	2	0,125-0,25	0,125	0,25	0
<i>Candida utilis</i>	1	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	0
<i>Candida valida</i>	3	0,06-4	2	4	0
<i>Candida zeylanoides</i>	2	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	0
<i>Pichia farinosa</i>	2	0,125-0,25	0,125	0,25	0
<i>Pichia ohmeri</i>	3	≤ 0,03-0,06	≤ 0,03	0,06	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	0,06-0,125	0,06	0,125	0
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	0,125-0,25	0,25	0,25	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	≤ 0,03-1	0,06	1	0
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2	2-16	2	16	0
<i>Trichosporon mucoides</i>	2	2-8	2	8	0

CMI: concentración mínima inhibitoria.

Con respecto a fluconazol, la resistencia global fue del 36%. Todas las cepas de *C. haemulonii*, *C. inconspicua*, *C. valida*, *P. ohmeri*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae* (21 cepas en total) fueron resistentes a este antifúngico, con una CMI ≥ 256 µg/ml, y además 2 cepas de *C. lusitaniae* (CMI de 64 y ≥ 256 µg/ml) y otras 2 de *C. norvegensis* (CMI de 128 µg/ml).

Algunas de estas mismas especies: *C. haemulonii*, *P. ohmeri*, *R. minuta* y *S. cerevisiae* (11 cepas) también fueron resistentes a itraconazol, con una CMI ≥ 16 µg/ml, así como las 2 cepas de *C. lusitaniae* (CMI de 1 y ≥ 16 µg/ml), las 2 cepas de *C. valida* (CMI de 1 y ≥ 16 µg/ml),

y 2 cepas de *C. pintolepesii* que tenían CMI de 16 µg/ml a fluconazol (sensibles, pero dosis dependientes) y de 1 µg/ml a itraconazol. La resistencia global a itraconazol fue del 24%.

Frente a ketoconazol, la resistencia global fue del 20%, afectando a casi las mismas cepas resistentes a itraconazol: *C. haemulonii*, *P. ohmeri* y *S. cerevisiae* (10 cepas) con una CMI ≥ 16 µg/ml, las 2 cepas de *C. lusitaniae* (CMI de 2 y ≥ 16 µg/ml) y las 2 cepas de *C. valida* (CMI de 2 y ≥ 16 µg/ml).

La resistencia global para 5-fluorocitosina fue del 7%, incluyendo las 3 cepas de *C. lipolytica* y 2 cepas de *B. capitatus*, todas con una CMI ≥ 64 µg/ml.



## Discusión

En los últimos años, las infecciones humanas por levaduras han cobrado un gran interés, debido a la aparición de cuadros diseminados y a la implicación de nuevas especies distintas de las habituales. Se ha considerado que la aparición e incremento de estas levaduras patógenas emergentes se relaciona con la alteración de las defensas del huésped, la utilización de procedimientos diagnósticos y terapéuticos agresivos, o bien con ciertas características de patogenicidad de estas especies, entre ellas la resistencia a los antifúngicos, ya que las especies habituales en clínica son generalmente sensibles, a excepción de algunas cepas de *C. krusei* y *C. glabrata* que presentan resistencia a fluconazol.

Entre las nuevas especies de levaduras emergentes como patógenas humanas se encuentran la mayor parte de las estudiadas por nosotros. Así, *B. capitatus* ha sido descrita como causa de infección del tracto urinario, infección respiratoria, osteomielitis, espondilodiscitis, endocarditis, encefalitis, meningitis e infección diseminada<sup>23-30</sup>; *C. famata* se ha relacionado con endoftalmítis, peritonitis y fungemia<sup>31-34</sup>; *C. guilliermondii* ha sido implicada en osteomielitis, pericarditis y fungemia<sup>35-38</sup>; *C. haemulonii* se ha aislado de muestras clínicas pero no se ha aclarado su posible patogenicidad<sup>39</sup>; *C. holmii* ha sido referida en un caso de osteomielitis<sup>40</sup>; *C. inconspicua* se ha asociado a infección de catéteres y fungemia<sup>41,42</sup>; *C. kefyr* ha sido descrita como causa de esofagitis, funguria, fungemia e infección diseminada<sup>43-45</sup>; *C. lipolytica* ha sido implicada en infección ocular y fungemia<sup>46,47</sup>; *C. lusitanae* se ha considerado responsable de infección del tracto urinario, peritonitis, meningitis y fungemia<sup>5,48-51</sup>; *C. norvegensis* se ha referido en peritonitis e infección diseminada<sup>13,52-54</sup>; *C. pelliculosa* en neumonía, meningitis, endocarditis, ventriculitis y fungemia<sup>55-59</sup>; *C. rugosa* en fungemia<sup>12,60,61</sup>; *C. utilis* en infección del tracto urinario, queratitis y fungemia<sup>62-65</sup>; *C. zeylanoides*, ha producido artritis y sepsis, ocasionalmente<sup>66,67</sup>; *P. farinosa* se ha aislado en la cavidad oral de pacientes con cáncer<sup>68</sup>; *P. ohmeri*, teleomorfo de *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, se ha citado como responsable de peritonitis y fungemia<sup>69,70</sup>; las especies del género *Rhodotorula* se han asociado con infección de catéteres, endoftalmítis, peritonitis, meningitis, endocarditis y fungemia<sup>71-76</sup>; *S. cerevisiae*, teleomorfo de *C. robusta*, se ha implicado en endocarditis, peritonitis, infección del tracto urinario, vulvovaginitis, empiema, neumonía y fungemia<sup>77-83</sup>; y *T. beigei* (*T. cutaneum*), recientemente clasificado en 5 especies, se ha descrito en casos de endocarditis y fungemia<sup>84-87</sup>. Dos de las especies incluidas en nuestro estudio, como es el caso de *C. pintolepsii*, aislada a partir de exudado vaginal, piel y heces, así como *C. valida*, aislada en vagina y secreciones respiratorias, no han sido relacionadas, hasta la fecha, con patología humana.

El estudio de sensibilidad a antifúngicos en hongos levaduriformes es complicado por la gran cantidad de variables que afectan a los resultados, pero en 1997 se publicó el documento M27-A del NCCLS, que establece como idóneo para este fin el método de macro o microdilución en caldo<sup>14</sup>. Este método se considera de referencia, pero su realización técnica es muy compleja y laboriosa, sobre todo en la preparación de las diluciones de los fár-

macos y del inóculo, y existen dificultades para la obtención de los antifúngicos como sustancias puras valoradas. La disponibilidad de métodos comerciales en los laboratorios clínicos ha permitido un gran avance en los estudios de sensibilidad a antifúngicos, facilitando su introducción en la rutina de trabajo. El método Sensititre YeastOne (Alamar Blue) utilizado en este estudio es un método semiautomatizado, bien estandarizado y cómodo, basado en las recomendaciones del documento M27-A del NCCLS. Su correlación con el método de referencia es bastante buena, según han mostrado diversos autores que lo han evaluado, y la lectura de los puntos de corte es muy exacta, ya que la variación de color del indicador reduce el efecto de arrastre característico de los azoles en los métodos de dilución<sup>15,17,18,21,88</sup>. Según nuestra experiencia, la temperatura de incubación a 35 °C no es apropiada para *C. holmii* y *C. zeylanoides*, que crecen mejor a 30 °C, y la lectura a 48 horas es más adecuada, tanto para las cepas control como para la mayoría de las ensayadas; aunque, desde el punto de vista clínico, la lectura a las 24 horas es de elección en aquellas cepas que pasan de sensibles a las 24 horas a resistentes a las 48 horas, por inhibición prominente del crecimiento<sup>18</sup>.

De acuerdo con los resultados que hemos obtenido con este método en las 69 cepas ensayadas, podemos concluir que el porcentaje de resistencia global a anfotericina B y 5-fluorocitosina es bajo, mientras que para los derivados azólicos estos porcentajes son significativos, especialmente la resistencia a fluconazol (36%).

Con respecto a anfotericina B, la mayoría de las especies estudiadas se mostraron sensibles, a excepción de *C. haemulonii*, *P. farinosa* y *T. mucoides*. Algunos autores han referido resistencia moderada frente a este antifúngico en estudios de sensibilidad<sup>20,21,89-92</sup>, y resistencia adquirida en el transcurso de tratamientos prolongados en pacientes inmunocomprometidos, particularmente en *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* y *T. beigei*<sup>7,36,48,85,93-99</sup>. Pero la resistencia a anfotericina B es, en general, poco frecuente; la resistencia primaria afecta sobre todo a *C. albicans* y *C. lusitanae*. Nosotros no hemos detectado ninguna cepa resistente de esta última especie. El medio de cultivo utilizado en el método Sensititre YeastOne® (RPMI1640) parece no ser totalmente idóneo para la detección de cepas resistentes a anfotericina B; el empleo del medio *Antibiotic 3* podría discriminar las resistencias obtenidas con este medio<sup>100</sup>.

En cuanto a los derivados azólicos, los mayores porcentajes de resistencia los detectamos frente a fluconazol y en un número importante de especies. Es conocida la resistencia a fluconazol en *C. krusei*<sup>10,101</sup>, pero también se ha comunicado resistencia en otras especies habituales en clínica, especialmente en *C. glabrata*<sup>6,8,9,11,15,102,103</sup>. Esta resistencia está relacionada, sin duda, con el uso generalizado de este antifúngico en el tratamiento de las candidosis orofaríngeas en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>104,105</sup>. De las especies resistentes a fluconazol encontradas en nuestro estudio, se ha referido resistencia en *C. inconspicua*<sup>31,32</sup>, *C. norvegensis*<sup>13</sup>, las especies del género *Rhodotorula*<sup>21,106</sup> y *S. cerevisiae*<sup>107</sup>; también en *B. capitatus*<sup>108</sup> y *C. guilliermondii*<sup>37</sup>, aunque nosotros no hemos encontrado cepas resistentes. En algunas de estas especies se ha descrito

una resistencia uniforme a los imidazoles, como es el caso de *S. cerevisiae*. Nosotros también hemos observado esta multiresistencia en *C. haemulonii*, *P. ohmeri*, 2 cepas de *C. lusitaniae* y otras 2 de *C. valida*. Es rara la resistencia aislada a itraconazol que encontramos en dos cepas de *C. pintolepesii*, aunque la CMI que muestran es baja, de 1 µg/ml, y podría no tratarse de una resistencia real.

Frente a 5-fluorocitosina, el porcentaje de resistencia registrado en nuestro estudio es también muy bajo y sólo abarca a 2 especies: *C. lipolytica* y *B. capitatus*. La resistencia descrita a este antifúngico varía mucho de unos autores a otros, y también según las especies, predominando en *C. albicans* y *C. glabrata*<sup>20,21,89,90,92</sup>. Esta resistencia podría ser intrínseca en muchos casos, ya que este fármaco no está comercializado en nuestro país. Su empleo en exclusividad induce resistencia con rapidez, por lo que cuando se utiliza se asocia con anfotericina B u otros antifúngicos para prevenir la aparición de resistencia.

Se ha constatado que el uso de antifúngicos en el tratamiento de las infecciones por levaduras presenta serios problemas a causa del desarrollo de resistencias y de la selección de nuevas especies patógenas. Esta situación es particularmente grave en pacientes inmunocomprometidos. Por otra parte, como se deduce de nuestros resultados, muchas de las levaduras patógenas emergentes plantean problemas de resistencia intrínseca a los antifúngicos y, por otra parte, por estos motivos, la correcta identificación de las levaduras responsables de infección y el estudio de sensibilidad *in vitro* pueden servir de orientación al microbiólogo clínico para recomendar un tratamiento antifúngico. En caso de tratarse de una levadura con resistencia intrínseca o detectarse resistencia a algún fármaco, un tratamiento incorrecto podría dar lugar a un fracaso terapéutico<sup>9</sup>.

El hecho de que no se disponga de bastantes antifúngicos realmente efectivos hace que la anfotericina B siga siendo el tratamiento de elección en infecciones graves y en pacientes inmunocomprometidos, mientras se investigan nuevos fármacos dirigidos hacia otras dianas más selectivas. Los nuevos antifúngicos, como el voriconazol y las equinocandinas, así como las formulaciones liposómicas de antifúngicos clásicos (nistatina) intentan mejorar la eficacia clínica y la reducción de la toxicidad<sup>109,110</sup>.

## Bibliografía

- Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 115-125.
- Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 5.487-5.491.
- Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 462-478.
- Coleman DC, Rinaldi MG, Havnes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol* 1998; 36 (Suppl 1): 156-165.
- Merz WG. *Candida lusitaniae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 1.194-1.195.
- Ryley JF, Wilson RG, Barrett-Bee KJ. Azole resistance in *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1984; 22: 53-63.
- Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, Medoff G. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. *Am J Med* 1988; 84: 826-832.
- Warnock DW, Burke J, Cope NJ, Johnson EM, von Fraunhofer NA, Williams EW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet* 1988; 2: 1.310.
- Dupouy-Camet J, Paugam A, De Donato C, Viguie C, Vicens I, Volle PJ, et al. Résistance au fluconazole en milieu hospitalier. Concordance entre la résistance de *Candida albicans in vitro* et l'échec thérapeutique. *Presse Med* 1991; 20: 1.341.
- Roder BL, Sonnenschein C, Hartzen SH. Failure of fluconazole therapy in *Candida krusei* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 173.
- Kitchen VS, Savage M, Harris JR. *Candida albicans* resistance in AIDS. *J Infect* 1991; 22: 204-205.
- Dube MP, Heseltine PN, Rinaldi MG, Evans S, Zawacki B. Fungemia and colonization with nystatin-resistant *Candida rugosa* in a burn unit. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 77-82.
- Sandven P, Nilsen K, Digraanes A, Tjåde T, Lassen J. *Candida norvegensis*: fluconazole-resistant species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1.375-1.376.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova PA 1997.
- To WK, Fothergill AW, Rinaldi MG. Comparative evaluation of macrodilution and Alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2.660-2.664.
- Arikan S, Gur D, Akova M. Comparison of E-test, microdilution and colorimetric dilution with reference broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of clinical significant *Candida* species isolated from immunocompromised patients. *Mycoses* 1997; 40: 291-296.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Plavan H, et al. Multisite reproductibility of MIC by Sensititre YeastOne colorimetric antifungal susceptibility panel. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31: 543-547.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, et al. 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.
- Torres-Rodríguez JM, Madrenys N, Jiménez T, Saballs P. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y E-test. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 115-118.
- Linares MJ, Muñoz JF, Solís F, Rodríguez FC, Valero A, Casal M. Study of susceptibility of yeast isolates of clinical interest to five antifungal agents using the E-test. *Rev Esp Quimioterapia* 1998; 11: 64-69.
- Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Gasser I, Tur-Tur C, Ruesga MT, Alonso-Vargas R, et al. Determinación mediante el sistema Sensititre de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de levaduras de interés médico. *Rev Esp Quimioterapia* 1999; 12: 126-135.
- Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Barlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: Conceptual framework and analysis *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infection. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235-247.
- Girmenia C, Micozi A, Venditti M, Meloni G, Iori AP, Bastianello S, et al. Fluconazole treatment of *Blastoschizomyces capitatus* meningitis in an allo bone marrow recipient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 752-756.
- Polacheck I, Salkin IF, Kitzes-Cohen R, Raz R. Endocarditis caused by *Blastoschizomyces capitatus* and taxonomic review genus. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2.318-2.322.
- D'Antonio D, Piccolomini R, Fioritoni G, Iacome A, Betti S, Fazzi P, et al. Osteomyelitis and vertebral discitis caused by *Blastoschizomyces capitatus* a patient with acute leukemia. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 224-247.
- Sanz MA, López F, Martínez ML, Sanz GF, Martínez JA, Martín G, et al. Disseminated *Blastoschizomyces capitatus* infection in acute myeloblastic leukaemia. Report of three cases. *Support Care Cancer* 1996; 4: 291-293.
- Ortiz AM, Sanz-Rodríguez C, Culebras J, Buendía B, González-Alvaro I, Ocón E, et al. Multiple spondylodiscitis caused by *Blastoschizomyces capitatus* in an allo bone marrow transplantation recipient. *J Rheumatol* 1998; 25: 2.276-2.278.
- Kremery S, Dubrava M, Kremery V. Fungal urinary tract infections in patient at risk. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11: 289-291.
- Cheung MY, Chiu NC, Chen SH, Liu HC, Ou CT, Liang DC. Mandibular osteomyelitis caused by *Blastoschizomyces capitatus* in a child acute myelogenous leukemia. *J Formos Med Assoc* 1999; 98: 787-789.
- Pérez-Sánchez I, Anguita J, Martín-Rabadán P, Muñoz P, Serrano D, Escudero A, et al. *Blastoschizomyces capitatus* infection in acute leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2000; 39: 209-212.
- Rao NA, Nerenberg AV, Forster DJ. *Torulopsis Candida (Candida famata)* endophthalmitis simulating *Propionibacterium acnes* syndrome. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1.718-1.721.

32. Quindós G, Cabrera F, Arilla MC, Burgos A, Ortiz-Vingon R, Canon JL, et al. Fatal *Candida famata* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis who was treated with fluconazole. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 658-660.
33. Carrega G, Riccio G, Santoriello L, Pasqualini M, Pellicci R. *Candida famata* fungemia in a surgical patient successfully treated with fluconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 698-699.
34. Krcmery V, Kunova A. *Candida famata* fungemia in a cancer patient: case report. *J Chemother* 2000; 12: 189-190.
35. Vázquez JA, Lundstrom T, Demby L, Chandrasekar P, Boikov D, Parri MB, et al. Invasive *Candida guilliermondii* infection: *in vitro* susceptibility studies and molecular analysis. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 849-853.
36. Ainbinder DJ, Parmley VC, Mader TH, Nelson ML. Infectious crystalline keratopathy caused by *Candida guilliermondii*. *Am J Ophthalmol* 1998; 125: 723-725.
37. Tietz HJ, Czaika V, Sterry W. Case report. Osteomyelitis caused by high resistant *Candida guilliermondii*. *Mycoses* 1999; 42: 577-580.
38. Mardani M, Hanna HA, Girgawy E, Raad I. Nosocomial *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 336-337.
39. Gargeya IB, Pruitt WR, Meyer SA, Ahearn DG. *Candida haemulonii* from clinical specimens in the USA. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 335-338.
40. Murdock CB, Fisher JF, Loeb L, Chew WH. Osteomyelitis of the hand due *Tolurospis holmii*. *South Med J* 1983; 76: 1.460-1.461.
41. Baily GG, Moore CB, Essayag SM, de Wit S, Burnie JP, Denning DW. *Candida inconspicua*, a fluconazol-resistant pathogen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 161-163.
42. D'Antonio D, Violante B, Mazzoni A, Bonfini T, Capuani MA, Daloia F, et al. A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 792-795.
43. Morgan MA, Wilkowske CJ, Roberts GD. *Candida pseudotropicalis* fungemia and invasive disease in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 1.006-1.007.
44. Listemann H, Schulz KD, Wasmuth R, Begemann F, Meigel W. Oesophagitis caused by *Candida kefyr*. *Mycoses* 1998; 41: 3.434-3.444.
45. Farina C, Cailiti F, Manisco A, Goglio A. Fuangaemia survey: a 10-year experience in Bergamo, Italy. *Mycoses* 1999; 42: 543-548.
46. Nitzulesco V, Niculescu M. Three cases of ocular candidiasis caused by *Candida lipolytica*. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol* 1976; 35: 269-272.
47. García-Martos P, de la Rubia F, Palomo MJ, Álvarez MM, Marín P, Mira J. *Candida lipolytica*, un nuevo patógeno oportunista. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 163-164.
48. Guinet R, Chanas J, Goullier A, Bonnefoy G, Ambroise-Thomas P. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 443-444.
49. Baker JG, Nadler HL, Forgacs P, Kurtz SR. *Candida lusitanae*: a new opportunistic pathogen of the urinary tract. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; 2: 145-149.
50. Sánchez PJ, Cooper BH. *Candida lusitanae*: sepsis and meningitis in a neonate. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 758-759.
51. García-Martos P, Díaz J, Castaño M, Pérez M, Marín P. Peritonitis caused by *Candida lusitanae* in patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Clin Nephrol* 1991; 36: 50-51.
52. Nielsen H, Stenderup J, Bruun B, Ladefoged J. *Candida norvegensis* peritonitis and invasive disease in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1.664-1.665.
53. Hood SV, Moore CB, Denning DW. Isolation of *Candida norvegensis* from clinical specimens: four case reports. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 1.185-1.187.
54. Nielsen H, Stenderup J. Invasive *Candida norvegensis* infection in immunocompromised patients. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 311-312.
55. Klein AS, Tortora GT, Malowitz R, Greene WH. *Hansenula anomala*: a new fungal pathogen. *Arch Intern Med* 1988; 148: 1.210-1.213.
56. López F, Martín G, Paz ML, Danz MA. *Hansenula anomala* en fungemia aguda. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990; 8: 363-364.
57. Salesa R, Burgos A, Fernández-Mazarrasa C, Quindós G, Pontón J. Transient fungaemia due to *Candida pelliculosa* in a patient with AIDS. *Mycoses* 1991; 34: 327-329.
58. Moses A, Maayan S, Shvil Y, Dudin A, Ariel I, Thalji A, et al. *Hansenula anomala* infections in children: from asymptomatic colonization to tissue invasion. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 400-402.
59. Hirasaki S, Ijichi T, Fujita N, Araki S, Gotoh H, Nakagawa M. Fungemia caused by *Hansenula anomala*: successful treatment with fluconazole. *Intern Med* 1992; 31: 622-624.
60. Arisoy ES, Correa A, Seilheimer DK, Kaplan SL. *Candida rugosa* central catheter infection in a child. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 961-963.
61. Shenoy S, Samuga M, Urs S, Anuradha KM, Kurian MM, Augustine A, et al. Intravenous catheter-related *Candida rugosa* fungaemia. *Trop Doct* 1996; 26: 31-32.
62. Alsina A, Mason M, Uphoff RA, Riggsby WS, Becker JM, Murphy D. Catheter-associated *Candida utilis* fungemia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: species verification with a molecular probe. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 621-624.
63. Bougnoux ME, Gueho E, Potocka AC. Resolutive *Candida utilis* fungemia in a non neutropenic patient. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1.644-1.645.
64. Shih MH, Sheu MM, Chen HY, Lin SR. Fungal keratitis caused by *Candida utilis* case report. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* 1999; 15: 171-174.
65. Hazen KC, Theisz GW, Howell SA. Chronic urinary tract infection due to *Candida utilis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 824-827.
66. Levenson D, Pfaller MA, Smith MA, Hollis R, Gerarden T, Tucci CB. *Candida zeylanoides*: another opportunistic yeast. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1.689-1.692.
67. Bisbe J, Vilardell J, Valls M, Moreno A, Brancos M, Andreu J. Transient *Candida* fungemia and arthritis due to *Candida zeylanoides*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1987; 6: 668-669.
68. Paula CR, Sampaio MC, Birman EG, Siqueira AM. Oral yeast in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. *Mycopathologia* 1990; 112: 119-124.
69. Bergman MM, Gagnon D, Doern GV. *Pichia ohmeri* fungemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30: 229-231.
70. Choy BY, Wong SS, Chan TM, Lai KN. *Pichia ohmeri* peritonitis in a patient on CAPD: response to treatment with amphotericin. *Perit Dial Int* 2000; 20: 91-92.
71. Naveh Y, Friedman A, Merzbach D, Hashman N. Endocarditis caused by *Rhodotorula* successfully treated with 5-fluorocytosine. *Br Heart J* 1975; 37: 100-104.
72. Pore RS, Chen J. Meningitis caused by *Rhodotorula*. *Sabouradia* 1976; 14: 331-335.
73. Wrong V, Ross L, Opas L, Lieberman E. *Rhodotorula rubra* peritonitis in a child undergoing intermittent cycling peritoneal dialysis. *J Infect Dis* 1988; 157: 393-394.
74. Kiehn E, Gorey E, Brown AE, Edwards FF, Armstrong D. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 841-846.
75. Jiménez-Mejías ME, Ortiz C, Jiménez-Gonzalo FJ, del Nozal M, Campos T, Jiménez FJ. Fungemia por *Rhodotorula mucilaginosa* en relación con nutrición parenteral total. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 543-546.
76. Gregory JK, Haller JA. Chronic postoperative *Rhodotorula* endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 1.686-1.687.
77. Dougherty SH, Simmons L. Postoperative peritonitis caused by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Surg* 1982; 117: 248-249.
78. Cimolai N, Gill MJ, Church D. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 8: 113-117.
79. Tawfik OW, Papasian CJ, Dixon AY, Potter LM. *Saccharomyces cerevisiae* pneumonia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1.689-1.691.
80. Doyle MG, Pickering LK, O'Brien N, Hoots K, Benson JE. *Saccharomyces cerevisiae* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9: 850-851.
81. Aucott JN, Fayen J, Grossnicklas H, Morrissey A, Lederman MM, Salata RA. Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae*: report of three cases and review. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 406-411.
82. Chertow GM, Marcantonio ER, Wells RG. *Saccharomyces cerevisiae* empyema in a patient with esophago-pleural fistula complicating variceal sclerotherapy. *Chest* 1991; 99: 1.518-1.519.
83. Sobel JD, Vázquez J, Lynch M, Meriwether C, Zervos MJ. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: Epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 93-99.
84. Walling DM, McGraw DJ, Merz WG, Karp JE, Hutchins GM. Disseminated infection with *Trichosporon beigeli*. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 1.013-1.019.
85. Walsh TJ, Melcher GP, Rinaldi MC, Lecciones J, McGough DA, Kelly P, et al. *Trichosporon beigeli*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1.616-1.622.
86. Sidarous MG, O'Reilly MV, Cherubin CE. A case of *Trichosporon beigeli* endocarditis 8 years after aortic valve replacement. *Infect Dis Newsletter* 1992; 11: 60-61.
87. García-Martos P, Mira-Gutiérrez J. *Trichosporon* y tricosporonosis: a propósito de 13 casos. *Rev Iberoam Micol* 1995; 12: 111-113.
88. Davey KG, Szekely A, Johnson EM, Warnock DW. Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for *in vitro* susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 439-444.
89. Torres-Rodríguez JM, Sabaté M, Gallach C, Carrillo A, Madrenys N. Sensibilidad *in vitro* a la 5-fluorocitosina y anfotericina B de levaduras del género *Candida* aisladas en Barcelona. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990; 8: 91-93.



90. Carceller A, Torres-Rodríguez JM, Nicolás MC, Madrenys N. Sensibilidad de 210 cepas de *Candida* sp. a 6 antifúngicos utilizando un medio sólido en microplaca. *Rev Iberoam Micol* 1991; 8: 70-74.
91. Arévalo P, Arias A, Anfreu A, Sierra A. Sensibilidad de 278 aislados de *Candida albicans* frente a anfotericina B, fluconazol e itraconazol. *Rev Iberoam Micol* 1992; 9: 94-96.
92. Burgos A, Bikandi J, Fernández-Rodríguez M, Pontón J, Cisterna R, Quindós G. Correlación entre los serotipos A y B de *Candida albicans* y su sensibilidad a anfotericina B y 5-fluorocitosina. *Rev Esp Quimioterapia* 1992; 5: 79-85.
93. Drutz DJ, Lehrer RI. Development of amphotericin B-resistant *Candida tropicalis* in a patient with defective leukocyte function. *Am J Med Sci* 1978; 276: 77-92.
94. Seidenfeld SM, Cooper BH, Smith JW, Luby JP, Mackowiak PA. Amphotericin B tolerance: a characteristic of *Candida parapsilosis* not shared by other *Candida* species. *J Infect Dis* 1983; 147: 116-119.
95. Merz WG. *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 1.194-1.195.
96. Dick JD, Rosengard BR, Merz WG, Stuart RK, Hutchins GM, Saral R. Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida guilliermondii*. *Ann Intern Med* 1985; 102: 67-68.
97. Merz WG, Karp JE, Schron D, Saral R. Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 581-584.
98. Bryce EA, Roberts FJ, Sekhon AS, Coldman AJ. Yeast in blood cultures. Evaluation of factors influencing outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 233-237.
99. Sterling TR, Gasser RB, Ziegler A. Emergence of resistance to amphotericin B during therapy for *Candida glabrata* infection in an immunocompetent host. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 187-188.
100. Lozano-Chiu M, Lancaster MU, Rex JH. Evaluation of a colorimetric method for detecting amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31: 417-424.
101. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 1991; 325: 1.274-1.277.
102. Fox R, Neal KR, Leen CL, Ellis ME, Mandal BK. Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. *J Infect* 1991; 22: 201-204.
103. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1-8.
104. Barchiesi F, Colombo AL, McGrough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. *In vitro* activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1.530-1.533.
105. Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL. Patterns of *in vitro* activity of itraconazole and imidazole antifungal agents against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1.512-1.516.
106. Galán-Sánchez F, García-Martos P, Rodríguez-Ramos C, Marín-Casanova P, Mira-Gutiérrez J. Microbiological characteristics and susceptibility patterns of strains of *Rhodotorula* isolated from clinical samples. *Mycopathologia* 1999; 145: 109-112.
107. Arzeni D, Del Poeta M, Simonetti O, Offidami AM, Lamura L, Balducci M, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of vaginal yeasts in patients attending a gynecological center in Ancona, Italy. *Eur J Epidemiol* 1997; 13: 447-450.
108. D'Antonio D, Mazzoni A, Iacome A, Violante B, Capuani MA, Schioppa F, et al. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Blastoschizomyces capitatus* causing nosocomial infections in cancer patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 753-755.
109. Walsh TJ, Viviani MA, Arathoon E, Chiou C, Ghannoum M, Groll AH, et al. New targets and delivery systems for antifungal therapy. *Med Mycol* 2000; 38 (Suppl 1): 335-347.
110. De Pauw BE. New antifungal agents and preparations. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 147-150.