

SENSIBILIDAD *in vitro* DE *Candida albicans* A DIVERSOS ANTIFUNGICOS*

Por J. M. Aller Gancedo,
M. Fernández Díez y
J. Rojo Vázquez

INTRODUCCION

En 1839, Schwann demostró que ciertos compuestos químicos eran letales para las levaduras; desde esta fecha se han ensayado infinidad de sustancias contra los hongos, muchas de las cuales tienen acción *in vitro*, pero carecen de acción *in vivo*. En medicina humana y veterinaria se han venido utilizando diferentes compuestos, entre los cuales se encuentran los preparados iodados, diversos ácidos grasos y ésteres, colorantes trifénil metánicos; derivados del benzotiazol, del imidazol, del fenol y quinolina; sales de amonio cuaternario, sales de ciertos metales pesados, antibióticos, así como combinaciones de distintas sustancias.

Al igual que ocurre en el campo de la bacteriología, se ha observado en las levaduras la aparición de resistencias a determinados antifúngicos, tanto en el medio natural, como en el laboratorio tras cultivos *in vitro*. Así, con respecto a la 5-fluorocitosina, SCHÖNEBECK y ANSÉHN²² encontraron cepas resistentes de *Candida albicans*, sobre todo en enfermos que habían sido tratados con dosis bajas; asimismo, NORMARK y SCHÖNEBECK¹⁷ afirmaron que eran bastante frecuentes las mutaciones espontáneas de cepas sensibles a resistentes. Respecto a la nistatina, WINNER y HURLEY³³ hacen referencia a varios autores que fracasaron a la hora de localizar cepas de *C. albicans* naturalmente resistentes, así como al intentar inducir habituación a la misma; por el contrario, otros autores han obtenido resultados opuestos, entre los que citamos a TEBYAKINA y

* Una parte de este trabajo fue presentada en el VI Congreso Nacional de Microbiología, Santiago de Compostela, 1977.

An. Fac. Vet. León, 1978, 24, 61-71.

CHAIKOVSKAYA²⁹, que consiguieron inducir resistencia en algunas cepas, y HEJZLAR y VÝMOLA⁹ que aislaron cepas resistentes a partir de muestras clínicas. En relación con la anfotericina B, LONES y PEACOCK¹² consiguieron cepas de *C. albicans* que presentaban cierta resistencia, después de cultivos sucesivos en medios que contenían cantidades crecientes de este antibiótico. Con el clotrimazol, BODENHOFF³, al contrario que PLEMPER y col.¹⁸, aisló cepas de *C. albicans* con alguna resistencia.

Otros autores han publicado trabajos a propósito del aislamiento de cepas de *C. albicans* naturalmente resistentes a determinados antifúngicos, o que desarrollaron resistencia debido a tratamientos con dosis bajas o por sucesivos pasos en medios que contenían el antifúngico. Por todo ello, teniendo en cuenta la creciente importancia, tanto en medicina humana como veterinaria, de los procesos de etiología levaduriforme, hemos considerado interesante conocer la sensibilidad *in vitro* de algunas cepas de *C. albicans* aisladas en nuestra zona, con respecto a varios antifúngicos de frecuente uso en la clínica.

MATERIAL Y METODOS

Se ha estudiado la sensibilidad *in vitro* a 6 antifúngicos de 8 cepas de *Candida albicans*. Por el método de las diluciones seriadas en medio líquido se obtuvieron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima fungicida (CMF); asimismo, por el método de difusión con disco se hallaron los halos de inhibición.

Cepas. Las 8 cepas de *C. albicans* fueron aisladas en nuestro laboratorio, 4 de leche de vaca¹⁹ y 4 de flujo vaginal humano¹⁵, habiendo sido mantenidas bajo refrigeración, con resiembres periódicas durante 6-7 años.

En su día, estas cepas fueron identificadas como *C. albicans*, basándose en las pautas recomendadas en *The yeasts*¹¹, así como en la producción de tubos germinales¹³. En trabajos previos^{7, 20}, resultaron patógenas para el ratón Swiss blanco hembra, por vía intravenosa, oscilando su DL₅₀ entre $1,7 \times 10^4$ y $4,7 \times 10^5$.

Antifúngicos. Se emplearon, nistatina, anfotericina B, tricomicina, miconazol, clotrimazol y 5-fluorocitosina (5-FC), de cada uno de los cuales se disolvieron 100 mg inicialmente en 2 ml de dimetilformamida (nistatina y anfotericina B), 5 ml de alcohol etílico al 50 % (miconazol) y 5 ml de alcohol etílico absoluto (clotrimazol); seguidamente se incorporó agua destilada estéril para obtener la solución madre. La tricomicina y 5-FC se disolvieron directamente en agua destilada estéril.

Inóculo. En las pruebas realizadas se utilizó como inóculo una suspensión de levaduras en agua destilada estéril, ajustada por contejo en cámara de Neubauer a una concentración de 10^6 levaduras por ml. Dicha suspensión se

obtuvo a partir de un cultivo de 24 horas a 37°C en agar glucosado de Sabouraud (Sabouraud dextrose agar-Difco).

Método de dilución en medio líquido. Se halló la CMI por el método de las diluciones seriadas (factor 2), utilizando como medio de cultivo caldo glucosado de Sabouraud (Sabouraud dextrose broth-Difco). Para ello se prepararon tubos de ensayo con 4,8 ml del medio, a los que se añadió 0,1 ml del inóculo ajustado y 0,1 ml de las distintas concentraciones de antifúngico obtenidas a partir de la solución madre. Con ello se consiguieron unas concentraciones finales comprendidas entre 200 y 0,006 µg de antifúngico por ml de medio de cultivo. Igualmente, se prepararon tubos control de los disolventes.

La lectura de la CMI se efectuó después de haber incubado los tubos a 27°C durante 48 horas, momento en el que se observó por transparencia el crecimiento de las levaduras. Se tomó como CMI, la concentración más baja de antifúngico que dio lugar a la falta total de crecimiento visible.

La CMF se halló a partir de los tubos empleados para la CMI que no presentaron crecimiento visible de levaduras. Partiendo de estos tubos se sembraron placas de agar glucosado de Sabouraud, tomando como inóculo el contenido de un asa de platino de 4 mm de diámetro interno (aproximadamente 0,01 ml). Después de incubar las placas a 27°C durante 48 horas, se tomó como CMF la concentración más baja de antifúngico que dio lugar a la falta de crecimiento o que como máximo permitió el desarrollo de tres colonias.

Método de difusión con disco. Se utilizaron placas de Petri de 9 cm de diámetro interno y agar glucosado de Sabouraud como medio de cultivo.

La superficie de la placa se sembró uniformemente en tres direcciones, con un hisopo previamente humedecido en la suspensión de levaduras y liberado del exceso de inóculo. Previo secado de la superficie durante unos minutos, se depositaron cuatro discos por placa, cada uno de los cuales contenía 45, 30, 15 y 1 µg de antifúngico, respectivamente.

Los discos tenían un diámetro aproximado de 6 mm y fueron preparados en nuestro laboratorio.

A continuación se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas, momento en el que se realizó la lectura del diámetro de los halos de inhibición. En algunos casos se observó una zona intermedia con ligero crecimiento de algunas colonias, que no fueron tenidas en cuenta.

Con la 5-FC, además del agar glucosado de Sabouraud, se utilizó como medio de cultivo Yeast Nitrogen Base-Difco adicionándole L-asparagina, dextrosa y agar (agar YNB/A/D), tal como lo describe SHADOMY²⁴.

Los antifúngicos utilizados en este trabajo fueron proporcionados gratuitamente por las casas comerciales que se citan: Nistatina y anfotericina B (Squibb Industria Farmacéutica-Barcelona), tricomicina (Laboratorios Inibsa-Barcelona), 5-fluorocitosina (Productos Roche-Madrid), nitrato de miconazol

(Laboratorios del Dr. Esteve-Barcelona), clotrimazol (Instituto Bayer de Terapéutica Experimental-Barcelona).

RESULTADOS

Las CMIs y CMFs obtenidas por el método de dilución en medio líquido figuran en el Cuadro n.º 1. Se puede observar que generalmente, no existieron diferencias acusadas entre los resultados obtenidos con cada una de las ocho cepas de *C. albicans*; de igual modo, tampoco existieron grandes diferencias entre los resultados hallados con las cepas de origen humano y las de procedencia animal.

En el Cuadro n.º 2 se indican las medias de las CMIs y CMFs de los distintos antifúngicos para las ocho cepas. La mayor acción inhibidora correspondió a la tricomicina, con una CMI media de 0,019 µg/ml, seguida de la anfotericina B con 0,48 µg/ml, nistatina 1,56 µg/ml, 5-fluorocitosina 10,94 µg/ml, clotrimazol 14,84 µg/ml y miconazol 46,87 µg/ml.

Las CMFs oscilaron desde poseer un valor idéntico a la CMI, hasta llegar a representar más de 32 veces su valor. No obstante, fueron más frecuentes aquellos casos en que la CMF fue idéntica a la CMI o alcanzó valores 2-4-8 veces superiores. Con el miconazol, las CMFs coincidieron casi en su totalidad con las CMIs, mientras que con la tricomicina y 5-FC las CMFs fueron bastante superiores.

La media aritmética de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con el método del disco figura en el Cuadro n.º 3. Los mayores halos de inhibición los produjo la 5-FC, seguida de la nistatina, tricomicina, clotrimazol, miconazol y anfotericina B. Salvo el clotrimazol y miconazol, el resto de los antifúngicos no dieron halo de inhibición con los discos impregnados con 1 µg. Tal como era de esperar, se observó que los mayores halos de inhibición correspondieron a los discos impregnados con la concentración más alta. A partir de los discos de 15 µg, el aumento del diámetro del halo fue insignificante con el miconazol e inexistente con el clotrimazol.

La anfotericina B dio lugar a halos muy pequeños que solamente llegaron a 13 mm en cuatro casos. La media tan baja de 11,7 mm obtenida con los discos cargados con 45 µg, que contrasta con los buenos resultados observados en la CMI, puede explicarse por la escasa difusibilidad del antibiótico en el agar glucosado de Sabouraud.

En agar YNB/A/D, los discos de 5-FC inhibieron casi totalmente el crecimiento de las ocho cepas de *C. albicans*, lo que dio lugar a que no hubiese posibilidad de medir halos de inhibición; tan solo crecieron algunas colonias en la zona que correspondería al límite del halo del disco de 1 µg.

CUADRO I
Concentración mínima inhibidora (CMI) y fungicida (CMF) de 6 antifúngicos, para 8 cepas de *Candida albicans* (a).

Cepas	TRICOMICINA		ANFOTERICINA B		NISTATINA		5-FLUOROCITO-SINA		CLOTROIMAZOL		MICONAZOL	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
(b)	1-H	0,012	0,19	0,19	1,56	0,78	3,12	6,25	50	12,5	100	50
	2-H	0,006	0,024	0,39	0,78	1,56	1,56	12,5	>200	12,5	50	50
	4-H	0,012	0,097	0,19	0,78	0,78	3,12	25	>200	25	100	50
	5-H	0,024	0,39	0,39	0,78	3,12	3,12	12,5	50	12,5	100	25
(c)	25-L	0,024	0,78	0,78	1,56	0,78	3,12	6,25	>200	12,5	50	50
	26-L	0,024	0,048	0,78	0,78	1,56	3,12	6,25	50	12,5	100	50
	28-L	0,024	0,78	0,39	1,56	0,78	6,25	12,5	>200	25	100	50
	63-L	0,024	0,39	0,78	0,78	3,12	6,25	6,25	200	6,25	50	50

(a) Los resultados se expresan en microgramos por mililitro (µg/ml).

(b) Cepas aisladas a partir de fluido vaginal humano.

(c) Cepas aisladas de leche de abasto (vaca).

CUADRO 2

Medias de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y fungicidas (CMF) de 6 antifúngicos, para 8 cepas de *Candida albicans* (a)

Antifúngicos	CMI	CMF
TRICOMICINA	0,019	0,34
ANFOTERICINA B	0,48	1,07
NISTATINA	1,56	3,71
5-FLUOROCITOSINA	10,94	>143,7
CLOTRIMAZOL	14,84	81,25
MICONAZOL	46,87	50

(a) Los resultados se expresan en $\mu\text{g}/\text{ml}$.

CUADRO 3

Medias de los diámetros de los halos de inhibición de 6 antifúngicos, para 8 cepas de *Candida albicans* (a)

Discos	1 μg	15 μg	30 μg	45 μg
5-FLUOROCITOSINA (b)	—	27,87	31,25	33,5
(c)		halos no medibles		
NISTATINA	—	14,12	20,75	22,12
TRICOMICINA	—	13,93	17,37	18,47
CLOTRIMAZOL	13,25	17,12	17	16,87
MICONAZOL	11,62	13,62	14	14,37
ANFOTERICINA B	—	10,5	11,12	11,75

(a) Los resultados se expresan en mm.

(b) En agar glucosado de Sabouraud.

(c) En agar yeast nitrogen base-L asparagina-dextrosa.

DISCUSION

A la vista de las CMIs obtenidas, el antifúngico más activo fue la tricomicina, seguida de la anfotericina B y nistatina; ya a más distancia, con CMIs más elevadas, siguieron la 5-fluorocitosina; clotrimazol y miconazol. El poder inhibidor del clotrimazol y sobre todo del miconazol fue bastante bajo. Los antifúngicos que dieron las CMIs más bajas no se correspondieron exactamente con los que produjeron los mayores halos de inhibición, sin duda debido a que los antifúngicos difieren en cuanto a su difusibilidad en el medio sólido. En este sentido, la anfotericina B, que en medio líquido produjo unas CMIs bastante bajas, al difundir poco en el medio sólido dio lugar a unos halos insignificantes; por el contrario, la 5-FC, con unas CMIs bastante más altas, dio lugar a grandes halos de inhibición.

Debido al escaso número de cepas con que se ha trabajado, no se han podido establecer análisis de regresión tendentes a obtener, con los antifúngicos que fuese posible, una correlación entre las CMIs y los halos de inhibición,

que pudiese indicarnos la mayor o menor acción inhibidora del antifúngico, a la vista del diámetro de los halos obtenidos por el método del disco. No obstante, pudo observarse cierta correlación en la tricomicina y en la 5-FC; con este último antifúngico, la existencia de correlación ha sido demostrada por varios autores^{16, 30}. Una evidencia del interés de la prueba del disco para indicar la acción inhibidora de algunos antifúngicos, se deduce del hecho de que al menos son comercializados discos con 1 μg de 5-FC (Hoffmann-La Roche, Suiza) y 100 U. de nistatina (Difco, USA; bioMérieux, Francia).

Según SHADOMY²⁴, existe una pérdida significante de la actividad antifúngica de la 5-FC cuando se utilizan medios que contienen materiales biológicos parcialmente degradados, por lo que recomienda el empleo de un medio sintético y desaconseja la utilización de los medios micológicos comunes. En el método del disco hemos utilizado para la 5-FC el medio recomendado por este autor (agar YNB/A/D), pudiendo comprobarse que, efectivamente, la acción inhibidora de la 5-FC en este medio es superior, ya que inhibió totalmente el crecimiento de *C. albicans*. Este hecho impidió que se obtuviesen unos halos de inhibición medibles, incluso con los discos de 1 μg . En agar glucosado de Sabouraud el poder inhibidor de la 5-FC fue menor, pero se obtuvieron unos buenos halos de inhibición, fácilmente medibles, excepto con los discos de 1 μg , que carecieron de poder inhibidor. En relación con lo expuesto, es de suponer que, en caldo YNB/A/D, la 5-FC habría dado unas CMIs inferiores a las obtenidas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la prueba del disco efectuada, utilizando el medio de Sabouraud deberían emplearse discos cargados con al menos 15 μg de antifúngico; la anfotericina B por su escasa difusibilidad no parece indicada para la prueba del disco, al menos en este medio.

Con frecuencia existe falta de uniformidad entre los distintos investigadores, con respecto al método y técnica utilizados a la hora de probar la sensibilidad de las levaduras a un determinado antifúngico. Los medios de cultivo, temperatura y tiempo de incubación, inóculo, lectura de los resultados, etc., son muy variados, lo cual influye en que no puedan compararse totalmente algunos resultados. No obstante, teniendo en cuenta estas diferencias, hemos confeccionado el Cuadro n.º 4, en el que pueden observarse las CMIs y algunas CMFs obtenidas por diferentes autores, habiéndose escogido (en algún caso) de entre todos los resultados, aquellos que fueron obtenidos en unas condiciones técnicas más parecidas a las de nuestro trabajo. Entre paréntesis figuran nuestros resultados, que son encuadrables en su casi totalidad dentro de los obtenidos por estos autores.

CUADRO 4

Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y fungicidas (CMF) de 6 antifúngicos, para *Candida albicans*, obtenidas por diversos autores y en el presente trabajo (a)

		CMI	CMF
TRICOMICINA	Magara y col. (1954)	0,25-0,5	
	Hosoya y col. (1955)	0,005	
	Caretta y col. (1958)	0,1	
	Seiga y col. (1973)	0,017-0,078	
ANFOTERICINA B	(b)	(0,006-0,024)	(0,024-0,78)
	Scholer (1970)	0,2-0,4	
	Shadomy (1971)	0,39	1,56
	Hamilton (1972)	0,25-4	
	Boyer (1976)	0,10-1,50	0,80-6,50
	Bannatyne y col. (1977)	0,125->2	
NISTATINA	(b)	(0,19-0,78)	(0,78-1,56)
	Caretta y col. (1958)	1,6	
	Hejzlar y col. (1970)	1,56->100	
	Bondenhoff (1971)	4-10	
	Andreini y col. (1975)	5	
	Boyer (1976)	1,50-6	
5-FLUOROCITOSINA	(b)	(0,78-3,12)	(1,56-6,25)
	Shadomy (1969)	0,23->1.000	15,6->1.000
	Shadomy (1970)	<6,25->100	
	Scholer (1970)	0,025-0,8	
	Hamilton (1972)	<0,13->100	
	Schonebeck y col. (1973)	0,4->1.638	
CLOTRIMAZOL	(b)	(6,25-25)	(50->200)
	Plempel y col. (1969)	<1-4	
	Bodenhoff (1971)	1-25	
	Wehrspann (1971)	<1,25->10	
	Shadomy (1971)	1,56-3,13	3,13->100
	Waitz y col. (1971)	0,03-0,8	
MICONAZOL	(b)	(6,25-25)	(50-100)
	van Cutsen (1972)	10	
	Sreedhara y col. (1974)	1	
	Shadomy y col. (1977)	<1->16	
	(b)	(25-50)	(50)

(a) Los resultados se expresan en $\mu\text{g}/\text{ml}$ y representan los valores extremos obtenidos por cada autor.
 (b) Entre paréntesis figuran los valores extremos obtenidos en el presente trabajo.

RESUMEN

Se ha estudiado la sensibilidad *in vitro* de ocho cepas de *Candida albicans* frente a seis antifúngicos; cuatro cepas procedían de leche de vaca y cuatro de flujo vaginal humano.

Se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) por el

método de dilución, utilizando caldo glucosado de Sabouraud como medio de cultivo. Posteriormente, tras resiembra en agar glucosado de Sabouraud, se hallaron las concentraciones mínimas fungicidas (CMFs).

Las CMIs y CMFs, valores medios de todas las cepas, fueron las siguientes: tricomicina (0,019 y 0,34 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anfotericina B (0,48 y 1,07 $\mu\text{g}/\text{ml}$), nistatina (1,56 y 3,71 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5-fluorocitosina (10,94 y > 143,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$), clotrimazol (14,84 y 81,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y miconazol (46,87 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Por el método del disco se hallaron los halos de inhibición, utilizando agar glucosado de Sabouraud como medio de cultivo; asimismo, se utilizó agar Yeast Nitrogen Base-L asparagina-dextrosa para la 5-fluorocitosina. Con todos los antifúngicos se utilizaron discos cargados con 1, 15, 30 y 45 μg de antifúngico, señalándose que en el medio de Sabouraud los discos cargados con 1 μg no dieron halos significativos. Los mayores halos de inhibición correspondieron a la 5-fluorocitosina, seguida de la nistatina, tricomicina, clotrimazol, miconazol y, ya con halos muy pequeños, la anfotericina B.

SUMMARY

We have studied the *in vitro* sensitivity of 8 strains of *Candida albicans* for 6 antifungal agents; 4 of the strains come from cow's milk and the other 4 from human vaginal exudate.

Minimal inhibitory concentrations (MICs) were obtained by the dilution method using Sabouraud dextrose broth as culture medium. Later on, the minimal fungicidal concentrations (MFCs) was established after subculture in Sabouraud dextrose agar.

The mean MICs and MFCs values for all strains were: trichomycin (0,019 and 0,34 $\mu\text{g}/\text{ml}$), amphotericin B (0,48 and 1,07 $\mu\text{g}/\text{ml}$), nystatin (1,56 and 3,71 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5-fluorocytosine (10,94 and > 143,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$), clotrimazole (14,84 and 81,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and miconazole (46,87 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Zones of inhibition were established with the diffusion disk method, using Sabouraud dextrose agar as culture medium, and in the case of 5-fluorocytosine it was also used the Yeast nitrogen base agar with L-asparagine and dextrose. Disks loaded with 1, 15, 30 and 45 μg of antifungal agent were used in all cases. The disks containing 1 μg did not produce any significant zone of inhibition when the Sabouraud medium was used. The greatest zones of inhibition corresponded to 5-fluorocytosine, followed by nystatin, trichomycin, clotrimazole, miconazole and much smaller zones of inhibition were found in the case of amphotericin B.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDREINI, G., BERETTA, C. Jr., ORMAS, P. y SONZOGNI, O. (1975).-Attività antifungina degli antibiotici axenomicina, lucensomicina, nistatina. *Atti Soc. Ital. Sci. vet.*, **29**: 303-306.
- 2) BANNATYNE, R. M. y CHEUNG, R. (1977).-Comparative susceptibility of *Candida albicans* to amphotericin B and amphotericin B methyl ester. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12**: 449-450.
- 3) BODENHOFF, J. (1971).-A new antimycotic from Bayer AG, Bay b 5097. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, **79**: 345-348.
- 4) BOYER, J. M. (1976).-Impregnated disk method for antifungal antibiotic testing. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9**: 1070-1071.
- 5) CARETTA, G. y FÜRESZ, S. (1958).-Azione della tricomicina e della nistatina sulle *Candidae* e sul *Trichomonas vaginalis*. *C. Malatt. Infett. Parass.*, **10**: 742-744.
- 6) CUTSEM, J. M. Van y THIENPONT, D. C. (1972).-Miconazole, a broad-spectrum antimycotic agent with antibacterial activity. *Chemotherapy*, **17**: 392-404.
- 7) FERNÁNDEZ DÍEZ, M., ALLER GANCEDO, J. M. y ALLER, B. (1974).-Patogenicidad experimental para el ratón de *Torulopsis glabrata* y diversas especies del género *Candida*. *Rev. Iber. Parasitol.*, **34**: 283-293.
- 8) HAMILTON-MILLER, J. M. T. (1972).-A comparative *in vitro* study of amphotericin B, clotrimazole and 5-fluorocytosine against clinically isolated yeasts. *Sabouraudia*, **10**: 276-283.
- 9) HEJZLAR, M. y VÝMOLA, F. (1970).-Comparative study of pimaricin and fungicidin activity in vitro. *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun.*, **14**: 211-213.
- 10) HOSOYA, S., SOEDA, M., KAMATSU, N., IMARURA, K. S., OKADA, K., NAKAZAWA, S. y YAMAGUCHI, T. (1955).-Trichomycin, ein neues antibioticum aus *Streptomyces hachijoensis* mit trichomonadicider und antibiotischer wirksamkeit. *Aerztl. Forsch.*, **9**: 46-49.
- 11) LODDER, J. edit. (1970).-*The yeasts. A taxonomic study*. 2 nd. ed. North Holland Publ. Co. Amsterdam-London.
- 12) LONES, G. W. y PEACOCK, C. L. (1959).-Alterations in *Candida albicans* during growth in the presence of amphotericin B. *Antibiotics Chemother.*, **9**: 535-540.
- 13) MACKENZIE, D. W. R. (1962).-Serum tube identification of *Candida albicans*. *J. clin. Path.*, **15**: 563-565.
- 14) MAGARA, M., YOKOUTI, E., SENDA, T. y AMINO, E. (1954).-The action of a new antibiotic, trichomycin, upon *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, and anaerobic bacteria. *Antibiotics Chemother.*, **4**: 433-438.
- 15) MANERO MARTÍNEZ, S. (1972).-Flora levaduriforme de la vagina humana durante el embarazo. *An. Fac. Vet. León*, **18**: 53-94.
- 16) MARKS, M. I. y EICKHOFF, T. C. (1971).-Application of four methods to the study of the susceptibility of yeasts to 5-fluorocytosine. En HOBBY, G. L. edit.: *Antimicrobial agents and chemotherapy-1970*. Am. Soc. Microbiol., Bethesda, Md., 491-493.
- 17) NORMARK, S. y SCHÖNEBECK, J. (1972).-In vitro studies of 5-fluorocytosine resistance in *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**: 114-121.
- 18) PLEMPEL, M., BARTMANN, K., BUCHEL, K. H. y REGEL, E. (1969).-Experimentelle Befunde über ein neues, oral wirksames antimykotikum mit breitem wirkungsspektrum. *Dt. med. Wschr.*, **94**: 1356-1358.
- 19) REY FERNÁNDEZ, M. (1972).-Incidencia de levaduras en la leche de abasto de la provincia de León. *An. Fac. Vet. León*, **18**: 95-150.
- 20) REY, M., FERNÁNDEZ DÍEZ, M. y ALLER, B. (1973).-Patogenicidad para el ratón de *Candida albicans* de origen humano y bovino, por inyección intravenosa. *Microbiol. Espan.*, **26**: 179-187.
- 21) SCHOLER, H. J. (1970).-Antimykoticum 5-fluorocytosin. *mykosen*, **13**: 179-188.
- 22) SCHÖNEBECK, J. y ANSÉHN, S. (1973).-5-fluorocytosine resistance in *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*. *Sabouraudia*, **11**: 10-20.
- 23) SEIGA, K., YAMAJI, K. y SUGIYAMA, Y. (1973).-Symptomatology and chemotherapy of nonspecific vaginitis. *Asian Med. J.*, **16**: 45-64.
- 24) SHADOMY, S. (1969).-In vitro studies with 5-fluorocytosine. *Appl. Microbiol.*, **17**: 871-877.
- 25) SHADOMY, S. (1970).-Further in vitro studies with 5-fluorocytosine. *Infec. Immun.*, **2**: 484-488.
- 26) SHADOMY, S. (1971).-In vitro antifungal activity of clotrimazole (Bay b 5097). *Infec. Immun.*, **4**: 143-148.
- 27) SHADOMY, S., PAXTON, L., ESPINEL-INGROFF, A. y SHADOMY, H. J. (1977).-*In vitro* studies with miconazole and miconazole nitrate. *J. Antimicrob. Chemother.*, **3**: 147-152.
- 28) SREEDHARA SWAMY, K. H., SIRSI, M. y RAMANANDA RAO, G. (1974).-Studies on the mechanism of action of miconazole: effect of miconazole on respiration and cell permeability of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**: 420-425.
- 29) TEBYAKINA, A. E. y CHAIKOVSKAYA, S. M. (1960).-Obtaining *Candida* strains resistant to nystatin and their characteristic properties. *Antibiotiki*, **5**: 91-95.
- 30) UTZ, J. y SHADOMY, S. (1977).-Antifungal activity of 5-fluorocytosine as measured by disk diffusion susceptibility testing. *J. Infect. Dis.*, **135**: 970-974.
- 31) WAITZ, J. A., MOSS, E. L. y WEINSTEIN, M. J. (1971).-Chemotherapeutic evaluation of clotrimazole [Bay b 5097, 1 (o-chloro- α - α -diphenylbenzyl) imidazole]. *Appl. Microbiol.*, **22**: 891-898.
- 32) WEHRSPANN, P. (1971).-Die in vitro-Empfindlichkeit der wichtigsten Sprosspilze gegen Bay b 5097. *mykosen*, **14**: 525-529.
- 33) WINNER, H. I. y HURLEY, R. (1964).-*Candida albicans*. J. & A. Churchill Ltd. London.