

Especies de Candida aisladas de lesiones ungueales y su sensibilidad in vitro al fluconazol (1999-2001)

Catalina De Bedout
Ángela María Tabares
Ángela Restrepo
Mirta Arango
Ángela Zuluaga

RESUMEN

A pesar de que existen múltiples tratamientos para las onicomycosis, muchas veces en la práctica no se obtienen las respuestas esperadas e incluso se ha hablado de resistencia a los antifúngicos. Poco se sabe del comportamiento *in vitro* de las distintas especies de *Candida* productoras de onicomycosis.

Con base en los registros de los exámenes directos y cultivos realizados a partir de lesiones ungueales en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) en Medellín entre 1999 y 2001, se planteó un estudio sobre las especies de *Candida* causales y su sensibilidad *in vitro*. Se anotaron los datos demográficos de los pacientes, el resultado del directo con KOH, las especies de *Candida* aisladas durante este período y si el cultivo era puro o se identificaba otro agente. Posteriormente se consultaron los datos de sensibilidad al fluconazol, por el método de BIOMIC que mide electrónicamente el área de inhibición de crecimiento. Se determinaron los valores correspondientes a la concentración inhibitoria mínima (CIM) e igualmente se determinó por el mismo sistema el índice terapéutico (IQ), que mide la relación entre la concentración tisular alcanzada por el fluconazol (200 mg/día) y los valores de la CIM.

De 2.295 lesiones ungueales procesadas entre 1999 y 2001, en 810 (35.7%) se aislaron especies de *Candida*: 521 (64.3%) provenientes de uñas de los pies y 288 (35.7%) de las manos. El KOH resultó positivo en 71.9% de los exámenes efectuados en las uñas de las manos y 70.4% de las uñas de los pies.

Fueron excluidos 129 casos por presentar dificultades en su clasificación. Se estudiaron 178 pacientes con onicomycosis de las manos. La especie más frecuente fue la *Candida albicans*, con 82 casos (46.1%), seguida por *C. parapsilosis* con 56 (31.5%) y *C. tropicales* con 26 casos (14.6%). Por el contrario, de las 267 muestras procedentes de las uñas de los pies, la especie más frecuente fue la *C. parapsilosis* con 163 casos (61%) y en segundo y tercer lugares la *C. guilliermondii* con 42 casos (15.7%) y *C. albicans* (11.6%). En el 20% del grupo había cultivos mixtos de *Candida* con otros agentes, principalmente en las uñas de los pies.

Las pruebas de sensibilidad al fluconazol fueron realizadas en 241 aislamientos, 70.1% de los cuales se mostraron sensibles, 21.2% sensibles dosis dependiente y 8.7% resistentes. Al considerar la respuesta terapéutica de acuerdo con el IQ se anotó que de 169 aislamientos sensibles (CIM 8 mcg/L), 72.7% de los pacientes responderían exitosamente a la terapia con fluconazol a dosis de 200 mg/día, mientras que los restantes (27.3%) no mejorarían (IQ 4 veces la CIM).

De lo anterior se concluye que la presencia de *Candida* como agente de onicomycosis es alta. Aunque la *C. albicans* sigue siendo la más frecuente en las uñas de las manos, es la *C. parapsilosis* la primera en los pies. A pesar de que más del 70% de los aislamientos se mostraron sensibles al fluconazol, empieza a notarse la aparición de resistencia en cerca del 9% de los casos. El índice terapéutico señala cómo el fluconazol, a razón de 200 mg/día, no resultaría efectivo en el 27% de los pacientes.

Palabras clave: onicomycosis, *Candida*, sensibilidad *in vitro*, fluconazol.

Catalina De Bedout, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín.

Ángela María Tabares, CIB, Medellín.

Ángela Restrepo, CIB Medellín.

Mirta Arango, CIB, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.

Ángela Zuluaga, Instituto de Ciencias de la Salud (CES), Medellín.

Correspondencia: Ángela Zuluaga, Instituto de Ciencias de la Salud (CES), Medellín, E-mail: azuluaga@epm.net.co

Especies de *Candida* aisladas de lesiones ungueales y su sensibilidad *in vitro* al fluconazol (1999-2001)

INTRODUCCIÓN

Las onicomycosis representan el 50% de las enfermedades de las uñas. Afectan del 3% al 10% de la población adulta y en el 80% de los casos comprometen las uñas de los pies. Es una enfermedad de la vida adulta, 70% de los casos se encuentran entre 18 y 65 años, y sólo el 6% en menores de 18 años.¹

En el mundo los dermatofitos son los principales causantes de onicomycosis (68%), seguidos por *Candida* spp (10.6% a 14.3%)¹ y en menor proporción por otros mohos ambientales como *Aspergillus* spp, y *Scopulariopsis brevicaulis*.¹

En un estudio retrospectivo realizado en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) de Medellín, de los cultivos de muestras de uñas entre 1991 y 1995 se encontraron 1.868 exámenes, de los cuales 1.010 (56%) fueron positivos, con dermatofitos (42.4%) como los agentes predominantes, seguidos por *Candida* spp (27.3%) y con menor frecuencia otros mohos ambientales, *Fusarium* spp, *Scytalidium dimidiatum*, entre otros (17.6%).²

El tratamiento de la onicomycosis sigue siendo un reto, y a pesar de la existencia de varios agentes antifúngicos efectivos para dermatofitos y *Candida*, los resultados de la terapia no han sido completamente satisfactorios.³

Existen pocos estudios del comportamiento *in vitro* de los aislamientos de *Candida* spp, procedentes de lesiones en uñas. Ghannoum y col⁴ en una investigación realizada en varios centros de los Estados Unidos y Canadá, examinaron la sensibilidad *in vitro* al fluconazol, el itraconazol, la terbinafina y la griseofulvina de los agentes aislados de onicomycosis, y encontraron que los dermatofitos eran sensibles a las cuatro drogas, aunque varias cepas de *Trichophyton mentagrophytes* tenían una elevada concentración inhibitoria mínima al fluconazol. *In vitro* la terbinafina mostró la más alta actividad antifúngica contra *Acremonium*, *Scopulariopsis* y *Scytalidium*, mientras que el itraconazol fue el mejor contra *Aspergillus* y *Candida parapsilosis*. Finalmente, el fluconazol fue más efectivo que los otros agentes contra *Candida albicans*.

En los últimos años se viene señalando el surgimiento de la resistencia de las levaduras del género *Candida* a los diferentes azoles, incluido el fluconazol, considerado la terapia de elección. Esta resistencia, así como la respuesta dosis-dependiente, se presentan principalmente en las especies diferentes a *C. albicans*.^{5,6}

Evans, en artículos publicados entre 1998 y 1999^{7,8} señaló como posibles causas del incremento en la resistencia a la terapia antifúngica el aumento de la población de hospederos inmunosuprimidos y el cambio del espectro de los patógenos y especies como *C. krusei* y *C. glabrata*, que no responden bien a la terapia con los triazoles. Se ha descrito también resistencia de *C. albicans* al fluconazol en pacientes con sida y recuentos bajos de linfocitos T CD4, principalmente en aquellos en tratamiento prolongado o intermitente, incluso con resistencia cruzada con el itraconazol.⁵⁻¹¹

La mayoría de los trabajos sobre la sensibilidad *in vitro* de *Candida* a los azoles (ketoconazol, fluconazol e itraconazol) han sido realizados con aislamientos procedentes de lesiones en mucosa oral o de líquidos y tejidos profundos,⁹⁻¹⁰⁻¹² sin que se mencione el estudio de aislamientos procedentes de procesos ungueales. Sin embargo, los estudios de la farmacocinética del fluconazol en piel y uñas demuestran que el antimicótico administrado a dosis de 150 mg/semana, alcanza en uñas niveles de 8.54 µg/g de uña después de seis meses de terapia. Así mismo, existen varios ensayos clínicos que demuestran la efectividad del antimicótico en el tratamiento de onicomycosis por *Candida*.¹³ Por tal motivo, este estudio se propone evaluar la sensibilidad *in vitro* al fluconazol de las diferentes especies de *Candida* provenientes de pacientes con este tipo de enfermedad, aisladas en el laboratorio de la CIB, Medellín, durante los años 1999 a 2001.

METODOLOGÍA

Se trata de un estudio retrospectivo basado en los resultados de los exámenes directos y de los cultivos para hongos obtenidos de lesiones ungueales que fueron realizados en la CIB, Medellín, entre 1999 y 2001.

Siempre que un cultivo reportó el aislamiento de *Candida* spp. se consultaban los correspondientes registros, anotando los datos demográficos (edad, sexo), la localización de la lesión (manos o pies), el resultado del examen directo con KOH, así como la especie de *Candida* identificada (API 20 AUX, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Igualmente se registró si el aislamiento había sido puro o si, simultáneamente, se recuperó otro hongo de la misma muestra.

Posteriormente se consultaron los datos correspondientes al estudio de la sensibilidad al fluconazol, hecho por el método de BIOMIC, que mide electrónicamente el área de inhibición.¹⁴ Se determinaron así los valores correspondientes a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Igualmente

Especies de *Candida* aisladas de lesiones ungueales y su sensibilidad in vitro al fluconazol (1999-2001)

se determinó por el mismo sistema el índice terapéutico (IQ); este último mide la relación entre la concentración sérica alcanzada por el fluconazol (200 mg/día) y los valores de CIM.

RESULTADOS

En las fechas comprendidas entre enero 1o. de 1999 y 31 de diciembre de 2001 se procesaron 2.295 muestras de lesiones ungueales. De ellas, 810 (35.3%) permitieron el aislamiento de diferentes especies de *Candida*, correspondiendo 521 (64.3%) a uñas de los pies y 289 a uñas de las manos (35.7 %).

La distribución en el tiempo mostró 296 aislamientos en el primer año, 299 en el segundo y 285 en el último. El 82.2% correspondía a pacientes de sexo femenino y 17.8% al masculino, con edades entre 1 mes y 99 años, el mayor grupo etario era el comprendido entre 40 y 49 años (25.3%), seguido por el de 50 a 60 años (21.3%) y después por el de 30 a 39 años (17.9%).

El examen directo con KOH resultó positivo en 207 de los 289 exámenes efectuados en las uñas de las manos (71.9%) y en 369 de 521 de las uñas de los pies (70.4%). Cuando se analizaron los exámenes directos positivos con los respectivos cultivos, fueron excluidos 129 casos por presentar crecimiento de bacterias, por incapacidad para identificar la especie, aún en subcultivo, y por haber obtenido una clasificación no concluyente por el método de API 20 AUX, así como también por haber recuperado sólo 1 a 3 colonias de levaduras.

Entre los 445 cultivos finalmente evaluados, y de acuerdo con la localización (Cuadro 1), se encontró que *C. albicans* era la especie más frecuente en las uñas de las manos (82 casos, 46.1%), seguida por *C. parapsilosis* (56 casos, 31.5%) y *C. tropicalis* (26 casos, 14.6%), mientras que en las uñas de los pies la especie más frecuente fue *C. parapsilosis* (163 casos; 61%), con *C. guilliermondii* (42 casos, 15.7%) en segundo lugar.

De los 445 casos con exámenes directos y cultivos positivos, en los que ya se había identificado la especie de *Candida*, se encontró que en 90 había, además de *Candida*, otros agentes. En el caso de las uñas de las manos, este evento ocurrió en 15 casos (8.4%) y los agentes acompañantes más frecuentes fueron *Fusarium* (5 aislamientos) y *Trichosporon* (5 aislamientos). En los 267 casos correspondientes a las uñas de los pies, la presencia simultánea de otro microorganismo se observó en 75 casos (28.1%) como se ve en el Cuadro 2, donde los *Trichophyton* fueron el género más frecuentemente encontrado con *T. rubrum* en 21 casos, seguido por *T. mentagrophytes* en 13. El género *Fusarium* fue recuperado 27 veces acompañando a *Candida*.

En cuanto a las pruebas de sensibilidad al fluconazol, practicadas en 241 aislamientos, se encontró que 169 (70.1%) eran sensibles, 51 (21.2%) sensibles dosis-dependiente y 21 (8.7%) resistentes. La resistencia sólo se encontró entre algunas especies diferentes a *C. albicans* (Cuadro 3). Al juzgar la respuesta terapéutica esperada de acuerdo con el IQ, se anotaron los siguientes resultados: de los 169 aislamientos sensibles, según los valores de la CIM

Cuadro 1
Frecuencia de las diferentes especies de *Candida*, según su localización

Aislamiento	Manos		Pies		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
<i>Candida albicans</i>	82	46.1	31	11.6	113	25.3
<i>Candida parapsilosis</i>	56	31.5	163	61.0	219	49.2
<i>Candida tropicalis</i>	26	14.6	9	3.4	35	7.9
<i>Candida guilliermondii</i>	6	3.4	42	15.7	48	10.8
Otras <i>Candidas</i> *	8	4.5	22	8.2	30	6.7
TOTAL	178	100	267	100	445	100

* *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, y *C. pelliculosa*.

Especies de *Candida* aisladas de lesiones ungueales y su sensibilidad in vitro al fluconazol (1999-2001)

($\leq 8 \mu\text{g/ml}$), 123 aislamientos (72.7%) presentaban un IQ ≥ 4 , por lo que se esperaba una respuesta exitosa al tratamiento con dosis de 200 mg/día. Sin embargo, en 46 aislamientos (27.3%) este tipo de respuesta sólo podría lograrse con dosis mayores a la anterior, dado que sus valores IQ fueron inferiores a 4 (Cuadro 4). Las diferencias entre estos grupos, según los valores del IQ, fueron estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

Los resultados anteriores ponen de relieve que, en nuestro medio, la frecuencia de patología ungueal micótica atribuible a especies de *Candida* es alta, 35.3%, cifra un poco superior al promedio de 27.3% obtenido en un estudio previo en este mismo laboratorio entre 1991 y 1995.²

La especie más frecuentemente aislada fue *Candida parapsilosis* (49.2%), seguida de la *C. albicans* (25.3%); la primera localizada principalmente en las uñas de los pies y la segunda en las de las manos. Estos hallazgos coinciden parcialmente con los de un estudio multicéntrico realizado en Estados Unidos y en Canadá,⁴ en el que un 19.3% de los aislamientos de uñas correspondían a levaduras, de las cuales 66.7% eran *C. parapsilosis* y 16.7% *C. albicans*, mientras *C. guilliermondii* representó 11.9% de los aislamientos.

En las infecciones mixtas los dermatofitos ocuparon un lugar importante (41%), principalmente en las uñas de los pies. En este mismo contexto se anotó la presencia de mohos que ahora son reconocidos como causantes de problemas ungueales, especialmente especies de *Fusarium* (37.8%), y que bien pudieran contribuir a intensificar el cuadro clínico. Se ha reportado un aumento de este agente

Cuadro 2
Hongos aislados conjuntamente con *Candida* spp en uñas

Agentes aislados conjuntamente con <i>Candida</i>	Manos	Pies	Total
DERMATOFITOS			
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1	13	14
<i>Trichophyton rubrum</i>	1	21	22
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0	1	1
Subtotal: Dermatofitos	2	35	37
No. (%)	(5.4)	(94.6)	(100)
OTROS MOHOS			
<i>Fusarium</i> spp	5	27	32
<i>Scytalidium dimidiatum</i>	0	6	6
<i>Trichosporon</i> spp	5	4	9
<i>Penicillium</i> spp	1	0	1
<i>Geotrichum</i> spp	2	0	2
<i>Acremonium</i> spp	0	1	1
Subtotal: Otros mohos	13	38	51
No. (%)	(25.5)	(74.5)	(100)
TOTAL	15	75	90
No. (%)	(16.7)	(83.3)	(100)

Especies de *Candida* aisladas de lesiones ungueales y su sensibilidad in vitro al fluconazol (1999-2001)**Cuadro 3****CIM: sensibilidad de aislamientos de *Candida* spp al fluconazol en 241 pacientes con lesiones ungueales**

Aislamientos (No.)	Sensible (CIM: $\leq 8 \mu\text{g/ml}$)		SDD (CIM: 16-32 $\mu\text{g/ml}$)		Resistente (CIM: $> 64 \mu\text{g/ml}$)	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
<i>C. parapsilosis</i> (146)	117	(80.1)	23	(15.8)	6	(4.1)
<i>C. guillermundii</i> (44)	15	(34.1)	(19)	(43.2)	10	(22.7)
<i>C. albicans</i> (28)	25	(89.3)	3	(10.7)	0	0
<i>C. tropicalis</i> (10)	8	(80.0)	2	(20)	0	0
Otras especies (13)*.	4	(30.7)	4	(30.7)	5	(38.5)
TOTAL (241)	169	(70.1)	51	(21.2)	21	(8.7)

* *C. famata*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. inconspicua*.**Cuadro 4****Relación entre los valores de la CIM y del IQ en aislamientos de *Candida* sensibles al fluconazol (CIM ≤ 8)**

Aislamientos No.	IQ ≥ 4		IQ ≤ 4	
	No.	(%)	No.	(%)
<i>C. parapsilosis</i> (146)	82	(70)	35	(29.9)
<i>C. guillermundii</i> (15)	6	(40)	9	(60.0)
<i>C. albicans</i> (25)	25	(100)	0	0
<i>C. tropicalis</i> (8)	7	(87.5)	1	(12.5)
Otras especies+(4)	3	(75)	1	(25.0)
TOTAL (169)	123	(72.7)*	46	(27.2)*

+ *C. famata* (1), *C. lusitaniae* (1), *C. novyensis* (2)

* (p < 0.05)

como causante de onicomicosis tanto en el mundo⁴ como en nuestro medio.²

El predominio de especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* pudiera reflejarse en el cambio en la sensibilidad al fluconazol. En efecto, a pesar de que más del 70% de los aislamientos se mostraron sensibles a este fármaco, ya empieza a notarse la aparición de grados diversos de resistencia que llegaron a cerca de 9% de los casos. Es de notar

cómo el índice terapéutico señala que el fluconazol, a 200 mg/día, no resultaría efectivo en un 27% de los pacientes, resaltando la importancia del IQ.

Aunque todas los aislamientos de *C. albicans* y *C. tropicalis* siguen siendo sensibles al fluconazol, se sugiere que el uso de dosis inadecuadas y de terapias intermitentes puede favorecer la resistencia.⁸ Se anota, igualmente, que 80.1% de las cepas de *C. parapsilosis* fueron sensibles,

Especies de *Candida* aisladas de lesiones ungueales y su sensibilidad in vitro al fluconazol (1999-2001)

mientras 15.8% estarían sujetas a una dosis mayor del fármaco para ser controladas, y sólo el 4.1% se mostraron resistentes. Las demás especies tuvieron una mayor frecuencia de resistencia, en concordancia con lo informado en la literatura internacional.⁴

Sería recomendable llevar a cabo nuevos estudios prospectivos que permitan determinar el comportamiento de *Candida* frente a regímenes terapéuticos controlados, que puedan aclarar si la resistencia observada está relacionada con terapias inadecuadas (dosis, tiempo, casa farmacéutica, adherencia del paciente a la terapia, entre otras), y que analizaran en detalle todos estos aspectos, con el fin de evitar fallas terapéuticas.

SUMMARY

Despite different options of treatment for onychomycosis, the results in clinical practice are not as expected, and resistance to antifungals is an increasing problem. Little is known about the *in vitro* behavior of the candida species that produce onychomycosis.

Based on the files of mycologic direct exams and cultures taken from nails between 1999 and 2001 in the Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) in Medellín, a study about causative candida species and their *in vitro* sensibility was postulated. Various data were registered: demographic data on the patients, results of the direct exams with KOH, candida species isolated during that period, and if the culture was due to one or various agents. Then, data about sensitivity to fluconazole were consulted, with the BIOMIC technique that measures electronically the inhibition growth area. Values for the minimal inhibitory concentration (MIC) and therapeutic index (IQ) were determined by the same technique, measuring the tisular concentration reached by fluconazole (at 200 mg/day) and MIC values.

Of the 2,295 processed ungueal lesions, candida species were isolated in 810 (37%), 521 (64.3%) from toenails and 288 (35.7%) from fingernails. KOH was positive in 71.9% from fingernail samples and 70.4% from the toenails.

Due to difficulties in their classification 129 cases were excluded. One hundred and seventy eight patients with onychomycosis of the fingernails were studied, with *Candida albicans* being the most frequent agent, affecting 82 patients (46.1%) followed by *C parapsilosis* 56 (31.5%) and *C tropicalis* 26 cases (14.6%). On the contrary, in the 267 samples from the toenails, the most common species was *C parapsilosis*, in 163 cases (61%) and in second and third places were *C guilliermondii* with 42 cases (15.7%) and *C albicans* (11.6%). In this group, 20% had mixed cultures of candida and other agents, mainly on the toenails.

Sensitivity tests to fluconazole were carried out in 241 samples, of which 70.1% were sensitive, 21.2% were sensitive dosage dependent and 8.7% were resistant. Considering the therapeutic response according to the IQ, it was noted that out of 169 sensitive samples (MIC 8 mcg/L) 72.7% of patients would respond successfully to therapy with fluconazole 200 mg/day, while the rest (27.3%) would not get better (IQ four times the MIC).

We concluded that the frequency of candida as causative agent of onychomycosis is high. While *C. albicans* is still the most frequently isolated agent from fingernails, *C parapsilosis* is the most frequent in the toenails. In spite of over 70% of the samples being sensitive to fluconazole, resistance close to 9% of cases is observed. The therapeutic index shows how fluconazole at 200 mg/day would not be effective in 27% of patients.

Key words: onychomycosis, candida, *in vitro* sensibility, fluconazole.

Especies de *Candida* aisladas de lesiones ungueales y su sensibilidad in vitro al fluconazol (1999-2001)

BIBLIOGRAFÍA

1. Haneke E, Roseeuw D. The scope of onychomycosis: epidemiology and clinical features. *Int J Dermatol* 1999; 38:S7-12.
2. Zuluaga A, Tabares A, Arango M, et al. Importancia creciente de los géneros *Fusarium* y *Scytalidium* como agentes de onicomicosis. *Rev Asoc Col Dermatol* 2001; 9:593-599.
3. Zuluaga A. El tratamiento de las onicomicosis: un reto. *Rev Asoc Col Dermatol* 2002; 10:865-872.
4. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: The frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43:641-648.
5. Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, et al. The changing face of candidemia. Emergence of non *Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996; 100:617-623.
6. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1-8.
7. Evans EG. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38:S32-36.
8. Evans EG. Resistance of *Candida* species to antifungal agents used in the treatment of onychomycosis: a review of current problems. *Br J Dermatol* 1999; 141:S33-35.
9. Troillet N, Durussel C, Bille J, et al. Correlation between *in vitro* susceptibility of *Candida albicans* and fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:911-915.
10. Ng TTC, Denning DW. Fluconazole resistance in *Candida* in patients with AIDS - a therapeutic approach. *J Infect* 1993; 26:117-125.
11. White A, Goetz MB. Azole-resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. *Clin Infect Dis* 1994; 19:687-692.
12. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. Bloodstream infection due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 747-751.
13. Faergemann J. Pharmacokinetics of fluconazole in skin and nails. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40:14-20.
14. Liebowitz L, Ashbee R, Evans EG, et al. Global antifungal surveillance group. A two year global evaluation of susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. *Diag Micro Inf Dis* 2001.