

REVISION BIBLIOGRAFICA

Agentes antifúngicos. Generalidades.

Yanelis Iznaga Sosa y Carlos Vallín Plous.

Departamento de Biotecnología, Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Apartado Postal 6414, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 18 de abril del 2000. Aceptado: 28 de junio del 2001.

Palabras clave: hongos, agentes antifúngicos, susceptibilidad, resistencia.

Key words: fungi, antifungal agents, susceptibility, resistance.

RESUMEN. El número de pacientes inmunocomprometidos está aumentando cada año. Esto ha sido atribuido a un incremento en el empleo de agentes antibacterianos nuevos y más efectivos, a la pandemia del SIDA y al rápido crecimiento del número de pacientes con inmunosupresión químicamente inducida. Protocolos de manejo mejorados han permitido que los pacientes con SIDA, cáncer y trasplantes sobrevivan más tiempo, pero a su vez que resulten muy susceptibles a infecciones fúngicas que amenazan la vida. Los hongos están emergiendo como importantes patógenos que ocasionan morbilidad y mortalidad severas en los pacientes hospitalizados. Conjuntamente con las especies de *Candida*, nuevos patógenos fúngicos tales como *Fusarium* spp., *Trichosporon beigelii*, los *zygomycetes*, hongos *dematiaceous*, y otros usualmente no patógenos reconocidos como contaminantes de laboratorio, se presentan como un problema serio en algunos pacientes. Los hongos que constituyen patógenos oportunistas son frecuentemente encontrados en los pacientes con inmunosupresión químicamente inducida y en pacientes con SIDA. Los agentes antifúngicos disponibles para tratar estas infecciones resultan insuficientes, a lo cual se suma el hecho de que su amplio empleo ha conducido al desarrollo de resistencia hacia ellos. Con la finalidad de que puedan ser utilizados en la clínica, los ensayos de susceptibilidad *in vitro* deben ofrecer una predicción confiable de la respuesta *in vivo* a la terapia en las infecciones en humanos. Desafortunadamente, la evidencia de una correlación clínica con los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* es limitada. Esto no es motivo de sorpresa debido a los problemas que se han presentado en la realización de los ensayos de susceptibilidad *in vitro* y a las dificultades encontradas en la interpretación de los resultados de la terapia en los muy complicados pacientes involucrados. El nuevo milenio ha comenzado con infecciones fúngicas más invasivas por lo que serán necesarias nuevas estrategias para controlar la droga-resistencia. El desarrollo de nuevos antifúngicos es considerado como la estrategia con el más significativo impacto futuro para enfrentar este complejo problema.

ABSTRACT. The immunocompromised patient population is increasing every year. It has been attributed to the increased use of newer and more effective antibacterial agents, the AIDS pandemic, and the rapidly expanding number of chemically induced immunosuppression patients. As a result of improved management protocols, AIDS, cancer, and transplantation populations now survive longer and become highly susceptible to life-threatening fungal infections. Fungi are emerging as important nosocomial pathogens that cause severe morbidity and mortality in hospitalized patients. In addition to *Candida* spp., new fungal pathogens such as *Fusarium* spp., *Trichosporon beigelii*, the *zygomycetes*, *dematiaceous fungi*, and other usually nonpathogenic fungi recognized as laboratory contaminants are being recognized as significant problems in some patients. The pathogenic opportunistic fungi are frequently found in patients with chemically induced immunosuppression and in patients with AIDS. The antifungal agents to treat these infections are only a few and their widespread use has led to the development of drug resistance. In order to be useful clinically, *in vitro* susceptibility testing should give a reliable prediction of *in vivo* response to therapy in human infections. Unfortunately, the evidence for clinical correlation with *in vitro* antifungal susceptibility tests is limited at best. This is not surprising, give the prob-

lems with *in vitro* susceptibility testing methods and the difficulties encountered in interpreting the outcome of therapy in the very complex patients involved. The new millennium has begun with more invasive fungal infections and will be necessary the development of new strategies for control of drug resistance. The development of new antifungal drugs is considered the strategy with the most significant future impact to confront this complex problem.

INTRODUCCION

Las infecciones fúngicas se presentan en todo el mundo y aunque no son consideradas tan comunes como las enfermedades bacterianas y virales, están asociadas a una severa morbilidad y mortalidad.¹ Durante los últimos años las alteraciones en los mecanismos de defensa del organismo como consecuencia de la infección por el VIH, el empleo de terapias antibacterianas, inmunosupresivas y citotóxicas mucho más intensas y agresivas y los propios traumas han predisuesto a los pacientes que padecen de cáncer, SIDA, así como a los que son sometidos a trasplantes a adquirir infecciones fúngicas invasivas.^{1,2} Esta gran incidencia de infecciones fúngicas ha sido reportada y se ha visto una tendencia al incremento de las infecciones nosocomiales del flujo sanguíneo ocasionadas por levaduras ya desde comienzos de 1980.³ Otra tendencia ha sido el reemplazo de *Candida albicans* por otras especies de *Candida* como agentes etiológicos de infección, en un porcentaje considerable de las candidiasis sistémicas, las cuales muestran concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más elevadas.^{4,7}

Además de las infecciones causadas por especies de *Candida*, muchos hongos que usualmente son considerados como contaminantes de laboratorios son reconocidos ahora como patógenos fúngicos de importancia en los pacientes inmunocomprometidos. También entre los hongos patógenos oportunistas, las infecciones causadas por *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus* spp. y *Cryptococcus neoformans*, han sido responsables de las micosis encontradas en un gran número de pacientes con SIDA e inmunosupresión químicamente inducida.² *Saccharomyces cerevisiae* es la especie del género *Saccharomyces* más comúnmente aislada en los laboratorios clínicos y aunque usualmente no es patógena se ha reportado como agente causal de vulvovaginitis e infección en sangre. La relativa resistencia de *S. cerevisiae* a los azoles, así como su capacidad para causar infecciones diseminadas puede promover la aparición de esta especie como un patógeno en pacientes inmunodeprimidos.^{8,9}

Aunque las infecciones fúngicas superficiales no constituyen, en general, una amenaza para la vida, sí pueden resultar muy desfigurativas. La candidiasis mucocutánea crónica es una infección cutánea que puede resultar a veces severa y recalcitrante a tratamiento. Las dermatofitosis son infecciones fúngicas muy comunes que pueden hacerse a veces extensivas, especialmente en pacientes con deficiencias inmunológicas.¹⁰

La elevada frecuencia y severidad de las infecciones fúngicas ha conducido al desarrollo y más amplio uso de agentes antifúngicos, todo lo cual ha condicionado la aparición de organismos más resistentes.²

AGENTES ANTIFUNGICOS: MECANISMOS DE ACCION Y RESISTENCIA

Numerosos agentes antifúngicos han sido formulados y evaluados para su empleo en el tratamiento de las infecciones fúngicas, pero son pocos los que pueden ser empleados sistémicamente. Sólo seis de ellos han sido comúnmente autorizados en los Estados Unidos para tratar infecciones fúngicas sistémicas. Estos son el polieno anfotericina B, los imidazoles miconazol y ketoconazol, los triazoles fluconazol e itraconazol y la 5-fluorocitosina (5-FC), un inhibidor de la síntesis de pirimidina.^{2,11-13}

Polienos

La anfotericina B es un antibiótico macrólido poliénico usado principalmente en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas y que amenazan la vida.^{11,12}

Los agentes antifúngicos polienos actúan por unión al ergosterol en la membrana celular fúngica, causando inestabilidad osmótica y pérdida de la integridad de la membrana. La toxicidad directa a la membrana se debe en parte a un daño oxidativo y es frecuentemente fungicida. Este efecto se extiende a las células de mamíferos, en las cuales la droga se enlaza al colesterol y a esto se debe la elevada toxicidad asociada a los agentes polienos.^{11,14}

Resistencia

Aunque la resistencia a la anfotericina B es poco frecuente, cambios en los esteroides de la membrana han sido correlacionados con el desarrollo de resistencia. Tal condición ha asumido especial importancia clínica en ciertas especies como *Candida lusitanae*.¹¹ Se ha observado una disminución en el contenido de ergosterol de las membranas celulares en los aislados resistentes lo cual ha permitido concluir que la resistencia se ha desarrollado como resultado de una acumulación de esteroides distintos del ergosterol por los cuales los polienos tienen una baja afinidad.^{16,18}

Azoles

Los azoles inhiben las enzimas fúngicas citocromo P-450-dependientes, ocasionando una alteración en la síntesis del ergosterol y una disminución en su concentración en la membrana celular fúngica.¹¹

Resistencia

El ketoconazol fue el primero de los azoles que estuvo disponible y demostró ser eficaz en el tratamiento de candidiasis mucocutáneas crónicas. Sin embargo, no mucho tiempo después de la introducción de este agente, se presentaron reportes de fallos clínicos asociados con elevadas CMI de ketoconazol desarrollados durante un tratamiento prolongado con esta droga.^{19,20} El fluconazol es el agente antifúngico triazol que tiene el mejor perfil farmacocinético y la menor incidencia de efectos adversos dentro de los antifúngicos sistémicos disponibles hasta hoy. Ha sido empleado como terapia de primera línea para ciertas infecciones profundas ocasionadas por

Candida y *Cryptococcus* tanto en individuos inmunocomprometidos como sanos y es además, una terapia de mantenimiento de primera línea para las infecciones en los individuos inmunocomprometidos.^{12,21,22} El amplio empleo del fluconazol como agente profiláctico y terapéutico ha sido seguido por un rápido incremento en reportes de resistencia por parte de especies de *Candida*. La interpretación más pesimista de la reciente experiencia con la utilización del fluconazol es el incremento, en los próximos años, en la flora de levaduras con susceptibilidad reducida al fluconazol lo cual conducirá necesariamente a restringir su empleo e incrementar las dosis de tratamiento. Otro aspecto importante a tener en cuenta es que la mayoría de los aislados de *Candida* resistentes a azoles que se han estudiado, han mostrado resistencia cruzada a todos los antifúngicos derivados de imidazoles y triazoles.^{20,23-26} El voriconazol (UK-109, 496) es un nuevo agente antifúngico monotriazol con potente actividad *in vitro* frente a levaduras y hongos filamentosos, especialmente *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus* spp. La utilidad clínica de este compuesto deberá ser establecida en estudios posteriores. Sin embargo, se ha encontrado que para aislados de *Candida* spp. con susceptibilidad disminuida al fluconazol e itraconazol las CMI fueron también más elevadas.^{27,29}

Entre los mecanismos de resistencia de las levaduras a los azoles se encuentra la permeabilidad reducida de la membrana de *C. albicans* a antifúngicos azoles como consecuencia de cambios en la composición de esteroides de la membrana. Otro mecanismo, descrito para un aislado de *C. albicans* resistente, es una mutación en la enzima fúngica blanco, lo cual resulta en una afinidad de unión disminuida para los azoles. Un tercer mecanismo de resistencia es la sobreproducción de la enzima citocromo P-450 que es su blanco de acción, hecho encontrado en una cepa de *Candida glabrata* resistente a azoles. En un grupo de aislados de *C. albicans* procedentes de pacientes con SIDA se ha visto además que transportadores en el flujo de multidroga han desempeñado un importante papel en la resistencia de esta especie fúngica a los agentes antifúngicos azoles. Ha sido reportado también que mecanismos de resistencia múltiple pueden coexistir en aislados clínicos resistentes.^{24,28,30}

En el contexto de las infecciones vaginales causadas por *Candida* existen muchos reportes del predominio de levaduras diferentes de *C. albicans* (menos sensibles a azoles) en casos de vaginitis. Si esta situación se presentara fuera del campo de la ginecología, su impacto en la terapia de las infecciones por levaduras sería realmente muy serio.²⁰

5-fluorocitocina (5-FC)

La 5-FC actúa como un antimetabolito que compite con el uracilo en la síntesis de ARN de levaduras y también interfiere con la timidilato sintetasa. Hay cinco enzimas involucradas en el modo de acción de la 5-FC. El primer paso es el transporte de la 5-FC al interior celular por medio de una citosina permeasa que se encuentra enlazada a la membrana. Una vez en el interior celular, la droga es desaminada rápidamente, mediante una citosina desaminasa, a 5-fluorouracilo (5-FU), el cual es la principal forma activa de la droga.¹¹

Resistencia

La resistencia intrínseca y la que se observa durante la aplicación de la terapia han sido bien sustentadas para la 5-FC. Al menos dos sitios metabólicos son responsables de la resistencia a 5-FC. Uno involucra a la enzima citosina permeasa y el otro, a la enzima citosina desaminasa.¹⁴

ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA

Como consecuencia del reconocimiento de la resistencia antifúngica, el empleo cada vez más frecuente de agentes antifúngicos ya establecidos, así como de otros en fase de investigación y como consecuencia también del aumento en la incidencia de las micosis, se hace necesario un fuerte trabajo de los micólogos en el diagnóstico de las infecciones fúngicas y en la evaluación de resistencia y utilidad de agentes antifúngicos. Para este fin, resulta importante la realización de ensayos de susceptibilidad antifúngica en el laboratorio clínico. Las pruebas para establecer el diagnóstico etiológico de cada infección están avanzando rápidamente, sin embargo, a pesar de los esfuerzos, la evaluación de la sensibilidad antifúngica *in vitro* y el papel del laboratorio clínico en la detección y seguimiento de las concentraciones antifúngicas *in vivo* aún no son satisfactorias.^{21,21} La correlación de las CMI con la respuesta clínica a la terapia está comenzan-

do a emerger, más notablemente en relación con el tratamiento con fluconazol e itraconazol para candidiasis orofaríngeas asociadas con infección por virus de inmunodeficiencia humana.^{32,33}

Los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* están influenciados por variables relacionadas con la droga, el organismo y el método usado:^{11,14,31}

- Problemas relativos al microorganismo: lenta velocidad de crecimiento (con relación a bacterias) y la capacidad de ciertos hongos dimórficos de crecer en forma de levadura o de hongo filamentosos en dependencia del pH, la temperatura y la composición del medio.
- Problemas asociados a los agentes antifúngicos: solubilidad, estabilidad química, modos de acción y la tendencia a producir inhibición parcial del crecimiento en un amplio intervalo de concentraciones.
- Variables que influyen en los resultados de los ensayos de susceptibilidad: talla del inóculo y preparación, formulación del medio y pH, tiempo y temperatura de incubación y el criterio usado para la determinación del punto final de CMI.

Estandarización

La necesidad de desarrollar métodos normalizados para la realización de los ensayos de susceptibilidad antifúngica resulta evidente. En 1982, el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad Antifúngica del Comité Nacional para las Normas de Laboratorio Clínico de los Estados Unidos, inició un conjunto de estudios de colaboración que culminaron en la publicación del documento M 27-P en 1992, el cual establece normas para la realización de ensayos de susceptibilidad antifúngica de levaduras por la técnica de macrodilución en caldo.²

Después de la pertinente evaluación del documento M 27-P por la Comunidad Científica, fue elaborado el M 27-T en 1995, el cual proporciona unas guías para la realización de un ensayo de microdilución. Más adelante, se publicó el documento M 27-A (1996) que incluye técnicas de macro y microdilución en caldo para levaduras³⁴ y en 1998 el M 38-P referido también a ensayos de dilución en caldo, pero para hongos filamentosos formadores de conidios.³⁵ Algunos métodos alternativos más sencillos, convenientes y eficientes se han desarrollado y evaluado desde

1992 tales como: colorimétricos de microdilución y espectrofotométricos y el E-test.^{2,14,36-39} La experiencia acumulada con los ensayos de susceptibilidad antifúngica proporciona, de esta forma, algunas recomendaciones específicas para su realización en los laboratorios clínicos. Sin embargo, la utilidad de estos necesita ser determinada por el establecimiento de la relación entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica a la terapia.^{2,11}

La aplicación del desarrollo tecnológico a nuevos agentes antifúngicos y a otros estados infecciosos mejorará la habilidad para tratar efectivamente con el problema emergente de las infecciones fúngicas.²²

BUSQUEDA DE NUEVOS AGENTES ANTIFUNGICOS

La incidencia de serias infecciones fúngicas está en aumento por lo que se requiere tratarlas rápida y efectivamente. Hay relativamente pocos agentes antifúngicos disponibles para enfrentar las micosis sistémicas y ellos son tóxicos o fungistáticos. Otro hecho importante es el desarrollo de resistencia a los agentes antifúngicos. Debido a todos estos problemas se hace necesaria una activa búsqueda de nuevos y más potentes antibióticos antimicóticos.⁴⁰

En los agentes antifúngicos resulta de especial importancia un mecanismo de acción selectivo debido a que los hongos son organismos eucarióticos. Los procariontes tienen una variedad de propiedades fisiológicas y estructurales únicas en su reino que constituyen además, apropiados blancos para la acción de droga. En contraste, los hongos tienen un limitado número de blancos que los distinguen de los sistemas mamíferos. Además de las membranas citoplasmáticas, las paredes celulares de hongos de importancia médica (y algunos protistas) presentan componentes que no se encuentran en otra parte de la naturaleza.⁴¹ Entonces, las sustancias que actúen contra la pared celular podrían ser selectivas y catastróficas para el hongo.

Sin embargo, la importante iniciativa emprendida en la búsqueda de nuevas moléculas antifúngicas requiere a su vez de técnicas fiables que permitan su adecuada evaluación *in vitro* antes de poder ser utilizadas en fases experimentales posteriores. Se hace evidente por tanto la necesidad cada vez mayor de la

normalización de los ensayos de susceptibilidad antifúngica, que unido a la evaluación clínica del enfermo y al adecuado diagnóstico etiológico de la infección fúngica conducirá a la adecuada selección del tratamiento a emplear, lo cual a su vez permitirá combatir a tiempo al agente causal, así como alargar la vida útil del antibiótico antimicótico.

Nuevos antifúngicos ensayados:^{42,43}

Análogos de echinocandina B

En este grupo se encuentran las pneumocandinas y las papulocandinas, las cuales tienen su principal acción inhibidora sobre la enzima 1-3 β -glucanosintasa que participa en la síntesis de la pared celular fúngica. Compuestos recientes (L-743872, LY-303366) son fungicidas y tienen un amplio espectro de actividad que incluye levaduras y hongos.

Nikkomicinas y pradimicinas

Las nikkomicinas tienen potente actividad inhibidora de la quitina sintetasa y aunque tienen un estrecho espectro de actividad antifúngica, podrían ser útiles en terapia combinada.

Las pradimicinas, las cuales actúan a nivel del manano de la pared celular de los hongos, tiene un amplio espectro de actividad y podría resultar un agente novedoso y potencialmente útil si los problemas de toxicidad en los tejidos fueran resueltos.

Triazoles

Se ha desarrollado una nueva generación de azoles con más amplia y más potente actividad antifúngica. Se han comenzado a realizar los ensayos clínicos en al menos dos nuevos triazoles: voriconazole y SCH-56592. Estos compuestos *in vitro* parecen ser moderadamente activos contra algunas cepas resistentes a azoles.^{44,45}

Otros

Derivados de pirimidina.⁴⁷

Thiazolo (3,2-a) piridinas y sistemas heterocíclicos relacionados.⁴⁸

Péptidos antimicrobianos naturales sintetizados ribosomalmente y sus derivados sintéticos.⁴⁹

Derivados de norfloxacin.⁵⁰

Un carbohidrato complejo aislado de la pared celular de *Mucor rouxii*.⁵¹

Antibióticos lipopéptidos.⁵²

La tendencia de las investigaciones en el nuevo milenio es la guerra contra los hongos resistentes. De todas las posibles estrategias para llevarla a cabo, el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos apunta a tener el más significativo impacto

futuro⁴² y en este contexto la búsqueda a partir de fuentes naturales ofrece grandes posibilidades.

CONCLUSIONES

La creciente aparición de serias infecciones fúngicas requiere el empleo de tratamientos rápidos y efectivos. Hay relativamente pocos agentes antifúngicos disponibles para combatir las micosis sistémicas y ellos son tóxicos o fungistáticos. Otro aspecto importante a tener en cuenta es el desarrollo de resistencia a estos agentes. Debido a todos estos problemas, se hace necesaria una activa búsqueda de nuevos y más potentes antibióticos antimicóticos.

Sin embargo, la importante iniciativa emprendida en la búsqueda de nuevas moléculas antifúngicas requiere a su vez de técnicas fiables que permitan su adecuada evaluación *in vitro* antes de poder ser utilizadas en fases experimentales posteriores. Se hace evidente por tanto la necesidad cada vez mayor de la normalización de los ensayos de susceptibilidad antifúngica, que unido a la evaluación clínica del enfermo y al certero diagnóstico etiológico de la infección fúngica conducirá a la adecuada selección del tratamiento a emplear, lo cual a su vez, permitirá combatir a tiempo al agente causal, así como alargar la vida útil del antibiótico antimicótico.

BIBLIOGRAFIA

1. Espinel-Ingroff A. History of Medical Mycology in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 9, 235, 1996.
2. Espinel-Ingroff A. Standardization of antifungal susceptibility testing. *Revista Iberoamericana de Micología*, 13, 564, 1998.
3. Beck-Sague C.M. and Jarvis W.R. The National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J. Inf. Dis.*, 167, 1247, 1993.
4. Wingard J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.*, 20, 115, 1995.
5. Wingard J.R., Merz W. G., Rinaldi M. G., Hohanson T.R., Karp J.E. and Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N. Engl. J. Med.*, 325, 1274, 1991.
6. Price M.F., LaRocco M.T. and Gentry L.O. Candidiasis Antimicrob Agents *Chemother*, 38, 1422, 1994.
7. Sarchiesi F., Tortorano A.M., Di Francesco L.F., Cogliati M., Scalise G and Viviani M. A. *In vitro* activity of five antifungal agents against un-

- common clinical isolates of *Candida* spp. *J. Antimicrob. Chemother*, 43, 293, 1999.
8. Warren N.C. and Hagen K.C. *Candida*, *Cryptococcus* and Other Yeasts. In: *Manual of Clinical Microbiology* (Sixth Edition). Edited by: P.R. Murray. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005. 734, 1995.
9. Sarchiesi F., Arreni D., Compagnucci P., Di Francesco L.F., Giacometti A. and Scalise G. *In vitro* activity of five antifungal agents against clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Med. Mycol.*, 36, 437, 1998.
10. Wagner D.K. and Shonle, P.G. Cutaneous Defenses against Dermatophytes and Yeasts. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 317, 1995.
11. Espinel-Ingroff A. and Pfaller M.A. Antifungal Agents and Susceptibility Testing. In: *Manual of Clinical Microbiology* (Sixth Edition). Edited by: P.R. Murray. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005. 1405, 1995.
12. Watanabe K. Clinical evaluation of antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. *Nippa Ishinkin Gakkai Sashsi*, 37, 217, 1996.
13. Albengres E. Systemic antifungal agents. Drug interactions of clinical significance. *Drug Saf.*, 18, 83, 1998.
14. Etest Manual (International version) AB BIODISK, Pyramidvagen 7, S-171 36 Solna, Sweden, 1998.
15. Hamilton-Miller J.M.T.J. Sterols from polyene-resistant mutants of *Candida albicans*. *Gen. Microbiol.*, 73, 201, 1972.
16. Kim S.J., Kwon-Chung K.J., Milne G. W. A., Hill W. B. and Patterson G. Relationship between polyene resistance and sterol compositions in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 7, 98, 1975.
17. Pierce A.M., Pierce H.D., Jr., Unrau A. M. and Oehlschlager A. G. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. *Can. J. Biochem.*, 56, 135, 1978.
18. Woods R.A., Bard M., Jackson I.E. and Drutz D.J. Resistance to polyene antibiotic and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. *J. Infect. Dis.*, 129, 129, 1974.
19. Horsburgh C.R. and Kirkpatrick C.H. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketconazole: experience with twenty-one patients. *Am. J. Med.*, 74, 23, 1983.
20. Odds F.C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31, 463, 1993.
21. Espinel-Ingroff A. and Pfaller M.A. Antifungal Agents and Susceptibility Testing. In: *Manual of Clinical Microbiology* (Sixth Edition). Edited by: P.R. Murray. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005. 1406, 1995.

22. Goa K.L. and Barradell L.B. Therapeutic experience with fluconazole. *Drugs*, **50**, 658, 1995.
23. Rex J.H., Rinaldi M.G. and Pfaller M.A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 1, 1995.
24. Sanglard D., Ischer F., Calabrese D., De Micheli M. and Sille J. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resist. Updates*, **1**, 293, 1998.
25. Frosco M. and Barrett J. E. Importance of antifungal drug resistance: clinical significance and need for novel therapy. *Drugs*, **7**, 173, 1998.
26. Vanden Bossche H., Dromer F., Improvisi I., Lorano-Chiu M., Rex J. H. and Sanglard D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med. Mycol.*, **36**, 113, 1998.
27. Marco F., Pfaller M.A., Messer S. and Jones R.N. Antifungal activity of a new triazole, voriconazole (UK-109,496) compared with three other antifungal agents tested against clinical isolates of filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 161, 1998.
28. Marco F., Pfaller M.A., Messer S. and Jones R.N. *In vitro* activities of voriconazole (UK-109,496) and four other antifungal agents against 394 clinical isolates of *Candida* spp. *Med. Mycol.*, **36**, 433, 1998.
29. Cuenca-Estrella M., Ruiz-Diez B., Martínez-Suárez J.V., Monzon A. and Rodríguez-Tudela J.L. Comparative *in vitro* activity of voriconazole and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **43**, 149, 1999.
30. Sanglard D., Issher F., Koymans L. and Sille J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase from azole resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 241, 1998.
31. Carrillo-Muñoz A. J., Abarca-Salat L. and Quindos G. Pruebas de estudio de sensibilidad a los antifúngicos. Factores y variables que influyen en su realización en el laboratorio. *Revista Iberoamericana de Micología*, **11**, 105, 1994.
32. Pfaller M.A., Rex J.H. and Rinaldi M.G. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin. Infect. Dis.*, **24**, 776, 1997.
33. Sudo T., Makimura K., Kawata K., Ito A., Oka S., Uchida K. and Yamaguchi H. Evaluation of antifungal susceptibility testing by the broth microdilution method against *Candida* species. Activities of 5 antifungal agents against *Candida* species isolated from oral candidiasis or other candidal infectious diseases and correlation of *in vitro* data and clinical outcome of fluconazole therapy. *Nippon Kagaku Ryoho Gakkai Sashi*, **45**, 115, 1997.
34. Galgiani J.N., Bartlett M.S., Ghannoum M.A., Espinell-Ingroff A., Lancaster M.V., Odds F.C., Pfaller M.A., Rex J.H., Rinaldi M.G. and Walsh T.J. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard. NCCLS M 27-A. 1996.
35. Pfaller M.A., Bartlett M.S., Espinell-Ingroff A., Ghannoum M.A., Odds F.C., Rex J.H., Rinaldi M.G. and Walsh T.J. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Proposed Standard. NCCLS M 38-P. 1998.
36. Pfaller M.A., Messer S.A., Hollis R.J., Espinell-Ingroff A., Channoum M.A., Plavan H., Killian S.S. and Knap C.C. Multisite reproducibility of MIC results by the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal susceptibility panel. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 543, 1998.
37. Hawser S.P., Norris H., Jessup C.J. and Channoum M.A. Comparison of a XTT colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeasts isolates for susceptibility to antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1450, 1998.
38. Pfaller M.A., Arikian S., Lozano-Chiu M., Chen Y. S., Coffman S., Messer S.A., Rennie R., Sand C., Heffner T., Rex J.H., Wang J. and Yamane N. Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2609, 1998.
39. Lee W. and Kwak Y. Antifungal susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *J. Korean Med. Sci.*, **14**, 21, 1999.
40. Wise R. The development of new antimicrobial agents. *Brit. Med. J.*, **317**, 643, 1998.
41. Richard F.H. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, **6**, 1, 1993.
42. Alexander B.D. and Perfect J.R. Antifungal resistance trends towards the year 2000. *Drugs*, **54**, 857, 1997.
43. Hector R.F. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, **6**, 1, 1993.
44. Kappe R. Antifungal activity of the new azole UK-109, 496 (voriconazole). *Mycoses*, **43**, 83, 1999.
45. Biot C. Synthesis and antifungal activity of a ferrocene-fluconazol analogue. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 839-841, 2000.
46. Cardia M.C. Synthesis and antimicrobial activity of novel arylideneisothiosemicarbazones. *II Farmaco*, **55**, 93, 2000.
47. Agarwal N. Suitably functionalised pyrimidines as potential antimycotic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 703, 2000.
48. Al-Thebeiti M.S. Synthesis of some new thiazolo (3,2-a) pyridines and related heterocyclic systems. *II Farmaco*, **55**, 109, 2000.
49. Muller F.M., Lyman C. A y Walsh T. J. Antimicrobial peptides as potential new antifungals. *Mycoses*, **43**, 77, 1999.
50. Pandeya S.N. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of norfloxacin mannich bases. *Eur. J. Med. Chem.*, **35**, 249, 2000.
51. Ben-Josef A.M. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of a novel complex carbohydrate: CAN-296. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **13**, 287, 2000.
52. Ueda S., Tanaka M., Ezaki M., Sakamoto K., Hashimoto S., Ito K., Nagao K., Higaki T., Oohata N., Tsuboi M. and Yamashita M. Studies on a novel lipopeptide acylase from *Streptomyces* spp. for production of FR179642, a key intermediate of antifungal lipopeptide drug FK463. Annual meeting of the American Society for Microbiology, 38th ICAAC, 1998.