

CHROMAgar *Candida* más fluconazol: comparación con técnicas de microdilución

María José Linares, Guadalupe Charriel, Francisco Solís y Manuel Casal

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España.

INTRODUCCIÓN. El aumento del número de infecciones fúngicas, así como la aparición de resistencias a los diversos antifúngicos, ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar estudios de sensibilidad *in vitro* que sean útiles para predecir la evolución clínica de los pacientes con este tipo de infecciones.

MÉTODOS. Se estudia la sensibilidad a fluconazol de 156 aislamientos clínicos de levaduras (109, *Candida albicans*; 19, *C. parapsilosis*; 12, *C. glabrata*; 11, *C. tropicalis*; 2, *C. krusei*; 1, *C. pelliculosa*; 1, *C. lambica*, y 1, *Saccharomyces cerevisiae*) y 2 cepas control (*C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019) usando un método simple de cribado, CHROMAgar *Candida* con fluconazol (8 µg/ml), y se compara con dos métodos de microdilución: el método de referencia del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (documento M27-A) y Sensititre® YeastOne.

RESULTADOS. Sensititre® YeastOne muestra buena correlación con el método de referencia (M27-A del NCCLS) para todas las especies del género *Candida*. La tasa de concordancia para CHROMAgar *Candida* con fluconazol (8 µg/ml) (CHROM-FZ) y los dos métodos de microdilución es buena para aislamientos sensibles o muy resistentes al fluconazol como *C. krusei* y *C. glabrata*, pero no así para las cepas con sensibilidad dependiente de la dosis.

CONCLUSIÓN. El método de cribado, CHROMAgar *Candida* con fluconazol (8 µg/ml), es un método rápido, simple y sensible para la detección e identificación de levaduras sensibles o muy resistentes al fluconazol. Sin embargo, se requiere el empleo de métodos adicionales para determinar si el crecimiento en este medio es debido a que la cepa es resistente a fluconazol (concentración inhibitoria mínima [CIM] ≥ 64 µg/ml) o se trata de una cepa con sensibilidad dependiente de la dosis (CIM entre 16-32 µg/ml). La utilidad del medio CHROMAgar *Candida* con fluconazol depende de la procedencia de la muestra y de la especie estudiada.

Palabras clave: CHROMAgar *Candida* con fluconazol. Levaduras. Fluconazol.

CHROMAgar *Candida* with fluconazole: comparison with microdilution techniques

INTRODUCTION. The increasing incidence of fungal infections and the reported emergence of resistance to antifungal agents call for the development of techniques for *in vitro* measurement of antifungal susceptibility that will enable prediction of clinical outcome in patients suffering from these infections.

METHODS. Susceptibility to fluconazole was tested in 156 clinical yeast isolates (109, *Candida albicans*; 19, *C. parapsilosis*; 12, *C. glabrata*; 11, *C. tropicalis*; 2, *C. krusei*; 1, *C. pelliculosa*; 1, *C. lambica*, and 1, *Saccharomyces cerevisiae*) and two control strains (*C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019) using a simple screening method, CHROMAgar *Candida* with fluconazole (8 µg/ml). This method was compared with two broth microdilution techniques: the reference method (NCCLS, document M27-A) and Sensititre™ YeastOne.

RESULTS. Sensititre™ YeastOne showed close agreement with NCCLS M27-A results for all species (*C. albicans* and non *albicans*). CHROMAgar *Candida* with fluconazole (8 µg/ml) yielded results matching those of the two broth microdilution methods for sensitive strains and strains highly resistant to fluconazole (*C. krusei* and *C. glabrata*), but performed less well with strains displaying dose-dependent susceptibility.

CONCLUSION. These data suggest that CHROMAgar *Candida* with fluconazole (8 µg/ml), appears to be a rapid, simple and sensitive screening method for detection and identification of fluconazole-susceptible and -highly resistant yeasts. However, additional methods should be used to determine whether positive growth in this medium is due to resistant strains (MIC ≥ 64 µg/ml) or to strains displaying dose-dependent susceptibility (MIC 16-32 µg/ml). The usefulness of CHROMAgar *Candida* with fluconazole depends on the sample source and the species under study.

Key words: CHROMAgar *Candida* with fluconazole. Yeasts. Fluconazole.

Introducción

En las últimas décadas, el aumento de las infecciones fúngicas oportunistas junto con la aparición de resistencias a los diversos antifúngicos disponibles, hacen necesario

Correspondencia: Dra. M.ª J. Linares.
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.
Hospital Universitario Reina Sofía.
Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba. España.
Correo electrónico: mi1lisim@uco.es

Manuscrito recibido el 06-02-2003; aceptado el 09-05-2003.

utilizar técnicas para determinar la sensibilidad *in vitro* que posibiliten la correlación de los datos obtenidos en el laboratorio con la evolución clínica de los pacientes¹. Muchos de los hongos emergentes presentan resistencia intrínseca a los antifúngicos clásicos. Simultáneamente aparecen resistencias *in vitro* secundarias, como la resistencia a fluconazol de *Candida albicans* en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con candidiasis orofaríngea². El amplio uso de fluconazol en el tratamiento y prevención de infecciones por levaduras también ha incrementado la detección de cepas con menor sensibilidad³. Todo ello hace necesario disponer de un método rápido para detectar la sensibilidad a fluconazol.

Un avance importante en la identificación de los hongos levaduriformes son los medios diferenciales que permiten la identificación de los aislados por el color y la morfología de las colonias. Los medios cromogénicos, como el CHROMAgar *Candida* son los más utilizados. Cuando se utilizan como medios de aislamiento primario puede realizarse la identificación de algunas especies de *Candida* como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, en 24-48 h^{4,6} basándose en el color de las colonias crecidas en el medio; la morfología y coloración de las colonias también orienta la identificación de otros organismos levaduriformes del género *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Geotrichum* y *Saccharomyces*. CHROM-Agar *Candida*, al mismo tiempo, facilita la diferenciación de algunos de los organismos similares a levaduras importantes en la práctica clínica como es el género *Prototheca*⁷.

El objetivo de este trabajo es determinar la sensibilidad de aislados levaduriformes (obtenidos de muestras clínicas del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba) a fluconazol, utilizando un método de cribado, CHROMAgar *Candida* más fluconazol (CHROM-FZ), que permite detectar levaduras con sensibilidad disminuida al fluconazol. Los resultados obtenidos con el medio evaluado se han comparado con dos métodos de microdilución, un método comercializado Sensititre®/Alamar YeastOne y el método de referencia del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (documento M27-A).

Métodos

Recogida e identificación de cepas

Se estudian un total de 156 aislamientos clínicos que incluyen: 109, *C. albicans*; 19, *C. parapsilosis*; 12, *C. glabrata*; 11, *C. tropicalis*; 2, *C. krusei*; 1, *C. pelliculosa*; 1, *C. lambica*; 1, *Saccharomyces cerevisiae*, procedentes de distintos orígenes: 49, esputos; 33, exudados faríngeos; 28, hemocultivos; 26, abscesos; 10, exudados vaginales; 10, orina.

La identificación de las cepas aisladas se realizó mediante estudio macroscópico (morfología colonial, crecimiento en medio CHROMAgar) y microscópico (morfología, producción de tubo germinal y clamidosporas) y pruebas bioquímicas clásicas⁵.

Aislamientos fúngicos

Todos los aislamientos se conservaron como suspensiones en agua destilada estéril congelados a -70 °C. hasta la realización del estudio. Antes de las pruebas cada aislamiento se cultivó en CHROMAgar *Candida* para asegurar la pureza y el óptimo crecimiento⁸.

Agentes antifúngicos

1. *Método NCCLS*. El polvo valorado de fluconazol fue suministrado por Pfizer Inc. Central Research Division (Groton, Conn. EE.UU.). Para la preparación de las diluciones del antifúngico se siguió el método propuesto por el NCCLS (documento M27-A)^{9,10}. El rango de concentraciones estudiadas de fluconazol fue de 0,125 a 256 µg/ml.

2. *Método Sensititre*®. Las placas vienen preparadas con cinco antifúngicos, entre ellos fluconazol^{11,12}. El rango de dilución para fluconazol es de 0,125 a 256 µg/ml.

3. *Método CHROM-FZ*. Se utilizó medio deshidratado preparado según las instrucciones del fabricante, adicionando fluconazol para conseguir concentraciones de 8 µg/ml¹³. El medio deshidratado contiene cloranfenicol (0,5 g/l), agar (15 g/l), peptona bacteriológica (10,2 g/l) y mezcla cromogénica (22 g/l), después de hervir, de 15 a 30 min, es enfriado a 45 °C en un baño de agua. La solución de fluconazol (2 mg/ml) se añade al medio a 45 °C, obteniendo una concentración final de 8 µg de fluconazol por mililitro de agar. El medio preparado se conserva en oscuridad entre 4 y 15 °C hasta su uso³.

Preparación del inóculo

1. *Método NCCLS*. Según lo referido en el documento M27-A del NCCLS^{9,14}.

2. *Método Sensititre*®. Siguiendo las instrucciones del fabricante¹⁵.

3. *Medio CHROM-FZ*. Las colonias aisladas a partir del cultivo de muestras clínicas se emulsionan en agua destilada estéril^{16,17}; el medio se inocula con 10 µl de una suspensión equivalente al 0,5 de McFarland. En paralelo, con la misma suspensión, se inoculó una placa de CHROMAgar *Candida* sin fluconazol. Las placas se incubaron a 30 °C en atmósfera aerobia, y las lecturas se realizaron a las 24 y 48 h de incubación.

En función de las características del crecimiento, se consideraron sensibles las cepas que desarrollaron colonias visiblemente más pequeñas (como puntas de alfiler) en el medio con fluconazol respecto al medio sin fluconazol y las cepas con igual crecimiento en ambos medios, cepas con sensibilidad disminuida al fluconazol. Los resultados en este estudio fueron leídos siempre por la misma persona. Como controles adicionales se emplearon cepas con sensibilidad conocida para comparar con los aislados testados^{3,6,18}.

Controles de calidad

Como control de calidad en los tres métodos se usaron las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258¹⁹.

Resultados

La tabla 1 muestra el rango de concentración inhibitoria mínima (CIM) (en µg/ml) del fluconazol, obtenido por los dos métodos de microdilución: Sensititre® y el método de referencia (NCCLS, documento M27-A) para las distintas especies incluidas en el estudio. Las especies más sensibles a fluconazol mediante estos dos métodos fueron: *C. parapsilosis* con un rango de CIM entre 1-4 µg/ml según Sensititre® y 0,125-4 µg/ml según NCCLS; *C. pelliculosa*, con una CIM de 2 y 4 µg/ml para Sensititre® y NCCLS, respectivamente, y *C. lambica*, con una CIM de 2 µg/ml. Las más resistentes a fluconazol, por los dos métodos de microdilución, fueron: *C. krusei*, con un rango de CIM entre 128 y > 256 µg/ml según Sensititre® y 64-> 256 µg/ml por el NCCLS y *C. glabrata* con una CIM que osciló desde 32 a > 256 µg/ml por ambos métodos. La CIM de fluconazol para *C. albicans* tuvo valores más variables entre 0,125 y > 256 µg/ml, *C. tropicalis* y *Saccharomyces cerevisiae* tuvieron valores de CIM de fluconazol

TABLA 1. Rango de CIM, CIM₅₀ y CIM₉₀ de fluconazol obtenido por ambos métodos de microdilución (porcentaje de concordancia entre Sensititre® y NCCLS)

Especie	Rango de CIM, CIM ₅₀ y CIM ₉₀ (en µg/ml)		Porcentaje de concordancia entre Sensititre® y NCCLS
	Sensititre®	NCCLS	
<i>Candida albicans</i>	0,125- > 256,4 ≥ 64	0,125- > 256,4 ≥ 64	96,33
<i>C. parapsilosis</i>	1-4, 2, 4	0,125-4, 2, 4	100
<i>C. glabrata</i>	32- > 256, 16, 64	32- > 256, 8, 64	90
<i>C. tropicalis</i>	1-32, 2, 8	2-64, 2, 2	98
<i>C. krusei</i>	128- > 256	64- > 256	
<i>C. pelliculosa</i>	2	4	
<i>C. lambica</i>	2	2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	32	

CIM: concentración inhibitoria mínima; NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

TABLA 2. Número de aislamientos con sensibilidad disminuida a fluconazol

Especies (n.º)	CHROMAgar <i>Candida</i> más fluconazol. Lectura:		Sensititre®**			Método de referencia (NCCLS, documento M27-A)*		
	24 h	48 h	S-DD	R	Total	S-DD	R	Total
<i>Candida albicans</i> (109)	41	58	35	20	55	33	23	56
<i>C. parapsilosis</i> (19)	2	4	2	0	2	2	0	2
<i>C. glabrata</i> (12)	10	12	5	7	12	6	6	12
<i>C. tropicalis</i> (11)	2	4	4	0	4	3	1	4
<i>C. krusei</i> (2)	2	2	0	2	2	0	2	2
<i>C. pelliculosa</i> (1)	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>C. lambica</i> (1)	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)	1	1	0	1	1	1	0	1

*En ambos medios de microdilución se consideró: SDD: CIM entre 8-32 µg/ml; R: CIM ≥ 64 µg/ml.

S-DD: sensible dependiente de la dosis; R: resistente; NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

encuadrados como sensibles o sensibles dependiendo de la dosis.

La concordancia entre ambos métodos de microdilución (en aquellas especies cuyo número de cepas estudiadas fue superior a 10) fue mayor o igual al 90%, siendo mayor para las especies *C. tropicalis* con una concordancia entre ambos métodos del 98%, y *C. parapsilosis* con una concordancia del 100%. La correlación entre la CIM₅₀ y CIM₉₀ por ambos métodos de microdilución para *C. albicans* y *C. parapsilosis* fue del 100%.

En la tabla 2 se presenta el número de aislamientos con sensibilidad disminuida al fluconazol, según el procedimiento empleado.

Para la evaluación de los resultados se debe tener en cuenta que el medio CHROM-FZ permite diferenciar cepas sensibles (CIM ≤ 8 µg/ml) a fluconazol de aquellas con sensibilidad disminuida al fluconazol (CIM ≥ 16 µg/ml), mientras que ambos métodos de microdilución permiten distinguir, dentro de las cepas con sensibilidad disminuida, las cepas sensibles dependiendo de la dosis (CIM, 16-32 µg/ml) y las resistentes (CIM ≥ 64 µg/ml). Por lo cual al comparar los tres métodos, se consideran como resistentes el número de cepas sensibles dependiendo de la dosis y las resistentes a fluconazol.

Comparando en porcentajes la resistencia a fluconazol mediante el medio CHROM-FZ y los dos métodos de microdilución se observa que para el total de cepas estudiadas (n = 156) en el medio CHROM-FZ se obtienen

53,20% de cepas con sensibilidad disminuida al fluconazol o con una CIM ≥ 16 µg/ml en la lectura a las 48 h; mientras que con el método Sensititre® y el de referencia del NCCLS los porcentajes son del 48,71 y 49,35%, respectivamente.

El 3,85% de las cepas estudiadas (6 cepas) con crecimiento en el medio CHROM-FZ fueron sensibles con el método de referencia del NCCLS. Este porcentaje incluye las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*. No se encontraron cepas resistentes por el método de referencia y sensibles en el medio CHROM-FZ. El 53,21% de las cepas de *C. albicans* mostraron sensibilidad disminuida al fluconazol en el CHROM-FZ, mientras que en el Sensititre® y en el método de referencia el porcentaje fue del 50,45 y 51,37%, respectivamente. En la especie *C. parapsilosis*, un 21,05% de las cepas estudiadas mostraron sensibilidad disminuida al fluconazol en el medio CHROM-FZ. Este porcentaje fue menor para el Sensititre® y el NCCLS (10,52%).

Estos resultados demuestran un alto porcentaje de resistencia al fluconazol, sobre todo de la especie *C. albicans*, una especie tradicionalmente sensible a este azol².

La mayor concordancia entre los tres procedimientos empleados se produce para tres especies: *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Las 12 cepas estudiadas de *C. glabrata* mostraron sensibilidad disminuida al fluconazol por los tres métodos; de las 11 cepas de *C. tropicalis*, el 36,36% presentaron sensibilidad disminuida al fluconazol

por el CHROM-FZ y los dos métodos de microdilución y las 2 cepas estudiadas de *C. krusei* mostraron sensibilidad disminuida con los tres métodos utilizados.

Discusión

Idealmente, las pruebas de sensibilidad antifúngica deben ser fáciles de realizar, con una buena relación coste-eficacia y que proporcionen puntos de corte de las CIM que sean reproducibles y puedan determinarse con prontitud tras un corto período de incubación^{19,20}.

Para obviar los inconvenientes que se presentan con el uso del método de referencia para levaduras (NCCLS, documento M27-A) por su laboriosidad, nosotros hemos determinado la sensibilidad disminuida al fluconazol mediante un método sensible, pero más rápido y económico, CHROM-FZ. Este medio tuvo una doble utilidad, tanto en la identificación como en la detección de la sensibilidad de las cepas a fluconazol. Los patrones de color de las levaduras observados en el CHROMAgar *Candida* también ayudaron en la comparación del crecimiento de las colonias en medio con y sin fluconazol, permitiendo una mayor rapidez en la identificación de las cepas resistentes.

En el estudio realizado, el número de cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. pelliculosa* que presentaban sensibilidad disminuida a fluconazol se incrementó en la lectura a las 48 h, respecto a la de 24 h. Entre las cepas de *C. albicans*, 17 cepas mostraron menor crecimiento y/o diferente color (verde más claro o blanco) tras 24 h de incubación comparado con el observado a las 48 h (verde). De las 4 cepas de *C. parapsilosis* que crecieron a las 48 h (color blanco, blanco rosáceo o rosa crema), una de ellas tuvo menor crecimiento y una coloración distinta (blanca que pasaría a rosa cremosa) a las 24 h. En la especie *C. glabrata* dos de las cepas que se mostraron sensibles a las 24 h, crecieron a las 48 h (coloración violeta, rosa violácea o morada). Igual ocurrió con *C. tropicalis* donde, a las 24 h, sólo crecieron 2 cepas, mientras que tras 48 h, se identificaron 4 cepas con sensibilidad disminuida a fluconazol, dando una coloración azul, azul-turquesa o violeta gris. Para *C. pelliculosa* la única cepa estudiada no tuvo crecimiento a las 24 h pero sí a las 48 h (color rosa-violeta).

En el medio CHROM-FZ la discordancia entre las dos lecturas, a las 24 y 48 h, puede deberse a la necesidad de algunas cepas de mayor tiempo de incubación para mostrar crecimiento. Las especies *C. krusei*, *C. lambica* y *S. cerevisiae* mostraron mayor concordancia en la lectura a las 24 y 48 h, consiguiendo el mismo número de cepas con sensibilidad disminuida al fluconazol, aunque este resultado no se puede considerar significativo por el escaso número de cepas estudiadas.

Comparando los tres procedimientos empleados para determinar la sensibilidad disminuida al fluconazol (CHROM-FZ y los dos métodos de microdilución), se observa que para la mayoría de las especies, sobre todo *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* existe una alta correlación entre ellos, siempre que en los métodos de microdilución consideremos como sensibilidad disminuida al fluconazol, tanto aquellas cepas cuyo rango de CIM sea de sensibilidad dependiente de la dosis (CIM, 16-32 µg/ml)

como las que presentan una CIM ≥ 64 µg/ml (resistentes). Esta distinción no es posible cuando se emplea el medio CHROM-FZ, por lo cual muchas de las cepas que se consideran con sensibilidad disminuida en este medio en realidad son cepas con sensibilidad dependiente de las dosis. Sin embargo, esto no afectaría a algunas especies como *C. krusei* que concuerda perfectamente con los resultados obtenidos en el CHROM-FZ.

Estos resultados indican que las levaduras aisladas a partir de muestras clínicas, de las que generalmente se aíslan cepas con sensibilidad dependiente de la dosis de fluconazol, como esputo o exudados orofaríngeos, en nuestro estudio el 52,56% del total de muestras, el CHROM-FZ presenta una baja especificidad, ya que sólo determina sensibilidad o resistencia, y por tanto, en estos casos sería necesario aplicar otros métodos como los de microdilución expuestos en este trabajo. Sin embargo, en el estudio de muestras de otras procedencias como exudados vaginales, hemocultivos, etc., a partir de las que generalmente se aíslan menor número de cepas con sensibilidad dependiente de la dosis, el medio CHROM-FZ puede representar un método rápido de cribado para determinar sensibilidad o resistencia al fluconazol.

La utilidad de esta técnica también va a depender de la especie estudiada; así, en especies con mayor resistencia al fluconazol, como *C. krusei*, se consigue mayor beneficio con el medio CHROM-FZ.

Se han logrado grandes avances en los métodos disponibles para probar la sensibilidad antifúngica de las levaduras. Los métodos colorimétricos Sensititre® y CHROM-FZ evaluados en el presente estudio proporcionan una mayor rapidez de resultados en comparación con los obtenidos por el método de referencia NCCLS M27-A. Algunos autores piensan que el método colorimétrico es un método subjetivo para definir la CIM, que en ocasiones se basa en un leve cambio de color¹².

Los azoles, desde su introducción (fluconazol en 1990 e itraconazol en 1992), se han empleado ampliamente para el tratamiento de las micosis. El empleo de fluconazol se ha incrementado como profilaxis primaria, terapéutica empírica y para profilaxis secundaria. El aumento de la resistencia a los azoles se ha encontrado fundamentalmente en pacientes infectados con VIH que desarrollan con frecuencia candidiasis orofaríngeas, pero también en pacientes no infectados con VIH y en pacientes no expuestos previamente a antifúngicos.

La prevalencia de las infecciones debidas a organismos levaduriformes resistentes a los azoles se ha estimado entre 21-32% en pacientes sintomáticos²¹; estos datos concuerdan con nuestros resultados para los métodos de microdilución (19,23% en el Sensititre® y 20,51% en el método de referencia del NCCLS) y menos en el caso del medio CHROM-FZ (53,20%), ya que éste incluye no sólo cepas resistentes (CIM ≥ 64 µg/ml), sino también aquellas sensibles dependiendo de la dosis (CIM entre 16-32 µg/ml).

No hay muchos trabajos publicados acerca de la validez del medio CHROM-FZ para detectar la sensibilidad o resistencia de las cepas a fluconazol. En un trabajo publicado por Patterson et al¹³ en 1996 se hace referencia a la idoneidad del método para diferenciar de forma rápida y sensible las cepas sensibles o resistentes al fluconazol, tomando el valor de 8 µg/ml como el punto de

corte para señalar sensibilidad³. Verghese et al¹⁸ refieren la concordancia entre las cepas encontradas resistentes al fluconazol por el medio del CHROM-FR (con 8 y 16 µg/ml de fluconazol) y por una técnica de macrodilución. Canle et al²² obtienen una gran concordancia entre el método de CHROMAgar *Candida* con 8 µg/ml de fluconazol con el Sensititre® para las especies de *C. albicans* y de *C. parapsilosis*. Existen algunos estudios realizados que tratan de relacionar el tamaño de las colonias obtenidas en las placas de CHROM-FZ con la CIM para estas cepas²³.

Por todo ello, en vista de nuestros resultados, pensamos que el medio CHROMAgar *Candida* más 8 µg/ml de fluconazol puede ser utilizado para determinar sensibilidad o sensibilidad disminuida al fluconazol, indicando claramente las cepas sensibles al fluconazol mediante la ausencia de crecimiento. Sin embargo, para poder determinar si el crecimiento en el medio representa realmente una cepa resistente (CIM \geq 64 µg/ml) o si se trata de cepas con sensibilidad dependiente de la dosis (CIM entre 16-32 µg/ml), debe realizarse un estudio mediante otras técnicas, en laboratorios de micología clínica experimentados en técnicas de sensibilidades a antifúngicos. La utilidad del medio CHROM-FZ dependerá de la procedencia de la muestra y de la especie estudiada.

Agradecimiento

Nuestro más sincero agradecimiento a Dña. Josefa González López, Técnico Especialista de Laboratorio, por su gran ayuda técnica.

Bibliografía

- Viudes C, Cantón E, Pemán J, López-Ribot JL, Gobernado M. Correlación entre las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y la evolución clínica de los pacientes con candidiasis y criptococosis. *Rev Esp Quimioterap* 2002;15:32-42.
- Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996;22:S112-8.
- Patterson TF, Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Fothergill AW, Mc Carthy DI, et al. Comparative evaluation of macrodilution and chromogenic agar screening for determining fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1996;34:3237-9.
- Bouchara JP, Declerck P, Cimon B, Planchenault C, De Gentile L, Chabasse D. Routine use of CHROMAgar *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. *Clin Microbiol Infect* 1996;2:202-8.
- Linares MJ, Solís F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo MC, editores. Guía Práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica, 1ª ed. Bilbao: Rev Iberoam Micol, 2001; p. 11-1 a 11-18.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMAgar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 1994;32:1923-9.
- Casal M, Linares MJ, Solís F, Rodríguez FC. Appearance of colonies of *Prototheca* on CHROMAgar *Candida* medium. *Mycopathol* 1997;137:79-82.
- Marco F, Pfaller MA, Messer S, Jones RN. *In vitro* activities of voriconazole (UK-109.4496) and four other antifungal agents against 394 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:161-3.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27-A. Villanova, 1997.
- Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingróff A, Ghaoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Reviews* 2001;14:643-58.
- Espinel-Ingróff A, Warnock DW, Vázquez JA, Arthington-Skaggs BA. *In vitro* antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. *Med Mycol* 2000;38:293-304.
- Espinel-Ingróff A, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Macrodilution Method M27-P for *in vitro* testing of fluconazole-resistant and -susceptible isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1995;33:3154-8.
- Patterson TF, Revankar SG, Kirkpatrick WR, Dib O, Fothergill AW, Redding SW, et al. Simple method for detecting fluconazole-resistant yeasts with chromogenic agar. *J Clin Microbiol* 1996;34:1794-7.
- Espinel-Ingróff A, Kish CW Jr, Kerker TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1992;30:3138-45.
- Espinel-Ingróff 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 yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:591-5.
- Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMAgar *Candida* for presumptive identification of clinically important *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:201-4.
- Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMAgar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* spp. *Mycoses* 1999;42:61-5.
- Verghese SL, Padmaja P, Sutha P, Mathew T, Sorna J. Rapid identification of fluconazole resistance using CHROMAgar *Candida*. *Indian J Pathol Microbiol* 2000;43:343-6.
- Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingróff A, Bartizal KF, Bartlett MS, et al. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:39-45.
- Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingróff A, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1648-54.
- Maenza JR, Merz WG, Romagnoli MJ, Keruly JC, Moore RD, Gallant JE. Infection due to fluconazole resistant *Candida* in patients with AIDS: Prevalence and microbiology. *Clin Infect Dis* 1997;24:28-34.
- Canle D, Velasco D, Tomás M, Molina F, Villanueva R, Durán MT. Cribado de *Candida* spp. con sensibilidad disminuida a fluconazol mediante CHROMAgar *Candida* con fluconazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20(Suppl 1):164.
- Jianping X, Vilgaly R, Mitchell TG. Colony size can be used to determine the MIC of fluconazole for pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol* 1998;36:2383-5.