

Susceptibilidad antifúngica de aislados de *Candida* spp. de hemocultivos en un período de cinco años (1997-2001)

María Teresa Durán, David Velasco, Delia Canle, Rita Moure y Rosa Villanueva

Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. A Coruña. España.

INTRODUCCIÓN. Estudiar retrospectivamente la incidencia de candidemia y la sensibilidad a antifúngicos de los aislados de *Candida* spp. de hemocultivos en el período de enero de 1997 a diciembre de 2001 en nuestro hospital.

MÉTODOS. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de anfotericina B, fluconazol, itraconazol y flucitosina se determinaron por el método de microdilución en caldo Sensititre® YeastOne para los 53 aislados en el período de estudio: *C. parapsilosis* (22), *C. albicans* (19), *C. glabrata* (5), *C. krusei* (3), *C. tropicalis* (2) y *C. guilliermondii* (2).

RESULTADOS. La incidencia de candidemia en el período estudiado fue 0,25 episodios por 1.000 admisiones.

C. parapsilosis se aisló del 41,5% de los casos, seguida de *C. albicans* (35,8%), *C. glabrata* (9,4%), *C. krusei* (5,5%), *C. tropicalis* (3,7%) y *C. guilliermondii* (3,7%). El aislamiento de *C. parapsilosis* se asoció significativamente con el Servicio de Neonatología-Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de Pediatría. No hubo ningún aislado con CIM > 1 µg/ml de anfotericina B. Todos los aislados de *C. krusei* fueron resistentes a fluconazol y la resistencia a itraconazol se encontró en el 80% de los aislados de *C. glabrata* que además fueron susceptibles dependiendo de la dosis de fluconazol. Hubo un único aislado de *C. parapsilosis* resistente a flucitosina.

CONCLUSIONES. La incidencia de candidemia en nuestro hospital fue baja. *C. parapsilosis* fue la especie más común y se asoció con el Servicio de Neonatología-UCI de Pediatría. La resistencia a fluconazol e itraconazol sólo se encontró entre los aislados de *C. krusei* y *C. glabrata*, que son el 15% del total de aislados de *Candida* spp. de hemocultivos en nuestro hospital.

Palabras clave: Resistencia a fármacos. Resistencia a antifúngicos. *Candida*. Fungemia.

Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from blood cultures in a five-year period (1997-2001)

INTRODUCTION. This retrospective study investigates the incidence of candidemia and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from blood cultures performed in the period from January 1997 to December 2001.

METHODS. Amphotericin B, fluconazole, itraconazole and flucytosine minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using the Sensititre® YeastOne broth microdilution assay for the 53 isolates detected in the study period: *C. parapsilosis* (22), *C. albicans* (19), *C. glabrata* (5), *C. krusei* (3), *C. tropicalis* (2) and *C. guilliermondii* (2).

RESULTS. The incidence of candidemia was 0.25 episodes per 1000 admissions in the period studied. *C. parapsilosis* was present in 41.5% of cases, followed by *C. albicans* (35.8%), *C. glabrata* (9.4%), *C. krusei* (5.5%), *C. tropicalis* (3.7%) and *C. guilliermondii* (3.7%). Isolation of *C. parapsilosis* was significantly associated with the neonatal and pediatric ICU. None of the isolates presented an amphotericin B MIC > 1 µg/ml. All the *C. krusei* isolates were resistant to fluconazole. Itraconazole resistance and dose-dependent fluconazole susceptibility was found in 80% of *C. glabrata* isolates. Only one *C. parapsilosis* isolate was resistant to flucytosine.

CONCLUSIONS. The incidence of candidemia in our hospital was low. *C. parapsilosis* was the most common species and was associated with neonatal and pediatric ICUs. Fluconazole and itraconazole resistance was only found among *C. krusei* and *C. glabrata* isolates, which accounted for 15% of the total *Candida* spp. isolated from blood cultures in our hospital.

Key words: Drug resistance. Antifungal resistance. *Candida*. Fungemia.

Introducción

En la década de 1980, *Candida albicans* era la especie de *Candida* que causaba mayor número de infecciones fúngicas nosocomiales, seguida por otras especies no *albicans*^{1,2}. En la pasada década se ha informado un aumento en la incidencia de la candidemia nosocomial y un aumento en el número de estas infecciones debidas a especies no *albicans*²⁻⁵, así como una variación geográfica

Correspondencia: Dra. M^a T. Durán.
Servicio de Microbiología.
Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo.
Ctra. de las Xubias, s/n. 15006 A Coruña. España.
Correo electrónico: tduran@canalejo.org

Manuscrito recibido el 07-11-2002; aceptado el 12-02-2003.

TABLA 1. Incidencia de candidemia (n.º de casos/1.000 ingresos) por servicio de hospitalización y global por año de estudio y en el periodo estudiado (1997-2001)

Servicio	1997	1998	1999	2000	2001	1997-2001
Neonatología-UCI de Pediatría	4,10 (5)	4,75 (6)	2,05 (3)	0 (0)	3,50 (5)	2,70 (19)*
Servicios médicos	0,20 (4)	0,09 (2)	0,04 (1)	0,07 (2)	0,14 (4)	0,10 (13)
Servicios quirúrgicos	0,16 (4)	0 (0)	0,10 (2)	0,05 (1)	0,09 (2)	0,08 (9)
UCI-REA de adultos	0 (0)	0,58 (2)	0 (0)	0,53 (2)	0,46 (2)	0,33 (6)
Oncohematología	0,94 (1)	0 (0)	2,06 (2)	0,97 (1)	2,93 (2)	1,38 (6)**
Global	0,34 (14)	0,25 (10)	0,19 (8)	0,14 (6)	0,34 (15)	0,25 (53)

El número entre paréntesis indica el número de episodios de candidemia.

*p < 0,0001 comparado con los resultados en servicios médicos, quirúrgicos y UCI-REA de adultos.

**p < 0,0001 comparado con los resultados en servicios médicos y quirúrgicos; p < 0,041 comparado con el resultado en UCI-REA de adultos.

en la distribución de especies y en la susceptibilidad a azoles^{3,4}.

Desde el año 1997 se dispone de una técnica de referencia para estudiar la sensibilidad *in vitro* de *Candida* spp. a los antifúngicos y de puntos de corte para interpretar la sensibilidad de los aislados de *Candida* a fluconazol, itraconazol y flucitosina⁶.

Sensititre YeastOne[®] es un método de microdilución en caldo colorimétrico, comercial, basado en la metodología del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)⁶ que utiliza azul alamar, un indicador de oxidoreducción que al cambiar de color permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un hongo de una manera objetiva. Este método ha presentado un alto grado de reproducibilidad inter e intralaboratorio⁷ y una concordancia $\geq 85\%$ con el método de referencia para la mayoría de las especies de *Candida* spp. con los antifúngicos ensayados⁸⁻¹⁰.

El objetivo de este trabajo es estudiar retrospectivamente la incidencia de candidemia y la sensibilidad a antifúngicos de los aislados, en el período comprendido entre los años 1997 y 2001 en nuestro hospital, un centro terciario que atiende a una población de aproximadamente 500.000 habitantes.

Métodos

Aislados

Se revisaron los archivos del Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, A Coruña (España), para detectar todos los aislados de *Candida* spp. de hemocultivos en el período estudiado.

La candidemia se definió como el aislamiento de *Candida* spp. en al menos un hemocultivo de un paciente con signos y síntomas de infección. En el estudio se incluyó un único aislado por episodio.

Durante este período, los hemocultivos se realizaron usando los sistemas BacTAlert[®] (Organon) e Isolator[®] lisis centrifugación (Dupont).

Los aislados de *Candida* spp. se identificaron con el sistema de identificación de levaduras ID 32C (bioMérieux) y por características morfológicas microscópicas sobre agar *cornmeal* con *tween* 80.

Se estudiaron un total de 53 aislados de *Candida* spp.: *C. parapsilosis* (22), *C. albicans* (19), *C. glabrata* (5), *C. krusei* (3), *C. tropicalis* (2) y *C. guilliermondii* (2).

Las levaduras aisladas se cultivaron en agar Sabouraud dextrosa (BBL, Becton Dickinson, EE.UU.) durante 24 h a 35 °C. Cinco colonias de > 1 mm de cada aislado se suspendieron en 5 ml de agua destilada estéril y la suspensión se ajustó espectrofotométricamente al estándar 0,5 de McFarland.

Pruebas de sensibilidad a antifúngicos

Las CIM de fluconazol, itraconazol, flucitosina y anfotericina B se determinaron usando el método colorimétrico de microdilución en medio líquido Sensititre YeastOne[®]. Los ensayos se realizaron y se interpretaron siguiendo las instrucciones del fabricante (IZASA).

Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 48 h. Las CIM de los antifúngicos azoles y flucitosina se leyeron después de 24 h si el pocillo de control de crecimiento cambiaba completamente de azul a rojo, y se interpretó como la concentración más baja de antifúngico que producía un cambio de color con respecto al pocillo control de crecimiento (primer pocillo de color púrpura). Si después de 24 h de incubación, el pocillo control continuaba azul, la lectura se realizaba a las 48 h.

La CIM de anfotericina B se leyó invariablemente a las 48 h y se interpretó como la concentración más baja de antifúngico que producía un cambio completo en el indicador de azul a rojo.

Los aislados se consideraron sensibles (S), sensibles dependiente de la dosis (S-DD), intermedios (I) o resistentes (R), siguiendo la normativa NCCLS (1997) para los antifúngicos ensayados. Se calcularon las CIM₅₀, CIM₉₀, rango de CIM, porcentajes de resistencias y porcentajes de aislados con sensibilidad disminuida (incluye aislados R + S-DD o R + I).

Control de calidad

El control de inóculo y su pureza se verificaron sembrando cuantitativamente 10 μ l de la suspensión de trabajo en placas de agar sangre y CHROMAgar *Candida*. Las placas se incubaron durante 24-72 h a 35 °C. Tras la incubación se comprobó que la densidad del inóculo era $1,5-8 \times 10^3$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml como recomienda el fabricante y que sólo se aislaba la levadura objeto de estudio.

Cada lote de paneles Sensititre se controló ensayando las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Análisis estadístico

La tendencia de la incidencia de candidemia se estudió con el estadístico chi cuadrado (χ^2) de tendencia lineal.

La comparación de porcentajes de incidencia se realizó con el estadístico χ^2 .

La comparación de la distribución de especies en relación con otras variables cualitativas se realizó por el estadístico χ^2 para asociación de variables cualitativas.

Se consideró significativo un valor p < 0,05.

Resultados

Entre los años 1997 y 2001 se detectaron 53 episodios de candidemia en 52 pacientes. Un paciente tuvo dos episodios separados de candidemia por dos especies de *Candida* diferentes. Todos los episodios estuvieron causados por una única especie. Los aislados fueron: 22, *C.*

TABLA 2. Número de aislados de *Candida* spp. por servicio de hospitalización

Servicio	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. guilliermondii</i>
Neonatología-UCI de Pediatría	15 [*]	3				1
Servicios médicos	2	8		3		
Servicios quirúrgicos	2	3	2		1	1
UCI-REA de adultos	1	3	2			
Oncohematología	2	2	1		1	
Total (%)	22 (41,5)	19 (35,8)	5 (9,4)	3 (5,5)	2 (3,7)	2 (3,7)

^{*}Asociación entre aislamiento de *Candida parapsilosis* y Servicio de Neonatología-UCI de Pediatría (p = 0,001).

TABLA 3. Susceptibilidad de *Candida* spp. de hemocultivos (1997-2001)

Especie	Fármaco	Rango de CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)	S-DD (%)	I (%)	Sensibilidad disminuida (%)
<i>C. parapsilosis</i> (22)	Fluconazol	0,25-4	0,5	2				0
	Itraconazol	≤ 0,016-0,25	0,06	0,125				0
	Flucitosina	≤ 0,03-128	0,25	1	4,5			4,5
	Anfotericina B	0,25-1	0,5	1				0
<i>C. albicans</i> (19)	Fluconazol	≤ 0,125-1	0,125	0,25				0
	Itraconazol	≤ 0,016-0,06	0,06	0,06				0
	Flucitosina	≤ 0,03-2	0,125	0,25				0
	Anfotericina B	0,25-0,5	0,5	0,5				0
<i>C. glabrata</i> (5)	Fluconazol	0,25-32				80		80
	Itraconazol	0,03-2			80			80
	Flucitosina	≤ 0,03-0,25						0
	Anfotericina B	0,25-0,5						0
<i>C. krusei</i> (3)	Fluconazol	8-32			100			100
	Itraconazol	0,03-0,25				65		65
	Flucitosina	2-8					33	33
	Anfotericina B	≤ 0,06-1						0
<i>C. tropicalis</i> (2)	Fluconazol	0,25-1						0
	Itraconazol	≤ 0,016-0,25				50		50
	Flucitosina	≤ 0,03-0,25						0
	Anfotericina B	0,25-0,5						0
<i>C. guilliermondii</i> (2)	Fluconazol	2-8						0
	Itraconazol	0,25-0,5				100		100
	Flucitosina	≤ 0,03-16					50	50
	Anfotericina B	≤ 0,06-0,25						0
Total (53)	Fluconazol	≤ 0,125-32	0,5	16	5,6	7,5		13,1
	Itraconazol	0,016-2	0,06	0,25	7,5	11,3		18,8
	Flucitosina	≤ 0,03-128	0,125	2	1,8		3,7	5,5
	Anfotericina B	0,06-1	0,5	1	0			0

CIM: concentración inhibitoria mínima; R: resistente; S-DD: sensible dependiente de la dosis; I: resistencia intermedia.

parapsilosis (41,5%); 19, *C. albicans* (35,8%); 5, *C. glabrata* (9,43%); 3, *C. krusei* (5,66%); 2, *C. tropicalis* (3,77%) y 2, *C. guilliermondii* (3,77%).

En la tabla 1 se indican el número de episodios y la incidencia de candidemia global y en cada servicio por año y en el período de estudio. La incidencia de candidemia se expresa en número de episodios por 1.000 admisiones.

Se observó que no existía tendencia ascendente ni descendente en la incidencia de candidemia en el período estudiado, ni globalmente ni por servicio de hospitalización.

También se analizó en qué servicios de hospitalización fue mayor la incidencia de candidemia en estos 5 años y se observó que era significativamente mayor en los servicios neonatología-unidad de cuidados intensivos (UCI) de

pediatría y oncohematología que en el resto de servicios hospitalarios (p < 0,05). No hubo diferencia significativa comparando la incidencia de candidemia entre estos dos servicios y tampoco la hubo cuando se comparó la incidencia entre los servicios médicos, quirúrgicos y UCI-Reanimación de adultos entre sí.

En la tabla 2 se muestra la distribución de especies de *Candida* según el servicio de hospitalización. El aislamiento de *C. parapsilosis* se asoció significativamente al Servicio de Neonatología-UCI de Pediatría (p = 0,001). En este servicio no se pudo encontrar asociación significativa entre el aislamiento de *C. parapsilosis* con alguno de los años estudiados.

En la tabla 3 se detallan las CIM₅₀, CIM₉₀, rango de CIM y los porcentajes de resistencias y de aislados con

sensibilidad disminuida obtenidos para los 53 aislados de *Candida* spp. Debido a que el número de aislados de especies distintas de *C. parapsilosis* y *C. albicans* es bajo, no se dan cifras de CIM₅₀ y CIM₉₀ para estas especies.

No se encontró ningún aislado para el que la CIM de anfotericina B fue > 1 µg/ml.

El 13,1% de aislados ensayados tuvieron sensibilidad disminuida a fluconazol (CIM > 8 µg/ml), ya que cuatro de las cinco *C. glabrata* ensayadas fueron S-DD de este azol y *C. krusei* presenta resistencia intrínseca.

El 18,8% de los aislados ensayados presentaron sensibilidad disminuida a itraconazol (CIM > 0,125 µg/ml). Seis aislados fueron S-DD de itraconazol (2, *C. krusei*; 2, *C. guilliermondii*; 1, *C. parapsilosis*, y 1, *C. tropicalis*) y cuatro *C. glabrata* fueron resistentes. Los aislados de *C. glabrata* resistentes a itraconazol fueron S-DD de fluconazol, indicando resistencia cruzada total en *C. glabrata* entre los dos azoles.

En cuanto a flucitosina, dos aislados presentaron resistencia intermedia (1, *C. guilliermondii*, y 1, *C. glabrata*) y uno resistencia completa (1, *C. parapsilosis*).

Discusión

La incidencia media de candidemia en nuestro hospital en los últimos 5 años fue 0,25/1.000 ingresos, una cifra baja comparada con la que informan estudios recientes en España^{2,11}. Por otro lado, no se ha observado ninguna tendencia en la evolución de la incidencia ni global ni por servicio de hospitalización en el período estudiado.

Un programa de vigilancia de resistencias a antimicrobianos en organismos que producen bacteriemia y fungemia en hospitales de Estados Unidos, Canadá, América Latina y Europa (SENTRY) ha detectado entre los años 1997 y 2000 que el 55% de las fungemias por levaduras estuvieron causadas por *C. albicans*, seguida por *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (15%), *C. tropicalis* (9%) y otras (6%), observando una variación geográfica en la prevalencia de las especies. Así, *C. albicans* tuvo mayor prevalencia en Canadá (60%) que en Europa (58%), Estados Unidos (55%) y América Latina (45%). Respecto a las especies no *albicans*, *C. glabrata* fue significativamente más prevalente en Estados Unidos que en el resto de países y *C. parapsilosis* lo fue más en América Latina y Europa que en Estados Unidos¹².

Los últimos datos publicados de nuestro país sobre candidemia en un estudio en el que se incluyen aislados procedentes de 55 hospitales en el período 1996-1999¹³ indican que las especies no *albicans* causan más episodios de fungemia que *C. albicans*; y *C. parapsilosis* es la especie más prevalente con 39,1% de los aislados, seguida por *C. albicans* (30,2%), *C. tropicalis* (10,7%), *C. glabrata* (9,5%), *C. krusei* (5,1%), *C. guilliermondii* (3,3%) y otras *Candida* spp. (2,2%), una prevalencia de especies y un orden de frecuencia muy similar a la que se encuentra en nuestro hospital. Sin embargo, esto puede no representar la situación de cada centro hospitalario. De hecho, estudios recientes sobre candidemia en dos hospitales españoles comunican cifras diferentes. Uno de ellos informa que *C. albicans* fue el agente causal del 66% de los episodios de candidemia en el período

1993-1998¹¹, mientras que otro comunica que, en 1996, *C. albicans* sólo producía el 28% de los episodios².

En nuestro estudio, *C. parapsilosis* fue la especie más prevalente y se asoció de manera significativa al Servicio de Neonatología-UCI de Pediatría. No obstante, otros estudios informan que *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia en pacientes pediátricos seguida en orden de frecuencia, pero con cifras muy inferiores, por *C. parapsilosis*^{14,15}.

Aunque se han descrito brotes nosocomiales de candidemia por *C. parapsilosis*⁶, en nuestro estudio no pudo apreciarse que la asociación entre esta especie y el Servicio de Neonatología-UCI de Pediatría se debiera a un brote, ya que el número de episodios por año fue bajo, no se presentaron en un corto intervalo de tiempo y el aislamiento de *C. parapsilosis* en este servicio no se asoció de manera significativa con ningún año concreto del período estudiado.

Otros autores también han informado *C. parapsilosis* como especie predominante en sangre respecto a otras especies en hospitales infantiles, en situación diferente a una epidemia, donde el aislamiento de *C. parapsilosis* se asociaba de manera significativa con prematuridad, presencia de un catéter venoso central y uso de nutrición parenteral total¹⁷.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* indican que para todos nuestros aislados la CIM de anfotericina B fue ≤ 1 µg/ml. Es aceptado que la metodología NCCLS y el uso de alamar en los paneles de microdilución no diferencia aislados de *Candida* spp. resistentes de sensibles^{18,19} a este antifúngico, aunque recientemente y con metodología NCCLS se han informado aislados para los que la CIM de anfotericina B es ≥ 2 µg/ml preferentemente en las especies *C. glabrata* y *C. krusei*¹⁵.

Un porcentaje del 5,5% de nuestros aislados presentaron sensibilidad disminuida a flucitosina, resultado similar a lo informado en otros estudios^{3,4,10,13,20}.

Los porcentajes de aislados de *Candida* spp. resistentes a fluconazol e itraconazol en nuestro estudio fueron bajos (5,6 y 7,5%, respectivamente), aunque los porcentajes de aislados con sensibilidad disminuida (organismos resistentes y sensibles dependiendo de la dosis) fueron más elevados (13,1 y 18,8%, respectivamente). Estos son datos que concuerdan con los recientes informes de sensibilidad de aislados de *Candida* spp. procedentes de hemocultivos en España, Argentina y el programa SENTRY^{13,15,20} aunque, a diferencia de ellos, que encuentran porcentajes bajos de aislados resistentes y con sensibilidad disminuida a fluconazol en especies distintas a *C. krusei* y *C. glabrata*, nosotros sólo encontramos resistencia y sensibilidad disminuida a fluconazol en estas dos especies, quizá debido al bajo número de aislados estudiados.

En conclusión, la incidencia de candidemia en nuestro hospital fue baja y no incrementó en los últimos 5 años. *C. parapsilosis* fue la especie aislada con mayor frecuencia y se asoció de manera significativa al Servicio de Neonatología-UCI de Pediatría. La resistencia a fluconazol e itraconazol fue baja, y sólo se encontró entre los aislados de *C. krusei* y *C. glabrata*, que representan el 15% del total de aislados de *Candida* spp. de hemocultivos en nuestro hospital.

Bibliografía

1. Beck-Sagué CM, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the U.S., 1980-1990. *J Infect Dis* 1993;167:1247-51.
2. Muñoz P. Candidemia: el reto que no cesa. *Rev Clin Esp* 1997;197:795-7.
3. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;31:327-32.
4. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program, SCOPE Participant Group. Surveillance and control of pathogens of epidemiologic. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:121-9.
5. Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, et al. The changing face of candidemia: Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996;100:617-23.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27A. Villanova, Pa. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
7. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Plavan H, et al. Multisite reproducibility of MIC results by the Sensititre® YeastOne colorimetric antifungal susceptibility panel. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;31:543-7.
8. 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;42:439-44.
9. 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;37:591-5.
10. Chryssanthou E. Trends in antifungal susceptibility among swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: comparison of the E-test and the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A reference method. *J Clin Microbiol* 2001;39:4181-3.
11. Gómez J, Baños V, Simaarro E, Ruiz J, Requena L, Pérez J, et al. Fungemias nosocomiales en un hospital general: Epidemiología y factores pronóstico. Estudio prospectivo 1993-1998. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19: 304-7.
12. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* 2001;39: 3254-9.
13. Cuenca-Estrella M, Rodero L, García-Effrón G, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *J Antimicrob Chemother* 2000;49:981-7.
14. Hernández-Sampelayo T, Navarro Gómez ML, Hernández Molina JM, Gómez Campderá JA. Importancia de las infecciones fúngicas en Pediatría. *Rev Clin Esp* 1997;197:60-6.
15. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol* 2002;40:852-6.
16. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:499-511.
17. Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, Tucci V, Sood SK. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis* 1997;26:1086-8.
18. Espinel-Ingroff A. Clinical relevance of fungal susceptibility testing and antifungal resistance. *Clin Microbiol Newsl* 2000;22:137-40.
19. Lozano-Chiu M, Lancaster MV, Rex JH. Evaluation of a colorimetric method for detecting amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;31:417-24.
20. Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Estudio multicéntrico sobre fungemias por levaduras en España (abril-junio de 1997). *Rev Clin Esp* 1999; 199:356-61.