

REVISIÓN

PRUEBA ÉPSILON (Etest)

Sergio Jaramillo Velásquez*

RESUMEN

La Prueba Épsilon (Etest) es un método con una base de agar para evaluar susceptibilidad microbiana, desarrollado para vencer las desventajas de la difusión en disco y los métodos de dilución convencional, mientras mantiene los aspectos favorables de ambos procedimientos. Consiste en un gradiente definido y continuo de antibiótico precalibrado, que cubre 15 diluciones dobles. El Etest se procesa tan fácilmente como la prueba de disco y genera valores precisos de concentración inhibitoria mínima y altamente reproducibles. La prueba ha sido exitosamente utilizada contra microorganismos aerobios, anaerobios, organismos de difícil crecimiento y de crecimiento lento como H. influenzae, S. pneumoniae, Neisseria spp. Legionella spp. También ha sido evaluado para antibióticos "problema" como imipenem, glicopéptidos como vancomicina y teicoplanina y combinaciones de inhibidores de Beta lactamasas, tales como amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam. Complementa sistemas de tamizaje, de discos y sistemas automatizados como Vitek, Microscan y Pasco, en áreas donde estos métodos pueden ser limitados y los resultados son cuestionables o no reproducibles. El Etest es reconocido como una herramienta de CIM para vigilancia epidemiológica. Se está convirtiendo en el método estándar de las compañías farmacéuticas en la evaluación de nuevos antibióticos, de comparaciones multicéntricas grandes y ensayos clínicos.

PALABRAS CLAVES: PRUEBA ÉPSILON, LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

SUMMARY

Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) is an agar based method for susceptibility testing, created to overcome the disadvantages of the disc diffusion and conventional dilution methods while retaining the favorable aspects of both procedures. It comprises a defined and continuous precalibrated antibiotic gradient which covers 15 two fold dilutions. Etest is processed as easily as disc testing and generates accurate and highly reproducible MIC values. It has been successfully evaluated against aerobes, anaerobes, fastidious and slow growing organisms and has been successfully evaluated against antibiotics such as glycopeptides e.g. vancomycin and teicoplanin, imipenem and antibiotic combinations such as amoxicillin/clavulanic acid, ticarcillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam and piperacillin/tazobactam. It complements screening systems, such as discs and automated systems like Vitek, Microscan and Pasco, in areas where these methods may be limited and results are questionable or not reproducible. Etest is a valuable MIC tool for epidemiological surveillance. It is now rapidly becoming the standard method used by pharmaceutical companies in the evaluation of new antibiotics and for large comparative multicentre studies.

KEY WORDS: EPSILON TEST, LABORATORY OF MICROBIOLOGY

* Médico Especialista en Medicina de Laboratorio y Gerencia hospitalaria, Jefe Departamento Laboratorio Clínico y de Patología. Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.

INTRODUCCIÓN

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana es la determinación de un patrón de sensibilidad o resistencia de un microorganismo a una batería de agentes antimicrobianos. Hay varios métodos bien desarrollados para detectar el grado de susceptibilidad de los patógenos en los laboratorios de microbiología. La técnica más comúnmente usada en el mundo es la de difusión de los discos en agar, la cual produce un resultado cuantitativo (zona) y una categoría de interpretación cualitativa. Otras pruebas son la de dilución en agar, la macro y microdilución en caldo y más reciente, las técnicas de sensibilidad automatizadas o mecanizadas; los últimos frecuentemente se correlacionan o calibran con los métodos de dilución de referencia, con algunas modificaciones (1-4). La mayoría de estos métodos han sido cuidadosamente estandarizados, tales como aquéllos del Comité Nacional para Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS), que procuran producir resultados reproducibles y predecibles intra e inter laboratorios

(2,5,6). Esto es necesario porque todos estos métodos están sujetos a algunas variaciones causadas por condiciones externas como volumen, contenedor, medio, temperatura, pH, drogas, organismos, etc.. La prueba de difusión en disco es barata y fácil de realizar, pero ofrece solamente un resultado cuantitativo y no una concentración inhibitoria mínima (CIM). La prueba de dilución manual es cuantitativa, pero el procedimiento es dispendioso y costoso (7). Las técnicas mencionadas tienen algunas desventajas: interpretación no cuantitativa (sistemas de CIM de disco o de punto de interrupción), aplicación inconsistente a organismos de difícil crecimiento o de crecimiento lento y anaerobios, inexactitud en la predicción de la susceptibilidad con algunos agentes antimicrobianos que difunden mal en el medio (discos), uso limitado para pruebas directas de material clínico, pasos técnicos demorados y la necesidad de técnicas de control para obtener resultados seguros y reproducibles (8).

CONFIGURACIÓN

El Etest (AB Biodisk, Solna, Suecia) ha sido desarrollado para una cuantificación directa de susceptibilidad antimicrobiana. El mecanismo se basa en un gradiente estable, predefinido, continuo y exponencial de concentración de antibiótico inmovilizado a lo largo de una tirilla plástica impermeable, inerte, no porosa, rectangular de 5x50mm por un lado, y una escala de lectura e interpretativa en

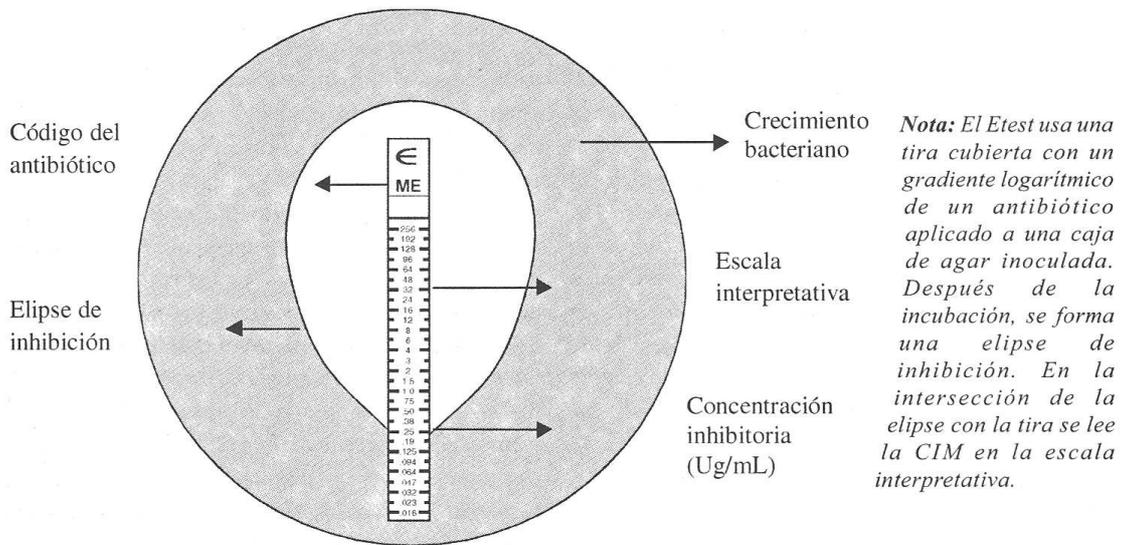
el otro. El agente antimicrobiano se seca y estabiliza en un lado de la tirilla que corresponde a 15 diluciones dobles. Los rangos de concentraciones pueden ser óptimamente diseñados hasta corresponder a rangos de CIM clínicamente importantes y puntos de corte seleccionados por categorías de grupos de susceptibilidad (9).

PRINCIPIO

La tirilla se aplica en una superficie de una caja de agar previamente inoculada. Después de un período de incubación, con el cual el crecimiento bacteriano es visible, se observa una elipse de inhibición. El borde de la zona intercepta la longitud de la tirilla graduada, en la posición donde una concentración

específica del antibiótico causa inhibición y cesa el crecimiento bacteriano. Este valor, llamado la concentración inhibitoria (CI), es una medida directa de la susceptibilidad del microorganismo para un antibiótico particular (7,9,10). (Ver Figura 1).

FIGURA 1. Principio del Etest.



PROCEDIMIENTO

El procedimiento para determinar la susceptibilidad antimicrobiana tiene tres pasos principales:

1. Una caja de agar con un medio de prueba adecuado se inocula de acuerdo con prácticas estándar. Esto puede incluir inundación, limpieza y siembra con el microorganismo. El inóculo usado puede ser una suspensión de un cultivo (generalmente durante la noche), llamado inóculo ICS, o una suspensión de McFarland de 0.5 de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento, el inóculo Kirby-Bauer (9,11).
2. Las tirillas portadoras del antimicrobiano se aplican entonces con la concentración máxima cerca del borde externo de la caja de petri. La caja se incuba inmediatamente en la atmósfera requerida por 15 a 18 horas. Para organismos de difícil crecimiento, con tasas de crecimiento lentas se puede necesitar mayor tiempo de incubación. No se requiere la predifusión a pesar de que las placas pueden ser dejadas por un período considerable previo a la incubación, sin ningún efecto adverso en el resultado (9).
3. Cuando se ve suficiente crecimiento después de una incubación inhibitoria, las concentraciones se leen directamente de la marca que está en la tirilla. La CIM se lee donde la elipse de inhibición intercepta la escala de la tirilla. Siempre se debe leer al punto de completa inhibición del crecimiento. Los resultados pueden ser reportados como un valor cuantitativo, por ejemplo una CI de x mg/mL y/o un grupo de susceptibilidad como es definida por CIM o CI, relacionada con los puntos de corte. El Etest tiene diluciones dobles y diluciones intermedias (9).

EL ETEST PARA AISLAMIENTOS DE RUTINA Y COMO HERRAMIENTA EPIDEMIOLÓGICA

El Etest presenta resultados excelentes cuando se compara con difusión en disco (95.1%), microdilución en caldo (95.1%) y dilución en agar (95.2%) (1,10). Aplicada a la epidemiología y a la terapéutica, esta prueba es de valor para definir el tratamiento más activo, la profilaxis y los grupos de pacientes comprometidos en epidemias (12).

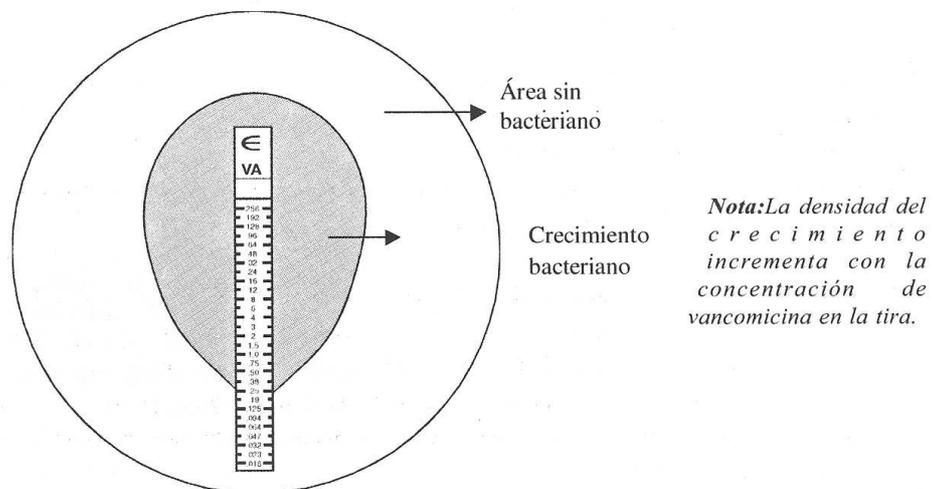
El Etest debe considerarse un método de susceptibilidad simple y seguro para las necesidades emergentes, para evaluar meningococos y otras neisérias patógenas. Se observó que dio mejor soporte de crecimiento el agar chocolate Mueller Hinton, y la CIM del Etest resultó que correlacionaba bien con los resultados del método de dilución en agar previamente usados para neisérias. La concordancia con el método de referencia fue del 93% (12).

Se encontró que el Etest es equivalente a los métodos corrientes de la NCCLS. El Etest aparece como costo-efectivo, rápido e independiente de la costosa instrumentación. Puede ser usado para investigación de nuevas drogas y para vigilancia de resistencia a drogas (13). Es un excelente método para estudios multicéntricos de la evaluación *in vitro* de agentes antimicrobianos (14,15).

La resistencia a la metilina de *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos, se asocia usualmente con la producción de una proteína que enlaza penicilina modificada conocida como PBP2a. El Etest es promovido como una prueba sensible que no se afecta significativamente por cambio en la densidad del inóculo. Métodos convencionales para la detección de resistencia heterogénea a la metilina dependen del inóculo y se demuestra que el Etest no es la excepción. Sin embargo, la CIM de las cepas metilino sensibles y las cepas heterogéneamente resistentes no fueron afectadas por variaciones amplias del inóculo, aún para productores de b-lactamasas. Se sugiere que un gran inóculo, incubación a 30°C y el uso de agar Mueller-Hinton suplementado con sal y no suplementado, son necesarios para la óptima detección de resistencia a la metilina con esta prueba (16).

Farrag publicó la demostración de la dependencia del *Enterococcus faecalis* a la vancomicina usando las tiras de Etest, lo cual es de mucha importancia porque permite observar como el crecimiento incrementa con el incremento de la concentración de vancomicina, lo cual no se detecta con los métodos tradicionales (17). Ver Figura 2.

FIGURA 2. Demostración de dependencia a vancomicina usando la tira de CIM de Etest.



En un estudio de vigilancia realizado en Colombia con Etest para monitorear la potencia y el espectro de seis agentes antimicrobianos de amplio espectro (cefepime, cefotaxime, ceftazidime, cefoperazona/sulbactam, aztreonam e imipenem) contra *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oxacilina sensible y estafilococo coagulasa negativo oxacilina sensible, el orden del espectro antimicrobiano de estos antibióticos fue: imipenem (96.6%), mayor que cefepime (93.6%), mayor que cefoperazona/sulbactam (90.5%), mayor que cefotaxime (74.9%), mayor que aztreonam (74.3% para bacilos gramnegativos únicamente); mayor que ceftazidime (73.2%) (14).

El tamizaje con Etest a b-lactamasas con espectro extendido (ESBL) fue más sensible (100%) que la prueba de aproximación en disco (87%) y fue más conveniente. El tamizaje con la Etest ESBL con un sustrato de ceftazidima, aparece como un método para detectar o validar la presencia de bacilos entéricos potencialmente productores de este tipo de b-lactamasas (18,19).

MICROORGANISMOS DE DIFÍCIL CRECIMIENTO

El método recomendado para determinar la susceptibilidad antimicrobiana a aislamientos de *N. gonorrhoeae* es el método de dilución en agar (6). El porcentaje de concordancia entre el Etest y el anterior fue mayor del 97.7%; por lo tanto, la CIM de esta prueba puede usarse para estimar la CIM que podría obtenerse por el método de dilución en agar, con la ventaja para los laboratorios que procesan poco número de muestras, de determinar la sensibilidad de aislamientos de gonococo razonablemente seguros (20).

Se comparó el desempeño del Etest para *S. pneumoniae* y *H. influenzae* contra la CIM obtenida por

microdilución en caldo, determinado de acuerdo con los estándares de la NCCLS; encontrándose que la CIM determinada por el Etest fue rápida y fácil de interpretar y que representa un método alternativo y adecuado para susceptibilidad antimicrobiana para estos dos gérmenes de difícil crecimiento, siempre y cuando se trabajen con los medios recomendados por el fabricante (21).

La susceptibilidad a la penicilina debe ser determinada para todas las cepas de *S. pneumoniae* aisladas de sangre, LCR y líquidos corporales estériles (22). Aislamientos de otros sitios corporales (por ej. esputo) deben ser evaluados cuando clínicamente esté indicado. La prueba de difusión en disco con oxacilina continúa siendo una prueba de tamizaje creíble, para identificar neumococos resistentes a la penicilina. A los aislamientos con diámetros de inhibición de 19 mm alrededor de discos de oxacilina de 1mg, se les debe determinar la CIM por método de dilución en caldo o en agar. Las cepas a las que se les demuestre algún grado de resistencia a penicilina (MIC 0.1 mg /mL), deben ser evaluadas contra drogas como cefotaxime y ceftriaxona (22). El Etest representa un método de confirmación conveniente y creíble para la detección de cepas de *S. pneumoniae*, resistentes a penicilina y a cefalosporinas (23,24).

En la evaluación de los macrólidos azitromicina, claritromicina y eritromicina contra *Bordetella parapertusis* comparando Etest contra dilución en agar, hubo concordancia del cien por ciento entre ambos métodos (25).

EVALUACIÓN DE ANAEROBIOS

En anaerobios la tecnología del gradiente estable (Etest) resuelve las limitaciones técnicas de la microdilución en caldo, elución de disco en caldo y métodos de dilución en disco. El Etest es un procedimiento equivalente pero mucho más simple que la dilución en agar de referencia (11,26). Es aplicable para aislamientos en aquellas instancias en las cuales esta información es de vital importancia para seleccionar la

terapia más apropiada. Los resultados para organismos de crecimiento rápido, tales como el grupo de *B. fragilis* y *clostridium*, se obtienen después de 12 horas de crecimiento; en las cepas de crecimiento lento se obtienen buenos resultados después de 48 horas de incubación (11). Los antibióticos evaluados fueron cefoxitin, cefotaxime, imipenem, penicilina, metronidazol y clindamicina (11). Para anaerobios se usa una dilución de McFarland de 0.5 a 1 (9,11).

EVALUACIÓN DE HONGOS

A diferencia de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, las pruebas de antimicóticos son relativamente jóvenes. Además, son más difíciles de estandarizar porque numerosas variables *in vitro* afectan las complejas características de crecimiento del hongo y también la actividad de diferentes agentes antimicóticos *per se* (27). La *C. albicans* puede ser particularmente problemática. Las cepas pueden exhibir una alta frecuencia cambiante y manifestar una variedad de morfologías de colonia bajo diferentes condiciones. Especies de *Candida* son pleomórficas y diferentes variantes de colonias pueden tener diferentes susceptibilidades. Factores ambientales como la composición del medio, el potencial redox, amino-ácidos, niveles de zinc y glucosa, el pH, la temperatura e incubación, pueden afectar el crecimiento de levaduras y las propiedades de los agentes antimicóticos (27). Por lo tanto, los varios métodos para evaluar antimicóticos usados hoy como difusión en disco, dilución en agar y dilución en caldo, son significativamente influenciados por propiedades de drogas, inóculo del medio, incubación y criterio de punto final. A la fecha, no hay una técnica simple que haya alcanzado un nivel aceptable de reproductibilidad intra e inter laboratorio, para calificarla como una prueba de rutina creíble para discriminar resistencia/sensibilidad de los hongos (27).

Los resultados de la evaluación interlaboratorios del Etest para pruebas de susceptibilidad antimicótica de levaduras, así como también comparaciones previas de este método con los procedimientos de la NCCLS, demuestran que el Etest tiene potencial como un método de fácil aplicación, práctico y creíble para uso en el laboratorio clínico (28). Espinel y colaboradores evaluaron fluconazol, ketoconazol, itraconazol, 5 fluorocitosina y anfotericina B con levaduras patógenas. En términos generales hubo buena concordancia entre la CIM del Etest y los valores de macro y micro dilución. Sin embargo, la elección del medio necesita ser optimizada cuando se evalúan los diferentes agentes. Se encontró que el Etest consume menos tiempo y es mucho más simple que cuando se compara con macrodilución en caldo (28,29).

Otros estudios compararon los métodos estándar de la NCCLS con las técnicas de microdilución y el Etest para especies de *Candida* a anfotericina B y fluconazol demostrándose que ambos métodos son capaces de discriminar aislamientos susceptibles y resistentes y pueden ser usados de rutina (30,31).

EVALUACIÓN DE MICOBACTERIAS

Wanger y colaboradores describieron la prueba de susceptibilidad para *Mycobacterium tuberculosis* con el Etest, demostrando concordancia entre más o menos dos diluciones de Etest y dilución en agar de 100%, 82%, 72% y 86% para rifampicina, ciprofloxacina, ofloxacina y estreptomocina respectivamente. Hubo acuerdo del 96% comparado con Bactec (32). Con algunas modificaciones en el inóculo (McFarland de 3) se comparó con el método de evaluación en caldo del Bactec y se obtuvieron concordancias del 90%, 93%, 100% y 94% para etambutol, isoniazida, rifampicina y estreptomocina (13). Flynn demostró que el Etest puede ser utilizado para evaluar la susceptibilidad para aislamientos clínicos de *M. marinum* (33).

CONCLUSIONES

El principal distintivo de esta técnica es el gradiente de concentración estable de antibiótico, dando una concentración inhibitoria altamente reproducible.

Los resultados se afectan muy poco por variaciones de la densidad del inóculo, fase de crecimiento y tiempos de predifusión. La prueba es una herramienta de laboratorio simple y sofisticada para evaluar la eficacia clínica de antibióticos y para propósitos de investigación. Se ha demostrado su utilidad en una amplia gama de microorganismos que va desde organismos aislados de rutina, hasta de difícil crecimiento pasando por anaerobios, hongos y micobacterias. El Etest probablemente no representa un método económico para evaluar un gran número de drogas en cada aislado.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Baker CN, Stocker SA, Culver DH and Thornsberry C.** Comparison of the Etest to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 533-538.
2. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Approved Standard M2-A6: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Sixth ed NCCLS. 1997; National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
3. **Sanchez ML and Jones RN.** Applications of the E-test Technology: Drug Susceptibility Testing and Epidemiology. *SPARC* 1992; 1:1-3.
4. **Baheer CN, Stocker SA, Culver DH and Thornsberry C.** Comparison of the Etest to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria. *J. Clin Microbiol.* 1991; 29: 533-538.
5. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Approved Standard M11-A2: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. 2nd ed NCCLS. 1990; National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
6. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Approved Standard M7-A4: Standards Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Fourth Edition. 1997; National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
7. **Miller LA, Rittenhouse SF, Utrup LJ and Poupard JA.** Comparison of Three Methods for Determination of a Single MIC of an Antimicrobial Agent. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1373-1375.
8. **Sanchez ML and Jones RN.** Etest, an Antimicrobial Susceptibility Testing Method with Broad Clinical and Epidemiologic Application. *The Antimicrobial Newsletter* 1993; 8: 1-8
9. **Bolmström A, Arvidson S, Ericsson M, and Karlsson A.** A Novel Technique for Direct Quantification of Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms. *Abstracts of the 28th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother*, 1988; Abstr 1209.
10. **Bolmström A, Karlsson A, Mills K, Roche M and R & D Laboratories.** Determining the Bactericidal Activity of Antibiotics Using Etest. *Stockholm, 1993: Abstract ICC 302.*
11. **Citron DM, Ostavari MI, Karlsson A and Goldstein EJ.** Evaluation of the Etest for Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2197-2203.
12. **Huges JH, Biedenbach DJ, Erwin ME and Jones RN.** Etest as Susceptibility Test and Epidemiologic Tool for Evaluation of *Neisseria meningitidis* Isolates. *J. Clin. Microbiol* 1993; 31: 3255-3259.
13. **Wanger A and Mills K.** Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by Using Etest. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1772-1676.
14. **The Colombian Antimicrobial Resistance Study Group, Jones RN, Salazar JC, Pfaller MA and Doern GV.** Multicenter Evaluation of Antimicrobial Resistance to Six Broad-Spectrum B-Lactams in Colombia Using the E-test Method. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1997; 29: 1-8.

15. **Sader HS, Mimica I, Rossi F, Zoccoli C, Montelli AC, Sampaio JI et al.** Evaluation of the In Vitro Activity of Cefepime Compared to other Broad-Spectrum Cephalosporins Against Clinical Isolates from Eighteen Brazilian Hospitals by Using the Etest. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1997; 28: 87-92.
16. **Bignardi GE, Riley U and Easmon CSF.** Use of the Etest for Methicillin Sensitivity Testing. *J Antimicrobial Chemother.* 1993; 32: 37-43.
17. **Farrag N, Eltringham I and Liddy H.** Vancomycin - Dependent Enterococcus faecalis. *The Lancet.* 1996; 348: 1581-582.
18. **Cormican MG, Marshall SA and Jones RN.** Detection of Extended-Spectrum B-Lactamase (ESBL)-Producing Strains by the Etest ESBL Screen. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1880-1884.
19. **Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L and Jacoby GA.** Detection of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains producing extended-spectrum B-lactamases. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 691-696.
20. **Yeung K-H, Ng L-K and Dillon J-AR.** Evaluation of Etest for Testing Antimicrobial Susceptibilities of Neisseria gonorrhoeae Isolates with Different Growth Media. *J. Clin. Microbiol* 1993; 31: 3059-3055.
21. **Jorgensen JH, Howell AW and Maher LA.** Quantitative Antimicrobial Susceptibility Testing of Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae by Using the E-Test. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 109-114.
22. **Leggiadro RJ.** Drug-Resistant Streptococcus pneumoniae: A Growing Concern. *APUA Newsletter* 1994; 12: 1-3.
23. **Clark RB, Giger O and Mortensen JE.** Comparison of Susceptibility Test Methods to Detect Penicillin-Resistant Streptococcus pneumoniae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 17: 213-217.
24. **Jorgensen JH, Ferraro MJ, McElmeel ML, Spargo J, Swenson JM and Tenover FC.** Detection of Penicillin and Extended-Spectrum Cephalosporin Resistance among Streptococcus pneumoniae Clinical Isolates by Use of the Etest. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32: 159-163.
25. **Hoppe J and Tschirner T.** Comparison of Etest and Agar Dilution for Testing the Activity of Three Macrolides Against Bordetella parapertussis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1997; 28: 49-51
26. **Etest News.** Etest The Problem Solver for Anaerobes. 1996; 16.
27. **Etest News.** Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1994; 40:1-2.
28. **Espinel-Ingroff A, Bolmström A and Jones R.** Collaborative Evaluation of Etest for Antifungal Susceptibility Testing with Five Antifungal Agents Against Pathogenic Yeasts. *ASM* 1994; Poster F-112.
29. **Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Erwin ME and Jones RN.** Interlaboratory Evaluation of Etest Method for Testing Antifungal Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Five Antifungal Agents by Using Casitone Agar and Solidified RPMI 1640 Medium with 2% Glucosa. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 848-852.
30. **Law D, Moore CB and Denning DW.** Amphotericin B Resistance Testing of Candida spp.: a Comparison of Methods. *J. Antimicrob Chemother.* 1997; 40: 109-112.
31. **Van Eldere J, Joosten L, Verhaeghe A and Surmont I.** Fluconazole and Amphotericin B Antifungal Susceptibility Testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Microdilution Method Compared with Etest and Semiautomated Broth Microdilution Test. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 842-847.
32. **Wanger A, Mills K, and Boulet B.** Comparison of Etest and Agar Dilution for Susceptibility Testing of Mycobacterium. *ASM, Las Vegas.* 1994: poster C117.
33. **Flynn CM, Kelley CM, Barrett MS and Jones RN.** Application of the Etest to the Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium marinum Clinical Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2083-2086.