

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A
FLUCONAZOL EN *Candida* spp. COLONIZANTE EN PIE DE PACIENTES
DIABÉTICOS DE UN GRUPO DE PROMOCIÓN DE LA SALUD DEL MUNICIPIO
DE TURBACO- BOLÍVAR**

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN
MICROBIOLOGÍA**

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: MICOLOGÍA

RINA ISABEL MONTOYA OJEDA

PAOLA SUÁREZ ÁLVAREZ, M.SC

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
GRUPO DE MICOLOGÍA
CARTAGENA DE INDIAS D. T. H. Y C.
2014**

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	2
LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS.....	4
NOTA DE ACEPTACIÓN.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
RESUMEN.....	7
I. Introducción	9
II. MARCO TEÓRICO	12
2. Relevancia epidemiológica y clínica de <i>Candida</i> spp.....	12
3. Formas clínicas de la candidiasis.....	13
3.1. Candidiasis de la mucosa oral:.....	13
3.2.1. Vaginitis candidiasica:	14
3.2.2. Balanitis candidiasica:	14
3.3.1. Candidiasis intertriginosa:	14
3.3.2. Onicomicosis por <i>Candida</i> spp.:.....	15
3.4. Candidiasis mucocutánea crónica:	15
3.5. Candidemia:	15
4. Proceso de Interacción entre hospedero y <i>Candida</i> spp.....	15
4.1. Colonización por <i>Candida</i> spp.....	16
4.2. Factores de virulencia	16
4.2.1. Dimorfismo	17
4.2.2. Cambio fenotípico:	17
4.2.3. Proteínas extracelulares.....	18
4.2.4. Aspartil proteasas (Sap):.....	18
4.2.5. Fosfolipasas	18
4.2.6. Lipasas.....	19
4.2.7. Formación de biopelículas:	19
4.2.8. La adquisición de hierro	19
4.2.9. Factores de virulencia descritos en cada una de las <i>Candida</i> spp	20
4.2.9.1. <i>Candida albicans</i>	20

4.2.9.2. <i>Candida parapsilosis</i>	20
4.2.9.3. <i>Candida tropicalis</i>	21
5. Diabetes mellitus.....	23
5.2. Complicaciones de la diabetes mellitus.....	24
IV. Materiales y Métodos	37
1. Población.....	37
2. Población de estudio	37
3. Muestra y Muestreo	38
3.1. Muestra.....	38
3.2. Muestreo.....	38
5. Información del paciente.....	38
7. Toma de muestras	39
9. Aislamiento e identificación de <i>candida</i> spp. por CHROMagar™ <i>Candida</i> :.....	40
10. PRUEBA de tubo germinal en suero y Clamidosporas	41
11. EXTRACCIÓN de ADN fúngico.....	41
13. Susceptibilidad antifúngica.....	44
V. Resultados.....	48
1. Características demográficas	48
2. Epidemiología	49
3. Colonización por <i>Candida</i> spp.....	50
4.1. Identificación por CHROMagar™ <i>Candida</i>	52
4.2. Prueba de tubo germinal en suero.....	52
4.3. Identificación por PCR Multiplex.....	54
5. Pruebas de susceptibilidad.....	55
6. Análisis de otras variables	57
7. Análisis estadístico	57
VII. Conclusiones.....	64
VIII. ANEXOS.....	65
ANEXO A.....	66
REFERENCIAS	67

LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Primers y secuencias que se utilizaron para la amplificación de fragmentos de ADN	41
Tabla 2. Tabla de referencia de ATCC de <i>Candida</i> spp	39
Tabla 3. Esquema de dilución de fluconazol	40
Tabla 4. Datos OR crudo y ajustados	45
Tabla 5. Frecuencia de pacientes colonizados	47

FIGURAS

Figura 1. Estructura del fluconazol	27
Figura 2. Mecanismo de resistencia	29
Figura 3. Colonias observadas en CHROMagar™Candida	36
Figura 4. Preparación del inóculo	41
Figura 5. Aislados en CRHOMagar™Candida	50
Figura 6. Amplificación por PCR multiplex	51
Figura 7. Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio	51

GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentajes de género	42
Gráfica 2. Distribución porcentual en diabéticos y no diabéticos colonizados	44
Gráfica 3. Distribución porcentual en diabéticos y no diabéticos, con su variación de especies	45
Gráfica 4. Comparación de los niveles de hemoglobina glicosilada de pacientes con aislamiento y sin aislamiento	48
Gráfica 5. Presencia de tubos germinales en colonias verdes	50
Gráfica 6. Concentración de susceptibilidad a fluconazol	52

NOTA DE ACEPTACIÓN

**Nombre y firma del
Presidente del jurado**

Nombre y firma del jurado

Nombre y firma del jurado

**Nombre y firma del jefe de
la unidad académica**

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por permitirme concluir una etapa más en mi desarrollo profesional, siempre teniendo la fe puesta en ti, señor.

A **Nancy Ojeda**, por su amor, comprensión, por su apoyo incondicional y por todas las cosas que me has enseñado. Madrecita, te quiero mucho.

A **karol y Nicolas Guerra**, por su amor, por todo el cariño, por creer siempre en mí y por su comprensión. Los amo hasta el infinito.

A **Vivi y Vane**, mis hermanas, por apoyarme, por su comprensión, por su ayuda.

A mis **compañeros** de la maestría, por su comprensión y enseñanzas que me brindaron a nivel profesional.

A **todas las personas que me rodean**, que de alguna u otra forma, han hecho parte de esta culminación.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A FLUCONAZOL EN *Candida* spp. COLONIZANTE EN PIE DE PACIENTES DIABÉTICOS DE UN GRUPO DE PROMOCIÓN DE LA SALUD DEL MUNICIPIO DE TURBACO- BOLÍVAR.

Montoya Ojeda Rina Isabel
Suárez Álvarez Paola Inés
Maestría en Microbiología - Facultad de Medicina-Universidad de Cartagena

RESUMEN

Introducción: La colonización por *Candida* spp. es un paso importante en el proceso de patogénesis, que pueden llevar a una candidiasis y/o candidemia, que incluye varios pasos, además de estar influenciados por el sistema inmune y la interacción entre hongos y/o bacterias. Dentro de los factores de riesgos que se han descrito está la diabetes mellitus, la diabetes no controlada favorece un grupo de infecciones, que puede traer diversas complicaciones para el paciente que afectan diferentes órganos, así como infecciones con una respuesta muy lenta a la terapéutica. El fluconazol es uno de los antifúngicos más utilizados para las infecciones por *Candida*, un aspecto fundamental es la creciente resistencia a antifúngicos, además del hecho que *Candida glabrata* y *Candida krusei* presentan resistencia intrínseca a los azoles, lo cual complica aún más el panorama de estas infecciones en el paciente diabético, por lo que se hace importante identificar y evaluar la susceptibilidad a fluconazol en este grupo de pacientes.

Objetivo: Identificar molecularmente y evaluar la susceptibilidad a fluconazol de *Candida* spp. colonizante de pie en pacientes diabéticos que asisten a un programa de promoción de la salud.

Métodos: Estudio descriptivo, transversal, de 2012 a 2013. Que incluyó la identificación y evaluación de la susceptibilidad a fluconazol en *Candida* spp. colonizantes de pie en pacientes diabéticos, además de las características epidemiológicas.

Resultados: Se analizaron 172 pacientes, en los que se identificó 7 *C. albicans* (7,5%) y 86 *C. no albicans* (92,4%). Donde *C. parapsilosis* fue el microorganismo más frecuente, colonizando tanto a pacientes diabéticos (65,6%) como no diabéticos (34,3%). Respecto a la susceptibilidad a fluconazol, de los 93 aislamientos, el 90% fue susceptible y se encontró sensibilidad dependiente de la dosis (SDD) en un 10%.

Conclusiones: Las especies de *C. no albicans* predomina como colonizantes, especialmente *C. parapsilosis*, esta identificación contribuye a conocer las especies de *Candida* que colonizan este grupo de pacientes. No se halló cepas resistentes a fluconazol, por lo que se hace importante realizar en forma constante estudios.

Palabras claves: *Candida*, diabetes mellitus, fluconazol, susceptibilidad antifúngica.

I.INTRODUCCIÓN

El género *Candida* es un hongo que se encuentra distribuido en la naturaleza, algunas especies pueden generar infecciones en los seres humanos [1, 2]. Las especies de *Candida* son microorganismos comensales que conforman la microbiota de la piel, la mucosa oral, el tubo digestivo y los genitales [3-7]. Una de las especies más significativas es *Candida albicans*, ya que es frecuentemente aislada en individuos colonizados, seguida por *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida inconspicua*, *Candida lipolytica* y *Candida novergensis*, las cuales se identifican comúnmente como *Candida no albicans* (CNA) [2, 6, 8, 9]. Además de las anteriores, se han reportado algunas emergentes, ubicadas dentro del complejo de *C. parapsilosis*, las subespecies de *C. parapsilosis-sensustricto*, *C. orthosilopsis* y *C. methasilopsis* descritas recientemente [10, 11].

En Colombia se han realizado algunos estudios de colonización y las especies que más predomina son *C. albicans*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*, con una frecuencia de un 48% [12]. Aunque se han hecho pocos estudios en nuestro país, se reporta un porcentaje a *C. no albicans* de un 56,4% [13]. Así mismo, las especies que más predominan van a depender del sitio anatómico, la ubicación geográfica y edad [13].

Candida spp. es la cuarta causa principal de causar infecciones en los Estados Unidos, cuyas cifras oscilan entre un 8 y 15%, asociadas a una alta morbilidad y mortalidad [6, 10, 14]. Durante los últimos años, en Europa, Asia y Sur América; se ha presentado un incremento por *C. parapsilosis* y *C. albicans* [10]. En Estados Unidos, se ha reportado que *C. albicans* representa el principal agente etiológico, con valores que van del 38,8% al 79,4% y las otras especies de *Candida no albicans* como *C. glabrata* en un 20-25%, *C. tropicalis* en un 10% y *C. parapsilosis* en un 15-20% [15].

Los factores de riesgo más significativos para la aparición de candidiasis involucran los tratamientos prolongados con antibióticos, esteroides, fármacos inmunodepresores, diabetes, leucemia, linfomas, pacientes con nutrición parenteral, neutropénicos, SIDA, desnutrición y edad avanzada [2, 16, 17].

La infección por *Candida* spp. depende en gran medida de una alteración en el equilibrio de la microbiota y de factores de riesgo, condiciones que conllevan a *Candida* spp. a pasar de comensal a patógeno oportunista, causando infecciones superficiales y sistémicas como candidiasis cutáneas, orofaríngeas, vulvovaginal, mucocutánea crónica, sistémica y diseminada [2, 18-23]. Los pacientes diabéticos están predispuestos a infecciones por *Candida* spp. debido al aumento de los niveles de glucosa, además que su sistema inmune se ve afectado [17, 24-30].

La diabetes no controlada presenta mayor complicación con una respuesta de hiperglicemia, este aumento significativo de la glucosa crea un ambiente hiperglucémico que afecta la función de los leucocitos como la disminución de la quimiotaxis, la fagocitosis, la adhesión, la actividad bactericida, la explosión oxidativa de los polimorfonucleares (PMN) que se inhiben por las altas concentraciones de glucosa, por esta razón hay una disminución de lisis del patógeno intracelular que se produce en ambientes hiperglucémico, aumentando la virulencia de varios patógenos, especialmente de *Candida albicans* que inhibe el complemento mediado por la fagocitosis y causa la infección [24, 31, 32], de ahí la importancia de conocer la relación que existe entre diabetes y *Candida* spp.

Las infecciones en este tipo de pacientes son polimicrobianas, sin embargo; se han demostrado un importante aumento de *Candida* spp. [33], la colonización de la piel y los pies de los pacientes diabéticos por *Candida* spp. causa un aumento en el riesgo de candidiasis interdigital [34].

Por lo anterior, es importante conocer que especies de *Candida* coloniza los espacios interdigitales de los pies en pacientes diabéticos, debido a que la adhesión es el primer paso en la colonización para desarrollar candidiasis [17].

Las nuevas opciones terapéuticas han cambiado el tratamiento de candidiasis, gracias al adelanto de nuevos antifúngicos, más eficaces y de menor toxicidad frente al uso del fluconazol a nivel mundial [35, 36]. Sin embargo; la aparición de cepas resistentes no se ha hecho esperar, se ha reportado resistencia intrínseca y adquirida en *Candida. krusei* y *Candida glabrata* a fluconazol [37-40].

En la actualidad los agentes antifúngicos más utilizados para la candidiasis son los que se dirigen a la membrana como los polienos, derivados de azoles, alilaminas; en el caso de la anfotericina B, su uso ha disminuido, debido a la toxicidad aguda y crónica que produce a nivel de la función renal; sin embargo, se utiliza en un número reducido de pacientes, mostrando resistencia para *Candida lusitanae* [41]. Se ha reportado resistencia a los azoles, debido al uso frecuente de la terapia preventiva o empírica antifúngica en pacientes con factor de riesgo o alteración del sistema inmune [40]. La resistencia antifúngica a nivel mundial aún no presenta aumento, universalmente la resistencia a fluconazol se encuentra entre 3-13% [42].

Teniendo en cuenta lo anterior, se hace necesario conocer el comportamiento de *Candida* spp. en pacientes diabéticos, lo cual puede permitir el establecimiento de medidas de control e implementar estrategias en el manejo y prevención de la candidiasis, además de conocer la susceptibilidad en estas especies. El presente trabajo se direccionó hacia la identificación y evaluación de la susceptibilidad a fluconazol de *Candida* spp. colonizantes en pie de pacientes diabéticos pertenecientes de un grupo de la salud en Turbaco-Bolívar.

II. MARCO TEÓRICO

1. *Candida* spp.

El género *Candida*, es un hongo que pertenece a la clase *ascomycetes*, de la familia *sacharomycetales*, *Candida* spp. es un microorganismo eucariote, aerobio, el cual puede estar en forma de hifas, pseudohifas o tubos germinales y en algunas situaciones se presenta en estado teleomórficos [43]. *C. albicans* es considerada la más virulenta e importante en este grupo, la cual se caracteriza por ser polimórfica, es decir; puede crecer como levaduras en gemación y/o blastoconidias, pseudohifas o hifas, puede formar clamidosporas, presentar cambios fenotípicos, mecanismo importante en la forma de apareamiento y la formación de biopelículas [44], su característica más importante es el dimorfismo, capacidad de pasar de levadura a hifas [20]. Otras especies como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* puede también ser responsables de procesos infecciosos [2, 43].

Candida spp. se encuentra en el medio ambiente y puede estar colonizando la piel, la mucosa oral, el tracto intestinal y genital de personas sanas, aunque en ciertas condiciones puede causar infecciones [1, 2]. A nivel de la mucosa oral, vaginal y/o sistémica, se origina una diversidad de entidades clínicas dentro de las cuales están la candidiasis cutánea, infecciones en la mucosa oral, vulvovaginal, balanoprepucial, paroniquia, onicomicosis, mucocutánea crónica y en pacientes hospitalizados candidemia, causando altas tasa de morbilidad y mortalidad [2, 45].

2. Relevancia epidemiológica y clínica de *Candida* spp.

En las últimas décadas se ha presentado un aumento en los casos de candidiasis [46]. Siendo esta una entidad cosmopolita y oportunista, la colonización por *Candida* spp. se presenta después del nacimiento con gran afinidad por las mucosas [1, 10]. *C. albicans* y *C. glabrata* se encuentra colonizando el tracto

intestinal y vaginal [2, 47]. En mujeres sanas se han manifestado infección vaginal por *Candida* spp. y un 5% se ha observado infecciones recurrentes [5]. *C. parapsilosis* coloniza la piel y presenta gran capacidad de formar biopelículas, se adquiere por dispositivos médicos como catéteres, prótesis y/o por las manos de los trabajadores de la salud [10, 48]. *Candida* spp. se ha reportado en pacientes hospitalizados con una alta mortalidad en un 80%, siendo *C. albicans* la más prevalente, sin embargo; algunas *Candida* spp. han presentado resistencia al fluconazol [38, 46, 49]. Debido a que *Candida* hace parte de la flora comensal, este puede ser una causa importante para desarrollar infecciones superficiales, sistémicas e invasivas cuando hay factores que ayudan a su propagación [38].

3. Formas clínicas de la candidiasis

3.1. Candidiasis de la mucosa oral: Se manifiesta de dos formas aguda y crónica. En la forma aguda, la entidad más importante es la seudomembranosa se caracteriza por la presencia de placas cremosas y blanquecinas, que al ser despegadas quedan úlceras. En la seudomembranosa se encuentran células epiteliales descamadas, fibrina, tejido necrótico, células inflamatorias. Otra forma clínica es la glositis aparece en la porción media o posterior del dorso lingual, afectando a diabéticos y fumadores [2]. La estomatitis se presenta en individuos con prótesis dentales, las cuales puede cursar con enrojecimiento, ardor y dolor [2, 43, 50].

En la candidiasis atrófica las lesiones son rojizas, sin placas blanquesinas, se observa en el paladar, aunque siendo asintomática puede provocar picor. Aparece en pacientes con tratamiento de antibióticos prolongados, xerostomía y Sida [43, 50]. En la forma crónica se encuentra la queilitis angular, observándose fisuras de color blanco en las esquinas de la boca y leucoplasia [2]. Las lesiones son

manchas blanquecinas localizadas con bordes irregulares, no se desprenden, se manifiesta en la mucosa oral especialmente, en la comisura labial y lengua [2, 50].

3.2. Candidiasis genital

3.2.1. Vaginitis candidiasica: Es importante resaltar que *Candida* spp. hace parte de la flora comensal de la vagina en un 20-50% [7], sin embargo; cuando se presenta una alteración en equilibrio de esta microbiota, debido a una carga hormonal o inmunosupresión aparece la candidiasis vulvovaginal aguda (CVV) [7]. En mujeres sanas puede observarse dos o más episodios durante su vida, también suele manifestarse infecciones recurrentes de un 5-8% con cuatro o más episodios en el año [5, 10]. Su sintomatología es leucorrea, ardor en la vulva, picor, inflamación, prurito [2]. Se presenta especialmente en mujeres embarazadas entre un 20-60%, en mujeres con dispositivo intrauterino y/o que ingieren anticonceptivos orales, se asocia con diabetes mellitus, obesidad y/o corticoterapia [2, 43].

3.2.2. Balanitis candidiasica: Se manifiesta con pápulas, pústulas, dolor y secreciones en glande y prepucio. Los factores para desarrollar este cuadro son falta de aseo en el área genital, la diabetes mellitus y/o la inmunosupresión, se da a consecuencia de parejas con diagnósticos de vaginitis candidiasica y/o en el post operatorio de individuos circuncidados [2].

3.3. Candidiasis cutánea

3.3.1. Candidiasis intertriginosa: Para que esta entidad se desarrolle deben existir unos factores predisponentes como es la humedad, la maceración, el calor y obesidad [2]. La zona afectada son las axilas, ingle, debajo de los senos, los intertrigos de dedos de las manos y/o pies, se manifiesta con secreciones, ardor, erupción y/o dolor [2, 47].

3.3.2. Onicomycosis por *Candida* spp.: Es una infección que se presenta en las uñas, los factores que se encuentran asociados son diabetes mellitus, traumatismo y/o el exceso de humedad. Se presenta especialmente en las uñas de las manos [2, 10, 34, 47, 48]. Otra forma clínica es la onicólisis, se caracteriza porque hay desprendimiento de la uña con un color que inicia amarillo hasta llegar al verde, observándose en escaso porcentaje [2, 47]. Paroniquia se presenta con mayor frecuencia que la onicólisis, inicia en el pliegue proximal cursando con edema, irritación, dolor a la palpación [2, 47].

3.4. Candidiasis mucocutánea crónica: Es poco común, se manifiesta en niños especialmente en cara, piel, cuero cabelludo y manos. Cursando con engrosamiento de la piel, tejidos subcutáneos y dolor [2]. Se produce daño en el estado inmunológico con deficiencia en migración y actividad polimorfonucleares, escasas inmunidad celular y gammaglobulinemias [2, 43, 47].

3.5. Candidemia: En la actualidad se está presentando un incremento con altas tasas de mortalidad en un 38%, especialmente en aquellos pacientes que se encuentran en unidad de cuidados intensivos (UCI) [6, 10, 51]. Este tipo de infecciones aumenta el riesgo de fallecer, la duración en el hospital y el gasto asistencial [46]. Se puede manifestar con fiebre y/o escalofríos confundiendo con una infección bacteriana [10, 43].

4. Proceso de Interacción entre hospedero y *Candida* spp.

La candidiasis es una enfermedad oportunista, que ha aumentado en las últimas décadas, en individuos que presentan factores de riesgos tales como; diabetes mellitus, VIH (+), cáncer, entre otros [52]. Así mismo va a depender de varios factores, como la alteración en las células del hospedero, el sistema inmune del

paciente, de los factores de virulencia y de las condiciones para que se lleve a cabo la interacción hospedero-parásito [53].

4.1. Colonización por *Candida* spp.

Candida spp. es un microorganismo comensal que se encuentra colonizando en escasas cantidades la mucosa oral, el tracto gastrointestinal y/o genital [2]. La colonización de las especies de *Candida* implica mantener la población estable de levaduras, estas son permanentemente retiradas del hospedero, para sobrevivir y permanecer colonizando, debe crear estrategias que le permitan adherirse y replicarse [54]. En el epitelio, la mucosa posee un sistema complejo que difiere la forma colonizante que son las levaduras, de la forma invasiva que son las hifas [55]. Concomitante, *Candida* spp. puede colonizar, pero no invade, al presentarse un daño en la mucosa o en los pacientes inmunocomprometidos, puede causar una enfermedad invasiva propagándose a través del torrente sanguíneo a los órganos distales [20]. En individuos sanos la respuesta inflamatoria por *Candida* spp. es limitada por una carga fúngica baja, que se mantiene bajo control por la flora bacteriana en competencia y la morfología del hongo que tiene una exposición limitada superficie de PAMP, como β 1,3 D glucano que se encuentra en forma de levadura [55].

4.2. Factores de virulencia

Para que *Candida* spp. cause la infección, debe estar asociado a un factor de riesgo y a la capacidad de expresar sus genes [43]. Para favorecer la patogenicidad se requiere de unos factores de virulencia, los cuales le permiten colonizar, infectar, evadir el sistema inmune y causar la infección en el hospedero [44, 56]. Dentro de los cuales se encuentran las proteínas, importantes para la adhesión e invasión en las células epiteliales, estas proteínas se encuentran en la capa externa de la pared celular, predominando los tipos mananos [55]. También

se encuentra una capa interna compuesta por quitina, β -1,3 glucano y β -1,6 glucano, componentes importantes de la pared celular, trascendental para que *Candida* spp. emplee unas estrategias claves para evadir el sistema inmune [3, 55].

Dentro de los factores de virulencia se encuentra la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como aspartil proteinasas (SAP), fosfolipasas, lipasas, adhesinas, formación de biopelículas, el cambio fenotípico, el dimorfismo y/o la captación de hierro [5, 55-58].

4.2.1. Dimorfismo: La conversión de levadura a hifa es lo que se llama dimorfismo, esta transición dada por diferentes inducciones es el factor de virulencia más importante de *C. albicans* [1, 20, 44, 55]. Para que este dimorfismo se presente, deben realizarse una diversidad de condiciones ambientales tales, como la temperatura a 37°C, el pH debe estar igual o mayor a 7.0, la concentración de CO₂ en un 5.5%, la presencia de glucosa y/o fuentes de carbono en suero que provoquen el desarrollo de hifas [44, 59]. Este dimorfismo se ha asociado a cambios en los hidratos de carbono y proteínas que se encuentran en la pared celular [3, 55].

4.2.2. Cambio fenotípico: Para causar la invasión *C. albicans* requiere de estrategias para infectar tejidos, dentro de los cuales se encuentran, cambiar la morfología, la superficie celular, la apariencia de la colonia, propiedades bioquímicas y metabólicas, por lo que es un factor de virulencia importante durante la invasión y/o establecimiento de la infección [20]. Las colonias tienen la capacidad de cambiar su forma y apariencia como lisa, rugosa o punteadas [44]. El cambio más conocido es blanco-opaco, las colonias de color opaco producen aspartil proteinasas 1 y 3, las cuales se consideran las menos virulentas y las

colonias de color blanco son las más virulentas secretando aspartil proteinasa 2 [44, 48].

4.2.3. Proteínas extracelulares: Es una propiedad bioquímica muy importante durante el proceso de infección, debido a que facilita la adhesión e invasión a los tejidos [5].

4.2.4. Aspartil proteasas (Sap): Las proteasas están asociadas a una familia de 10 isoenzimas aspártico proteinasa (Sap), codificada por los genes Sap del 1 al 10, siendo un factor importante de patogenicidad especialmente para *Candida albicans* [5, 56]. Estas Sap tienen la capacidad de colonizar e invadir los tejidos en el hospedero [10, 60]. En las especies de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y/o *C. krusei* presentan actividad Sap 5 y 9, las cuales tienen la capacidad de invadir y diseminarse durante la infección [8]. La producción de Sap varía entre *Candida* spp., por lo cual aún sigue en estudios en algunas especies [10]. Un factor importante que ayuda a la patogénesis y a desarrollar candidiasis en diferentes partes del cuerpo del individuo es el pH, el cual debe estar entre 2.0 y 7.0 [44].

4.2.5. Fosfolipasas: Son enzimas capaces de hidrolizar uno o más enlaces éster en glicerofosfolípidos, alterando la membrana en el hospedero [10]. Diversos estudios han demostrado la actividad de esta enzima en *C. albicans*, pero para algunas *Candida* spp. aún no está claro el papel de la actividad de esta enzima [10, 44]. Se ha descubierto que secretan cuatro clases de enzimas la A, B, C y D, siendo la más importante B, debido a que presenta actividad lisofosfolipasa- transacilasa e hidrolasa [44].

4.2.6. Lipasas: Son enzimas que tienen un papel importante en la adquisición de nutrientes, adhesión en células y/o tejidos e iniciación de procesos inflamatorios, en *C. albicans* se ha encontrado 10 genes de lipasas y para *C. parapsilosis* 2 [10, 48].

4.2.7. Formación de biopelículas: Las biopelículas son comunidades asociadas a la superficie de microorganismo dentro de una matriz extracelular, esta matriz está compuesta por polisacáridos que contiene manosa y glucosa [10, 48]. La patogenicidad de *C. albicans* para formar las biopelículas, depende en gran medida de la capacidad de expresar sus genes, los cuales les permiten adherirse a los tejidos o dispositivos médicos tales como catéteres venosos, periféricos, hemodiálisis y/o catéteres de diálisis peritoneal [6, 10]. También le permite participar en la síntesis de hidratos de carbono y en la resistencia antifúngica restringiendo la entrada del fármaco a través de la matriz [55]. La capacidad de formar biopelículas en *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* en los dispositivos médicos se ha asociado con una alta mortalidad en individuos que se encuentran hospitalizados [8, 10, 44, 61].

4.2.8. La adquisición de hierro: La adquisición de hierro es un factor de virulencia muy importante durante la infección. El hierro se encuentra unido a proteínas tales, como hemoglobina, lactoferrina, transferrina y/o ferritina sirviendo como fuente de hierro para *Candida* spp. las cuales son utilizadas a través de la unión directa, la degradación y/o captación del hierro [20]. *C. albicans* para adquirir el hierro necesita la expresión de genes, de los cuales se han descrito tres formas, la primera es la utilización de los receptores Rbt5 y Hmx1 para obtener el hierro de la hemoglobina, la segunda es a través de los siderofóros y por último obtener el hierro libre que se encuentra en el medio [44, 62].

4.2.9. Factores de virulencia descritos en cada una de las *Candida* spp.

4.2.9.1. ***Candida albicans***: Ha desarrollado un amplio repertorio de mecanismos de virulencia que permite la colonización y la infección del hospedero con éxito. La actividad proteolítica extracelular juega un papel importante en la patogenicidad de *C. albicans* y es producido por una familia de 10 aspartil proteinasas (proteínas SAP), SAP2 se sabe que degradan muchas proteínas incluyendo moléculas que protegen las superficies mucosas tales como mucina y la inmunoglobulina A secretora (IgA) [5]. Esto no sólo podría proporcionar nitrógeno esencial para el crecimiento, sino que también podría mejorar la unión, la colonización y la penetración del tejido hospedero mediante la eliminación de barreras. Otros factores de virulencia es la formación de hifas, adhesión, el cambio fenotípico y el dimorfismo este último es la transición de comensal a patógeno [63].

4.2.9.2. ***Candida parapsilosis***: Se sabe poco acerca de los factores de virulencia de esta especie, dentro de los cuales se han descrito, la adhesión importante para unirse a células, tejidos y dispositivos médicos, que facilita la formación de biopelículas causando daños al hospedero. La Formación de la biopelícula es precedida por la adhesión a los tejidos o dispositivos médicos, presumiblemente resultantes en un cambio en la morfología del organismo y comportamiento [44]. Las biopelículas en *C. parapsilosis* pueden ocurrir en diversos dispositivos médicos, incluyendo los catéteres venosos centrales y/o periféricos, hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, prótesis intracardíacas y prótesis articulares. Como un comensal de la piel

humana, el organismo puede entrar en contacto con los dispositivos médicos, sobre todo en ambientes hospitalario, donde se producen fallas en la higiene adecuada de las manos. Y otro factor es la secreción de las enzimas aspartil proteinasas (Sap) facilitan la invasión y colonización del tejido en el hospedero mediante la interrupción de las membranas mucosas y degradante inmunológica importante y proteínas de defensa estructurales, como la inmunoglobulina G (IgG) cadenas pesadas, en comparación con *C. albicans*, *C. parapsilosis* tiene menos actividad Sap [10].

4.2.9.3. *Candida tropicalis*: Uno de los factores detallados son las proteasas importante para colonizar e invadir tejidos, presentado actividad solo la Sap 5 y 9. La formación de biopelículas asociada a dispositivos médicos es otro factor de virulencia que le permite adherirse y así causar la infección [44]

4.3. Factores predisponentes para desarrollar una infección por *Candida* spp.

La colonización por *Candida* spp. es un proceso dinámico en el cual se da en varios pasos, la unión a la célula, entrada, crecimiento, la persistencia, todo esto influenciado por el sistema inmune del individuo [64]. Para causar infecciones, *Candida* spp. debe colonizar y ocasionar una lesión superficial, luego producir alteraciones profundas y por último complicaciones sistémicas [20]. Para pasar de comensal a patógeno oportunista, *Candida* spp. necesita en determinadas circunstancias, que existan unos factores de riesgos [65].

Dentro de los factores endógenos, se encuentran la colonización previa por *Candida* spp., la diabetes mellitus, la desnutrición, la alteración en el sistema

inmune como la infección por VIH/SIDA, la edad y/o unos factores exógenos como la presencia de catéteres venosos centrales, la nutrición parenteral, el uso de antibióticos de amplio espectro debido a que alteran la flora bacteriana, favoreciendo el desarrollo de levaduras a nivel del tracto intestinal, además del uso de corticoesteroides, cirugía abdominal, procesos invasivos y/o el ingreso a la UCI [2, 20, 42, 46, 65-67]. Por todo lo anterior, la colonización por *Candida* spp. es un requisito previo para desarrollar candidiasis y cualquiera de estos factores facilita el desarrollo de infecciones, que van desde la forma superficial hasta la diseminación e invasión de órganos [55, 64].

4.4. Proceso de patogénesis

El primer paso de *Candida* spp. para la colonización, es adherirse a las células epiteliales, para posteriormente causar infección [17], papel importante que juega los receptores en el hospedero, los cuales interactúan con la células epiteliales, siendo importante para que *Candida* spp. exprese sus factores de virulencia [68]. *Candida* spp. puede crecer como levaduras, pseudohifas e hifas, las levaduras se encuentran sobre la superficie de las células epiteliales y las hifas permanecen en el sitio primario de la infección, en las capas epiteliales y tejidos [55]. La presencia de tubos germinales indica el crecimiento de hifas, siendo atribuido en la patogénesis de las candidiasis [17]. En la pared celular, se encuentran unas manoproteínas conocidas como adhesinas que interactúan con la superficie celular, las ALS que son importantes en la adhesión, además del dimorfismo que contribuye a la patogenicidad de *Candida* spp. al permitir a la levadura, sobrevivir en ambientes adversos y alterar su antigenicidad superficial, evadiendo los mecanismo del sistema inmune y eludir el tratamiento antifúngico [68].

5. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que aparece, cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza adecuadamente la insulina que produce [69]. En las últimas décadas a nivel mundial, se presenta una alta morbilidad. La diabetes mellitus se clasifica en varios tipos, la diabetes tipo 1 o insulino dependiente, se produce de forma deficiente la insulina, presentándose lesiones en la células β pancreáticas por causa desconocida o por daño en el sistema inmune, iniciando en la infancia [28]. La diabetes tipo 2 o no insulino dependiente, se presenta porque la insulina es utilizada de forma inadecuada y la diabetes gestacional, es cuando se desarrolla intolerancia a la glucosa y/o es manifestada durante el embarazo [28].

La diabetes tipo 2 presenta una fase asintomática entre el inicio del aumento de la glucosa y su diagnóstico, por lo cual dura entre 4 hasta 7 años, por lo que un 30-50% de estos pacientes permanecen sin diagnosticar [70]. Los síntomas de diabetes son excesiva sed, llamada polidipsia, deseos de orinar constantemente (poliuria) y hambre (polifagia). Además de pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio [68].

5.1. Diagnóstico y control de la diabetes mellitus

El diagnóstico se realiza en sangre, realizando una glicemia en ayunas considerando que para definir un paciente diabético, se deben encontrar los valores de glicemia en 126 mg/dL o más alta, una glucosa después de dos horas, con una carga de 75g de glucosa, cuando se registra un valor en 200 mg/dL o mayor y/o cuando se realiza una glucosa ocasional arrojando un valor mayor de 200 mg/dL [28]. En la diabetes gestacional se considera que se presenta, después de una carga de 75g de glucosa, en una glicemias en ayunas 100 mg/dL; 1 hora post- carga de 180 mg/dL y a las dos horas 150 mg/dL. Las mujeres que refieran diabetes antes del embarazo, deben estar supervisada [28]. Otra prueba que se

realiza, es la hemoglobina glicosilada (HbA1c) esta prueba permite medir el nivel de promedio en los últimos tres meses, mayor que 6,5% sugiere diabetes [28].

5.2. Complicaciones de la diabetes mellitus

Con el transcurrir del tiempo, la diabetes trae consecuencias a largo plazo, dentro de las cuales se encuentran las complicaciones microvasculares y macrovasculares [33]. En los pacientes diabéticos, la hipertensión y anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas suelen desarrollarse [69]. Dentro de las complicaciones microvasculares se describen; la retinopatía es una de las complicaciones más comunes, el riesgo de desarrollar depende de la duración y los altos niveles de glucosa, con la presencia de hipertensión arterial, reportándose 10.000 nuevos casos de ceguera cada año en Estados Unidos [71]. Se puede presentar de dos formas: una como pequeñas hemorragias en las capas medias de la retina y la otra es la formación de nuevos vasos sanguíneos en la retina, lo cual conduce a hemorragia vítrea [71]. La nefropatía es la principal causa de insuficiencia renal, presentándose pérdida de proteína > a 500 mg en 24 horas, esta se presenta en diabetes tipo 1 y 2 [71]. La neuropatía diabética se define como la presencia de signos y síntomas de disfunción del nervio periférico, se puede manifestar en neuropatías sensoriales y/o multifocales, más del 80% se producen después de una ulceración del pie [71]. Los síntomas son ardor, hormigueo, dolor, pérdida de la sensibilidad [33].

En las complicaciones macrovasculares se encuentra la aterosclerosis, produciendo una estrechez en las paredes arteriales en todo el cuerpo [71]. La aterosclerosis es consecuencia de una inflamación crónica y de una lesión en la pared arterial, en el sistema vascular periférico y la ruptura de esta, conlleva a un infarto agudo vascular. Además de formar ateromas, adhesión plaquetaria, especialmente en pacientes con diabetes tipo 2 [71]. La diabetes aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, siendo la primera causa de muerte, tanto en la diabetes tipo 1 y 2. Además del riesgo de desarrollar infarto de

miocardio (IM), accidente cerebro vascular (ACV), enfermedad cerebro vascular (ECV) [71].

El síndrome metabólico se presenta más que todo en la diabetes tipo 2, se caracteriza por obesidad, hipertensión arterial, hiperlipidemia y aumento de los coágulos, también pueden causar ECV, actuando como factor de riesgo para desarrollar la enfermedad isquémica, accidente cerebrovascular y muerte [72].

5.3. Infección y diabetes mellitus

En el paciente diabético, el mal control de la glucosa conlleva a una respuesta de hiperglicemia [31], estos ambientes hiperglicémicos, disminuyen la movilización de leucocitos polimorfonucleares (PMN), quimiotaxis, actividad fagocítica, además de bloquear la función antimicrobiana, mediante la inhibición de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), aumentando la apoptosis de los leucocitos (PMN) y reduciendo la transmigración de leucocitos (PMN) a través del endotelio [31, 73]. La diabetes no controlada, predispone que el paciente diabético desarrolle infecciones de varios tipos como son las respiratorias, tuberculosis, urinarias, gastrointestinales, hepáticas, pie, tejidos blandos, cabeza, cuello [73].

5.4. Relación entre *Candida* spp. y diabetes mellitus

Uno de los factores de riesgos para desarrollar candidiasis es la diabetes mellitus [64]. La diabetes mellitus según la OMS es un conjunto de trastornos metabólicos, que se presenta cuando el páncreas no produce insulina o cuando se produce, pero el organismo no la utiliza adecuadamente, al padecer por largo tiempo este trastorno metabólico se presentan complicaciones en órganos y sistemas [74].

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2, con frecuencia sufren de infecciones por diferentes microorganismo, especialmente por *Candida* spp. [27]. *C. albicans* expresa una proteína de superficie que tiene gran afinidad para el factor 3b de complemento (Cr3), llevándose a cabo la opsonización, al presentarse

la hiperglicemia se aumenta la expresión del receptor en *Candida albicans*, produciendo una inhibición de la fagocitosis mediada por el complemento [27]. Este ambiente hiperglicémico causa infecciones en este tipo de pacientes, produciendo efectos desfavorables en la inmunidad humoral y celular, tales como; los cambios en la función de los leucocitos, la respuesta microvascular alterada, cambios en la cascada del complemento y/o la formación de quimioquinas [73]. Este aumento de la glicemia afecta la función de los leucocitos produciendo la disminución de la quimiotaxis, la fagocitosis, la adherencia y la actividad bactericida [24, 31].

6. Métodos de identificación de *Candida* spp.

Debido a que las candidiasis requieren un diagnóstico rápido y oportuno, se debe identificar y reconocer las especies de *Candida*, para evitar fallecimientos en los pacientes; por lo cual se hace importante realizar estudios desde los métodos convencionales, establecidos en la descripción morfológica y fisiológica hasta la aplicación de métodos más desarrollados como los moleculares, fundamentados en el análisis de fragmentos de moléculas de ADN [75].

6.1. Métodos fenotípicos

La identificación de *Candida* spp. se establece por las características morfológicas y/o bioquímicas. Para los rasgos macroscópicos se utiliza el agar Sabouraud (SDA) para observar el aspecto, color, consistencia de las colonias [76].

Para la identificación de *Candida* spp. se utiliza la prueba de tubo germinal, la cual es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen y el ancho es la mitad de la célula progenitora y su longitud es mayor cuatro veces que la célula madre [76]. *C. albicans* es la única capaz de producir tubos germinales; sin embargo, otras especies también pueden desarrollar pseudohifas de aspecto similares a los tubos germinales, esta se realiza en plasma de conejo y/o suero humano [76]. Otra prueba es la formación de clamidosporas son las formas resistentes, redondas u ovals que se caracterizan por presentar una pared celular

gruesa y se encuentra en la parte terminal y/o lateral, para visualizarse se realiza en agar harina de maíz [76].

Para la identificación mediante criterios enzimáticos se utiliza el medio diferencial CHROMagar™ Candida el cual es un medio de aislamiento primario, se caracteriza porque contiene sustratos cromógenos, coloreando los diferentes compuestos producidos por la degradación de enzimas específicas, presentando una coloración que las difiere por el cromógeno que absorbe [76].

Se identifican de una manera rápida, las principales especie de *Candida* como es *C. albicans* y/o *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* [38, 77]. Además de otras pruebas de asimilación de nutrientes, como es la fermentación y/o asimilación de fuentes de carbonos, las pruebas bioquímicas como la electroforesis de proteínas, análisis de los patrones de isoenzimas y de resonancia magnética nuclear, el número de unidades de isopreno de la coenzima Q y la cromatografía de ácidos grasos de cadena larga de la pared celular [78]. Los sistemas de identificación automatizados VITEK, ID 32C® [79].

6.2. Métodos Moleculares

Los métodos moleculares basados en biología molecular son importantes para la identificación de especies, fundamentándose en estudios de las moléculas ADN Y ARN [78]. La PCR presenta gran sensibilidad y especificidad con buenos resultados [38], está amplifica fragmentos con cebadores de oligonucleótidos específicos para secuencias simples repetitivas presentes en el ADN [80].

Hay varios tipos de PCR: PCR multiplex, este método amplifica varias especies en una sola reacción, utilizando dos o más cebadores en un solo tubo, con el objeto de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. Además de la identificación rápida en la misma reacción de muestras polifúngicas [79].

PCR con transcriptasa inversa, en esta técnica se utiliza como molde inicial ARN y una transcriptasa inversa (Tth), para realizar la síntesis de ADN complementario al ARN (ADNc) [81].

PCR en tiempo real permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN, presentes en la muestra original [81]. Otras pruebas moleculares son ADN fingerprinting, análisis por RAPD o electroforesis de campo pulsado; se fundamenta en la amplificación por PCR simultánea del ADN genómico en presencia de un único cebador de pocos oligonucleótidos [81]. RAPD estas son las huellas digitales, son diferencias de número y tamaño en fragmentos de ADN amplificado, siendo específicas de cepas y especies. ARN de bajo peso molecular (*LMW- RNA*) se basa en que utiliza patrones de electroforesis de los RNAs de bajo peso molecular, 5,8S/5S rRNA y tRNA de clase 1 y 2 [81]. Los patrones LMW-rRNA diferencian cepas hasta el nivel de género, LMW-tRNA diferencia entre especies y género [78]. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del *rDNA-rRNA* (*RFLP*), esta técnica permite la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, cuando es cortado por enzimas de restricción [82]. Estos fragmentos polimórficos surgen debido a que los organismos de diferentes especies, difieren en la distancia de los sitios de escisión para cada enzima [78, 81, 82].

7. Antifúngicos

El aumento de las infecciones por *Candida* spp. ha hecho que se emplee los antifúngicos tradicionales tales, como anfotericina B deoxicolato y/o fluorocitosina los cuales han mostrado ser tóxicos [83]. En la actualidad los nuevos antifúngicos desarrollados presentan una menor toxicidad y más eficacia, lo que ha permitido tratar las infecciones fúngicas, mostrando gran importancia para el grupo de los azoles y sus derivados como el fluconazol [35]. Gracias a su amplio espectro, efecto fungicida y/o las bajas tasas de resistencia la anfotericina B convencional es considerada la prueba estándar como tratamiento de elección para las infecciones fúngicas graves, a pesar de que ocasiona daño renal [41]. En 1990 surgen diversos tipos de anfotericina B, los cuales disminuyeron los efectos tóxicos pero conservando su amplio espectro y/o efecto [35], dentro de los cuales

están disponibles las formulaciones lipídicas como la anfotericina B convencional, anfotericina B liposomal, anfotericina B complejo lipídico, anfotericina B de dispersión coloidal [84]. Fue en 1990 donde aparece el fluconazol e itraconazol que son azoles que se emplean en el tratamiento de las candidiasis [35].

8. Azoles

Los azoles son un gran adelanto en el tratamiento antifúngico debido a las ventajas que presenta, como es el amplio espectro y/o los bajos efectos adversos lo que lo hace ser el antifúngico de elección para las diferentes infecciones por *Candida* spp [41]. Los azoles son moléculas sintéticas con un anillo de 5 carbonos el cual se une a la cadena alifática que tiene un grupo fenilo, hay dos grupos de los azoles los imidazoles que presentan dos átomos de nitrógeno en el anillo del imidazol y los triazoles tres átomos de nitrógeno [84, 85]. La estructura del fluconazol contiene dos anillos imidazólicos y es un triazol puesto que posee las tres moléculas de nitrógeno [85].

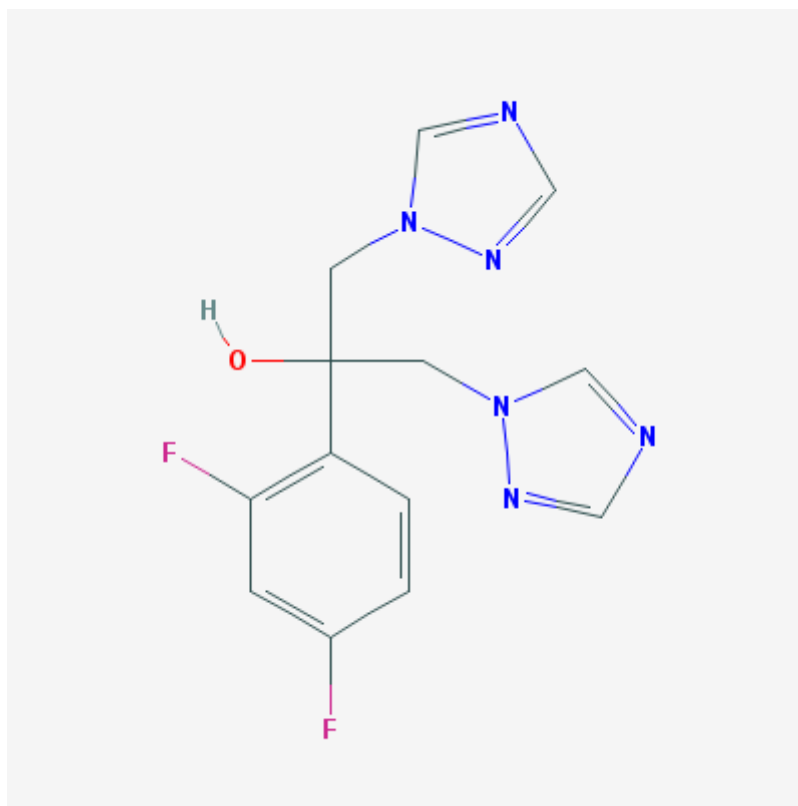


Figura 1. Estructura del fluconazol: con los tres átomos de nitrógeno y los dos anillos imidazólicos.

Para el año de 1979 y 1980 surge el miconazol y ketoconazol en el grupo de los imidazoles, los cuales se utilizan en la actualidad, el miconazol para uso tópico y el ketoconazol por vía oral [86]. Su mecanismo de acción es igual para ambos grupos, los azoles actúan inhibiendo la biosíntesis de ergosterol a nivel de la enzima 14- alfa- esterol desmetilasa, la cual es dependiente del citocromo P-450, el bloqueo de esta ruta metabólica provoca una ruptura en la estructura, ocasionando una alteración de la membrana celular y/o detección del crecimiento [87]. La alteración de la síntesis de ergosterol causa daño en la membrana celular induciendo lisis y muerte celular, por lo que son considerados fungistático [43, 84, 86]. El ergosterol es el principal componente de la membrana celular de los hongos, el cual le confiere fluidez, asimetría e integridad [41].

En los azoles en el caso del fluconazol es soluble en agua, se administra vía oral y parenteral, se elimina por la orina y penetra en el líquido cefalorraquídeo, en la actualidad no se ha observado efectos secundarios, se utiliza como tratamiento empírico, de primera línea para candidemia y/o candidiasis diseminada y profiláctico [84, 86]. Debido al uso del fluconazol desde su aparición se ha utilizado en más de 16 millones de personas, incluyendo más 300. 000 individuos con SIDA sólo en Estados Unidos y debido a su uso se ha reportado resistencia antifúngica [88].

9. Mecanismo de resistencia a los azoles en *Candida* spp.

El uso de los antifúngicos en las últimas décadas, ha conducido a la aparición de la resistencia antifúngica [88]. Las especies de *Candida* más relevantes que causan infecciones son *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Solo estas dos especies *C. krusei* y *C. glabrata* se han reportado resistencia intrínseca y adquirida a los azoles y otros antifúngicos de uso común [55]. *C. glabrata* posee un genoma diploide por lo que esto hace que se adapte y exprese resistencia a diferentes antifúngicos, *C. glabrata* sobresale de las otras *Candida* spp. porque no forma pseudohifas a 37° C, ni secretan hidrolasas que es un factor de virulencia importante para la invasión de tejidos, otro aspecto muy importante es la capacidad que tiene de evadir el sistema inmune y la capacidad de sobrevivir replicándose dentro de los macrófagos [55]. En los azoles la diana es el citocromo P-450 el cual es llamado *Erg11p* siendo este sintetizado por el gen *ERG11*, los azoles se unen al hierro del grupo hemo del *Erg11P* y de esta manera se bloquea la síntesis de ergosterol, impidiendo el crecimiento del hongo [84, 87].

Hay varios mecanismos de resistencia hasta ahora estudiados, la expresión de las bombas de expulsión que poseen dos sistemas: la súper familia facilitadores principal (*MFS*) y la súper familia de proteínas con casete de unión al *ATP* (*ATP-binding-cassette (ABC)*) siendo las responsables de la acumulación intracelular del medicamento [87-89]. Los transportadores *ABC* codifican la expresión *CDR1*

y/o *CDR2*, para *MFS* que codifica el gen *BEN* también llamado *MDR1* y la sobreexpresión del gen *MDR1* que es específica para el fluconazol, mientras que para *CDR1* y/o *CDR2* es resistente a todo los azoles [55, 87, 89, 90].

El primer mecanismo de resistencia es la modificación de la diana, que ocurre cuando la 14 alfa demetilasa modifica la cantidad y calidad presentándose mutaciones en los genes *Erg11* de tal manera que la interacción de la diana con el antifúngico se da ineficientemente [87, 88]. Los genes del citocromo del P-450 (*CYP*) del cual se ha secuenciado la *CYP 51* que codifica la proteína que cataliza la 14 alfa demetilasa, el segundo mecanismo de resistencia descrito es el aumento en el número de copias de la enzima 14 alfa demetilasa (*CYP51*) durante la interacción con los azoles, el cual se debe a la respuesta debido a la reducción de ergosterol o la acumulación de esteroides tóxicos [85, 89]. Ver figura 2

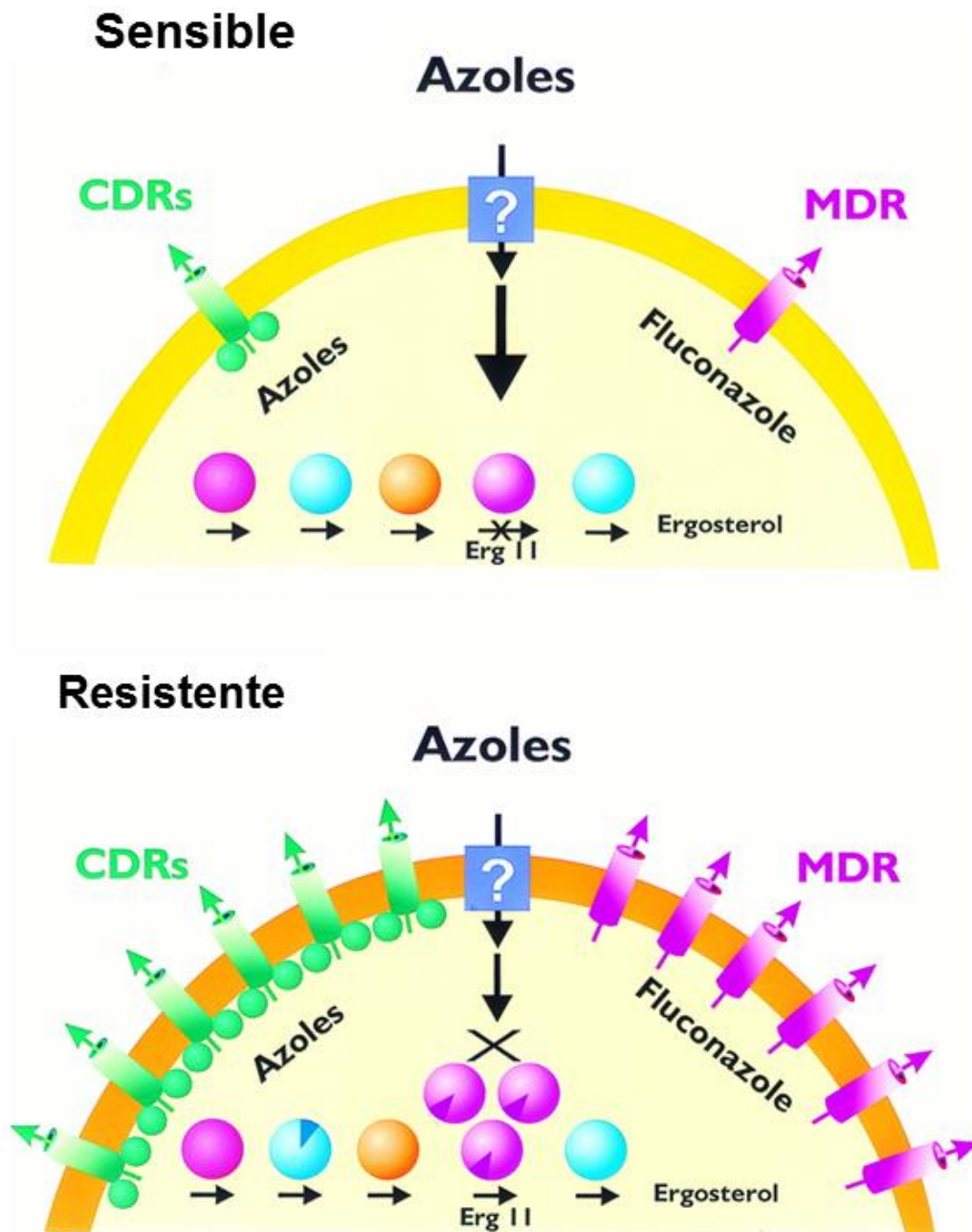


Figura 2. Modelo de sensibilidad y resistencia: En el hongo sensible, se observa que el fármaco azólico entra en la célula y un número reducido de bombas lo exportan hacia afuera (CDR_S y MDR), pero el fármaco llega a la enzima blanco, la 14 alfa lanosterol desmetilasa, inhibiendo su crecimiento. En el hongo resistente, el hongo sintetiza más ARN mensajero, se sobreexpresan las bombas y comienza a expulsar la droga hacia afuera, además puede mutar el *ERG11*. Tomado Cecilia Tapia.

También se ha encontrado la sobreexpresión de los transportadores *CgCDR1*, *PDH1*, *CdDR1* que causan resistencia en *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, los cuales se hallan en la membrana plasmática [89].

10. Métodos de estudio de susceptibilidad antifúngica en levaduras

El aumento del uso de antifúngicos en las últimas décadas ha permitido el surgimiento de resistencia intrínseca y/o adquirida de *Candida* spp. lo que ha creado la necesidad de establecer y estandarizar las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos [42]. En 1992 apareció el primer documento estándar internacional de susceptibilidad de levaduras, elaborado por Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI antes NCCLS) de E, U, A., el cual inicialmente se basó en un método de macrodilución en caldo, que luego fue adaptado a microdilución, el documento M27-A fue aprobado estableciéndose los puntos de cortes del fluconazol, itraconazol y 5 fluorocitosina que permite medir la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las principales especies de levaduras tales como, *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*, con buena reproducibilidad interlaboratorio, también se ha desarrollado el estándar de la comisión europea sobre pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (EUCAST) solo para levaduras no fermentadoras [91].

En la actualidad el método más utilizado, es el documento microdilución M27-A3 en el año de 2008. Los puntos de corte brindan criterios de identificación de las especies más comunes, están dados para fluconazol, itraconazol y/o 5 fluorocitosina, determinados en micosis orofaríngeas de pacientes con SIDA y/o Candidemia [92, 93]. Los documentos proponen como conservar, preparar e interpretar y/o el control de calidad en cada prueba, además de conocer la resistencia a los antifúngicos [94]. La realización de estándares, ha reconocido aprobar varios métodos de difusión en agar y técnicas comerciales, para realizar pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos y así detectar resistencia a los azoles, especialmente a fluconazol [95].

10.1. Métodos de estudio de susceptibilidad de antifúngicos de la EUCAST

El Eucast, estándar de la comisión europea sobre pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, solo para levaduras no fermentadoras [96]. Presenta un subcomité sobre las pruebas de susceptibilidad antifúngica y de los métodos de detección de mecanismos de resistencia clínica y/o epidemiológica. Este es un método para analizar la susceptibilidad de diferentes hongos que producen conidias, mediante la CIM [97]. Estos métodos de dilución, especifican la actividad de los antifúngicos y confirman la susceptibilidad que dan resultados poco creíbles. La dilución en caldo es un método que prueba el crecimiento del hongo, en los pocillos de la placa con medios de cultivos que tienen diluciones seriadas. Este método presenta ventajas frente al CLSI, como es la glucosa al 2% y el aumento del inoculo, acortando el tiempo de lectura a las 24 horas de incubación y la lectura se realiza en un espectrofotómetro [97]. En este método aún no se ha establecido puntos de corte para algunos antifúngicos de *Candida* spp. [98].

10.2. Métodos de estudio de susceptibilidad de antifúngicos del CLSI

El CLSI creo un subcomité para estandarizar las pruebas a los antifúngicos, para *Candida* spp. y *Criptococcus neoformans* en el cual se aprobó el método M27-A, que tiene los puntos de corte de fluconazol, itraconazol, 5 fluorocitosina y las CMI para las cepas de control de calidad. Los métodos para levaduras son M27A-3 y M44-A, para hongos filamentosos el M-38A, se basan en la cuantificación y la inhibición del crecimiento producida por el antifúngico, comparada con el crecimiento de la levadura, pero sin antifúngico. El método de microdilución para levaduras M27A3, se realiza para antifúngicos solubles [91]. La técnica de microdilución M27A3 es la prueba gold estándar, presentándose alta reproducibilidad intra e inter laboratorio, considerada el método de referencia [92].

III. OBJETIVOS

❖ **Objetivo general**

Identificar molecularmente y evaluar la susceptibilidad a fluconazol de *Candida* spp. colonizante de pie en pacientes diabéticos que asisten a un programa de promoción de la salud.

Objetivos específicos

- ❖ Identificar por métodos fenotípicos y moleculares *Candida* spp. colonizante de pie en pacientes sujetos de estudio.
- ❖ Determinar la susceptibilidad a fluconazol en *Candida* spp. colonizante en pies de los participantes.
- ❖ Determinar la frecuencia de colonización por *Candida* spp. de pie en pacientes diabéticos, grupo control y la variación de especies.
- ❖ Correlacionar los niveles de hemoglobina glucosilada medidos en el grupo de estudio en los pacientes diabéticos colonizados y variación de especies.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, transversal realizado con información de adultos asistentes a un programa de promoción de la salud en el municipio de Turbaco-Bolívar, durante el periodo comprendido entre Agosto y Diciembre de 2013.

1. Población

La población de referencia está constituida por todos los adultos que asistieron al programa de promoción de la salud del municipio de Turbaco, Bolívar.

2. Población de estudio

Se realizó en pacientes que asisten al grupo de promoción de la salud de Turbaco, Bolívar, en el programa de promoción y prevención. Para la selección de los sujetos de estudio se definieron los siguientes criterios de inclusión:

- ❖ Que estén o no diagnosticados con diabetes, de los cuáles se tomó el dato reciente, no mayor a un mes, de hemoglobina glucosilada, para los pacientes diabéticos y para el grupo control de pacientes no diabéticos se tomó el valor de glicemia en ayunas de la historia clínica.
- ❖ Los pacientes a estudiar no presenten lesiones en la zona interdigital de donde se va a tomar la muestra.
- ❖ Aceptación de ingreso al estudio mediante la firma o huella digital en caso de no saber firmar el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- ❖ Los pacientes que presenten infecciones por hongos.

3. MUESTRA Y MUESTREO

3.1. Muestra

El estudio se realizó en un total de 172 pacientes y la toma de muestras se hizo por conveniencia, teniendo en cuenta los pacientes adultos que asistieron al programa de promoción de la salud en el municipio de Turbaco-Bolívar, durante el periodo comprendido entre Agosto y Diciembre de 2013.

3.2. Muestreo

No probalístico, porque se accedió al total de los pacientes en un tiempo estipulado, en un periodo comprendido.

4. Aspectos éticos

Teniendo en cuenta riesgo mínimo asociado a la ejecución del presente trabajo, establecido con base en el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993, para el mismo, se solicitó el correspondiente consentimiento informado a cada paciente con el objetivo de ser involucrado en el estudio (ver anexo A). Cumpliendo a cabalidad todos los artículos de la resolución que comprometen esta investigación, la toma de muestra se llevó a cabo con el seguimiento de las normas de bioseguridad establecidas y el desecho de materiales microbiológicos y otros residuos, se realizó previa esterilización en calor húmedo o seco de acuerdo a los lineamientos de la institución. La ejecución de este trabajo fue aprobada por el comité de ética de la universidad de Cartagena.

5. Información del paciente

Para la captura de información relacionada con los pacientes, se utilizó un formulario, que incluía las siguientes variables: edad, sexo, diagnóstico,

medicamentos, datos paraclínicos, antecedentes familiares. Esta información fue tomada de la historia clínica y la información directa de la población objetivo de estudio.

6. Método estadístico

Se realizó una estadística descriptiva para cada variable, obteniéndose la distribución de frecuencias absolutas y relativas. En las variables cuantitativas se calculó los parámetros de media, mediana, desviación típica, máximo y mínimo. Para el estudio comparativo de los dos grupos se realizó las siguientes pruebas:

- ❖ Entre dos variables cualitativas: contraste de independencia mediante el análisis de tablas de contingencia, con el test de chi- cuadrado de Pearson.
- ❖ En la variable cuantitativa se realizó una prueba T- Student. Para comprobar si las medias de dos poblaciones en forma normal son iguales.
- ❖ Se realizó un estudio multivariante mediante un análisis de regresión logística, para así evaluar la probabilidad, el riesgo o protección, en función de sus diferentes variables con sus respectivos Odds Ratio (OR) e intervalos de confianza (IC) al 95% y poder determinar la verdadera asociación.
- ❖ Se estimó que la diferencia era significativa cuando $p < 0,05$.
- ❖ El análisis se realizó con el programa de SPSS para Windows versión 19.0.

7. Toma de muestras

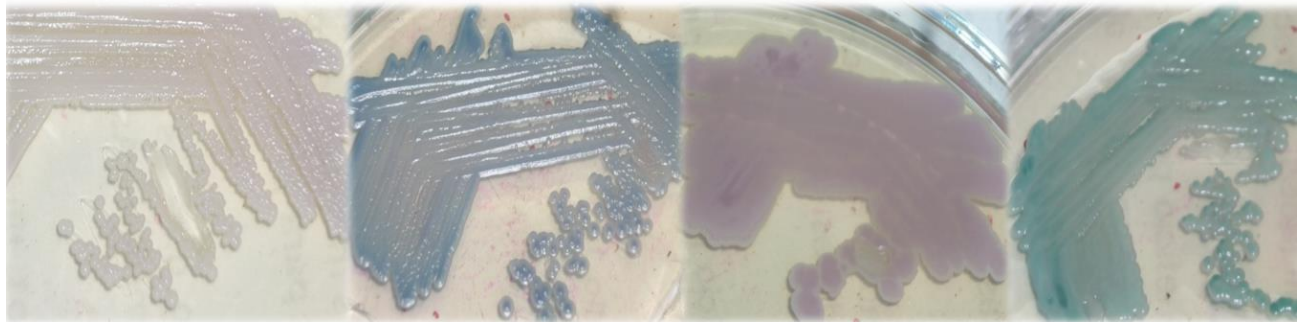
Se tomó con un hisopo estéril en las zonas interdigitales de ambos pies. Cada muestra se codificó y se protegió en frascos estériles bien cerrados, los cuales incluían solución de PBS a pH 7.2 para conservarlas durante el transporte al laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cartagena [99]. Estas fueron sembradas en el menor tiempo posible agar Sabouraud con cloranfenicol con el objeto de inhibir la flora bacteriana, para luego incubar por 72 horas a 37° C [100].

8. Tinción de gram

La tinción de gram se realizó mediante la preparación de frotis, extraídos de cultivos en agar Sabouraud de 48 horas de crecimiento a 37°C en un porta objetos. El extendido se fijó con calor y se adicionó el cristal violeta por un minuto con posterior lavado con agua. Seguidamente, se le adicionó lugol con las mismas características en tiempo y lavado que el colorante anterior. Luego de ello, se decoloró con alcohol-acetona y enjuagado para después adicionarle la safranina por un minuto, enjuagar y dejar secar a temperatura ambiente, para luego ser observado al microscopio con los objetivos de 10x y 100x [99].

9. Aislamiento e identificación de *Candida* spp. por CHROMagar™ Candida:

Cada aislamiento se sembró en CHROMagar™ Candida incubándose por 48 horas a 37°C, en este medio de cultivo cromogénico se identificó presuntivamente *Candida* spp., de acuerdo a las características colorimétricas que indica el fabricante para cada especie [92, 101-103]. Figura 3



Candida spp.

Candida tropicalis

Candida krusei

Candida albicans y/o
C. dubliniensis

Figura 3. Imágenes de aislados observados en CHROMagar™ Candida, donde se evidencia cada color para la identificación presuntiva. Para las cepas de color blanco *Candida* spp., cepa colonia azul *C. tropicalis*, cepa colonia rosado *C. krusei* y cepa color verde *C. albicans* y/o *C. dubliniensis*.

10. PRUEBA DE TUBO GERMINAL EN SUERO Y CLAMIDOSPORAS

Se tomó 500 μL de suero humano y se agregó la colonia a estudiar, tomada de agar Sabouraud sin cloranfenicol (Scharlau) con crecimiento de 24 horas, se mezcló y se incubó a 35°C por tres horas. Pasado este tiempo se toma una gota, se colocó en un porta objeto con cubre-objeto para observar a 10X y/o 40X. La prueba se cataloga positiva, solo si se observan los tubos germinales, por observación de 10 a 20 campos [76].

Para observar las clamidosporas se realizó en agar harina de maíz con Tween 80, la inoculación se hizo con tres cortes paralelos en el agar, manteniendo el asa en punta con un ángulo aproximado de 45°. Se colocó un cubre-objeto sobre las estrías realizadas y se incubó a 24 y 48 horas a 30°C y se observó microscópicamente a 10X y 40X [76].

11. EXTRACCIÓN DE ADN FÚNGICO

Para la obtención del ADN de *Candida* spp., se tomó colonias de un cultivo en agar Sabouraud sin cloranfenicol (Scharlau) de 24 horas y se resuspendió en 500 μL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH: 8.0 + EDTA 1mM) para luego centrifugarse a 13.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 500 μL de buffer TE. La mezcla se sometió a 100°C por 30 minutos y luego se congeló durante 20 minutos. Paso seguido, se centrifugó a 13.000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante resultante que contiene el ADN, se midió su grado de pureza a través de la absorbancia con un espectrofotómetro a 260 y 280 nm, para obtener una relación de A260 / A280 de 1,6 a 1,8 que indica que el ADN obtenido es de una buena calidad. Este producto se almacenó a -80°C para las siguientes pruebas [104].

12. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE PCR MULTIPLEX

Los aislamientos por *Candida* spp. se identificaron por PCR Multiplex [79]. La PCR multiplex amplifica más de una secuencia en una misma reacción, empleando dos cebadores universales Uni 1 y Uni 2, con 8 primers específicos de *Candida* spp. en un solo tubo, con el objeto de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. [79, 104]. Tabla 1.

Tabla 1. Primers y secuencias que se utilizaron para la amplificación de fragmentos de ADN.

Primers	Secuencias
Uni 1	5'GTCAAACCTTGGTTCATTTA 3'
Uni 2	5'TTCTTTTCCTCGCTTATTGA 3'
Calb	5'AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA 3'
Cgla	5'TTGTCTGAGCTCGGAGAGAG 3'
Ctro	5'GATTTGCTTAATTGCCCCAC 3'
Ckru	5'CTGGCCGAGCGAACTAGACT 3'
Cpar	5'CTGGCCGAGCGAACTAGACT 3'
Cgui	5'TTGGCCTAGAGATAGGTTGG 3'
Clus	5' TTCGGAGCAACGCCTAACCCG 3'
Cdub	5' CTCAACCCCTAGGGTTTGG 3'
Cafrforw	5'GCTACCACTTCAGAATCATCATC3'
Cafrrever	5'GCACCTCAGTCGTAGAGACG 3'

Para la amplificación se utilizó el kit Go Taq Green. El volumen de ADN para la reacción fue de 25 µL que contuvo 2.75 µL de cada Uni1 y Uni2, 12.5 µL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega®), 0.75 µL del primer específico de *Candida albicans*, 2,0 µL de *C. dubliniensis*, 1.0 µL para *C. tropicalis*, 0,75 µL para

C. krusei, 0,5 µL para *C. glabrata*, 0,75 µL para *C. guilliermondii*, 0,5 µL *C. lusitaniae* y 4 µL de ADN molde.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: Un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 10 minutos, 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos y 65°C por 45 segundos, con un ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos, con 40 ciclos. Como controles positivos se utilizaron las cepas de *Candida albicans* ATCC 64677, *C. tropicalis* ATCC 0847, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. lusitaniae* ATCC 34449, *C. guilliermondii* ATCC 6260 y/o *C. dubliniensis* 46-3 donada por Luz Dary Caicedo, de la Universidad del valle y como control negativo de la reacción se utilizó agua ultrapura [79]. Tabla 2

Tabla 2. Cepas de referencia, utilizadas en el estudio.

Cepas ATCC	Referencia	<i>Candida</i> spp.
ATCC 90028	0264P	<i>C. albicans</i>
UniValle CD 46-3	UniValle CD 46-3	<i>C. dubliniensis</i>
ATCC 750	0847P	<i>C. tropicalis</i>
ATCC 6258	6258	<i>C. krusei</i>
ATCC 64677	0226P	<i>C. glabrata</i>
ATCC 6260	6260	<i>C. guilliermondii</i>
ATCC 34449	34449	<i>C. lusitaniae</i>
ATCC 22019	0726P	<i>C. parapsilosis</i>

El análisis de electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2%, para la realización de la corrida de electroforesis se preparó la agarosa al 2%, inicialmente se tomó las medidas de la cámara el ancho, el largo y la profundidad, seguido se pesó la agarosa y se utilizó el buffer TBE 1X. Después de mezclar, se llevó al agitador hasta disolverse, se agregó el bromuro de etidio. Se colocaron los moldes en los pozos. Se dejó reposar y se agregó en la cámara, se retiró el molde. Se adicionó el buffer TBE 1X, hasta el nivel de la cámara. En el primer pozo se agregó el marcador de peso molecular, en el segundo pozo el ADN de las ATTC de *Candida* y seguido el ADN de las muestras clínicas, se tapó y se colocó corriente de 100 voltios, 300 miliamperios, se dejó por una hora y treinta minutos. Pasado este tiempo, se tomó lectura en lámpara, observándose las bandas bajo luz ultra violeta (UV) [79].

13. SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA

Para las pruebas de susceptibilidad antifúngica de los aislamientos se realizó por el método de microdilución según el protocolo comité nacional de normas de laboratorio clínico (CLSI) M27A3, por triplicado. Se utilizó fluconazol marca SIGMA, el cual es un antifúngico soluble en agua, con una concentración fúngica de 64 a 0.12 ug/mL, de acuerdo al protocolo de M27 A3 se utilizó en el medio RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato de sodio y ajustado a un pH de 7.0 con ácido morfolino sulfónico (MOPS) [92].

Inicialmente se preparó la solución madre, a la cual se agregó 3 µL del medio RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato de sodio con un de pH 7,0 y 1 µL del fluconazol, seguido se hicieron diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada. Cada tubo se identificó con números del uno al diez; en el tubo uno se adicionó 1µL de la solución madre y 1µL de RPMI 1640, en el tubo dos 500 µL del tubo uno y 500 µL del RPMI 1640, en el tubo tres 500 µL del tubo uno y 1.5 µL de RPMI 1640, en el tubo cuatro 500 µL del tubo tres y 500

μL de RPMI 1640, en el tubo cinco 250 μL del tubo tres y 750 μL de RPMI 1640, en el tubo seis se adicionó 250 μL del tubo tres y 1750 μL del RPMI, en el tubo siete 500 μL del tubo seis y 500 μL de RPMI 1640, en el tubo ocho 250 μL del tubo seis y 750 μL de RPMI 1640, en el tubo nueve 250 μL del tubo seis y 1.750 μL de RPMI 1640 y en el tubo diez 1μL del tubo nueve y 1μL de RPMI 1640, cada tubo quedó con 1 μL y en el último tubo se descarta 1μL. Luego se agregó 4 μL de RPMI 1640 a cada tubo para quedar con un volumen final de 5 μL [92].

Tabla 3. Diluciones a fluconazol

Tubos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Solución madre (Fluconazol + RPMI 1640)		1000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	250 μL	250 μL	500 μL	250 μL	250 μL	1000 μL	1000 μL	Descartar
Medio RPMI 1640		1000 μL	500 μL	1500 μL	500 μL	750 μL	1750 μL	500 μL	750 μL	1750 μL	1000 μL	-	
Concentración final		640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	-	
Medio RPMI 1640		4μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4μL	-	
Volumen final		5μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5μL	5μL	-	

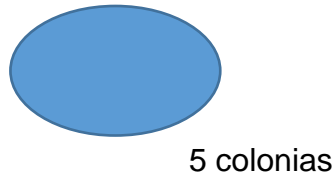
Para el llenado de las microplacas de 96 pocillos, se tomó 100 μL de cada tubo en sus respectivas columnas. De tal forma que la dilución del tubo 1 se agregó 100 μL en la columna 1 de la A-H, de la dilución del tubo dos se agregaron 100 μL en la columna 2 de la A-H y así sucesivamente hasta llegar al diez. En la columna 11

se agregó 100 µL del medio RMPI 1640 para el control de crecimiento y la columna 12 se agregó 200 µL del medio RMPI 1640 para el control de esterilidad.

El inóculo se obtuvo del crecimiento en agar Sabouraud a 37° C hasta 24 horas, para estandarizar las concentraciones del inóculo, se preparó una suspensión con 3 µL de solución salina con un estándar de 0,5 de la escala de Mc Farland. Se preparó dos diluciones, la dilución 1 con 2.45 µL de RMPI 1640 y 50 µL de la solución preparada con solución salina a la escala 0.5 Mc Farland. Se realizó una segunda dilución con 3,8 µL de RMPI 1640 y 200 µL de la dilución 1. De la segunda dilución se llenaron los pozos, agregando 100 µL del 1 al 11 y en el doce no se agregó muestra, por ser el control de esterilidad. Se utilizó un control de crecimiento en la columna 11 y otro de esterilidad en la columna 12, se incubó a 35°C tomando lecturas visuales a las 24 y 48 horas de incubación. Se realizó cada muestra por triplicado, para el control de calidad, se utilizó cepas ATCC de *Candida parapsilosis* 22019 y *Candida krusei* 6258 recomendada por CLSI [92]. (Figura 4)

Preparación del inóculo

SDA 24h a 37°C



Solución salina, Mc Farland 0,5 μ L



50 μ L



Dilución I

2,45 ml RPMI



3,8 ml RPMI + 200 μ L dilución I

Dilución II

100 μ L de la dilución II en el pozo

Figura 4. Esquema de preparación del inóculo de Pfizer.

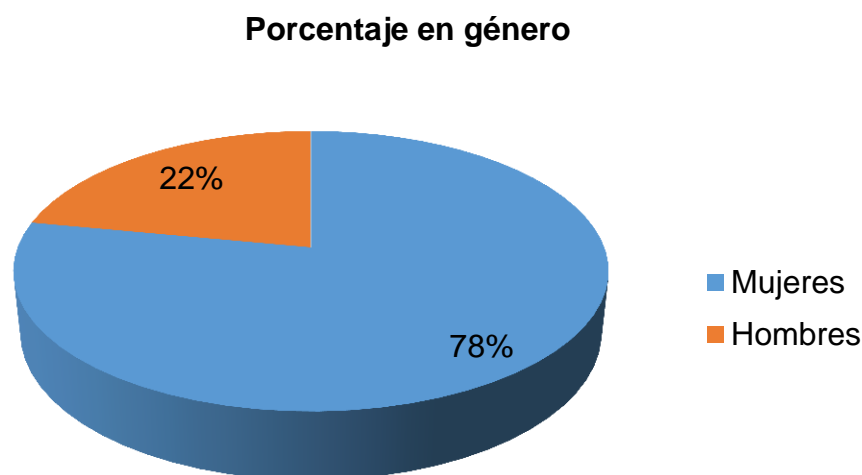
V. RESULTADOS

1. Características demográficas

Se analizó la información de 172 pacientes, que asistieron al programa de promoción en salud, del municipio de Turbaco (Bolívar). En el periodo comprendido entre agosto de 2012 y diciembre del mismo año; de los cuales 134 (77,9%) fueron de sexo femenino y 38 (22,1%) de sexo masculino (Gráfica 1). Las edades oscilaron entre 40 y 87 años, con un promedio de 65,3 con un coeficiente de variación (CV) de 17,5.

En los pacientes con diabetes mellitus (DM), se halló que el 57 (50,4%) eran pacientes menores de 64 años y el 56 (49,6%) representaban los mayores de 65 años. De estos, 95 (84,1%) son mujeres y 18 (15,9%) hombres.

En el grupo no diabéticos, la distribución por género fueron 39 (66,1%) en mujeres y 20 (33,9%) en hombres, donde se encontró que 22(37,3%) son menores de 64 años y 37(62,7%) mayores de 65 años.



Gráfica 1. Porcentajes de género, sexo femenino 78% y masculino 22%.

2. Epidemiología

Respecto a la situación de salud, se encontró 113 (65,7%) pacientes con diagnóstico de diabetes y el resto (59 (34,3%)) no fueron diagnosticados con esta patología. Por otra parte, 71(41,3%) presentaron diagnóstico de hipertensión arterial (HTA) y 101 (58,7%) no tenían diagnóstico para hipertensión. Además de diabetes e hipertensión, no se encontró comorbilidades después de la aplicación del cuestionario “Características clínicas-comorbilidades” (ver anexo A).

En cuanto al tratamiento farmacológico, 121 (70,34%) reciben medicamentos y 51 (29,65%) no reciben farmacoterapia, cabe resaltar que de estos últimos, 98 tiene diagnóstico de diabetes y 23 no.

En los pacientes diabéticos, 94 (83,2%) toman fármacos y 19 (16,8%) no reciben ningún tratamiento antidiabético. En cuanto a la ingesta de estatinas, se halló en un 35,4% y los que no consumen este medicamento fue de 64,6%. Se observó 53 (46,9%) pacientes con hipertensión y 60 (53,1%) sin esta patología.

En cuanto al control de la hemoglobina glicosilada en los 113 pacientes diabéticos, se consideró que la enfermedad estaba bajo control en 73 pacientes (64,6%) y en descontrol 40(35,4%). En la hemoglobina glicosilada, cuando se encuentran menor a 7% se considera controlado y mayor de 7,1% paciente mal controlado.

En el grupo control se observó: Que los pacientes, a los cuales se les administro medicamentos fue de un 32,2% (19) y 67,8% (40) en aquellos que no están tomando ningún tipo. Respecto al consumo de estatinas 8(13,5%) recibía este medicamento y 51(86,5%) no consumen. Los hipertensos en este grupo se hallaron en un 30,5% y los que no sufren de este diagnóstico en un 69,5%.

3. Colonización por *Candida* spp.

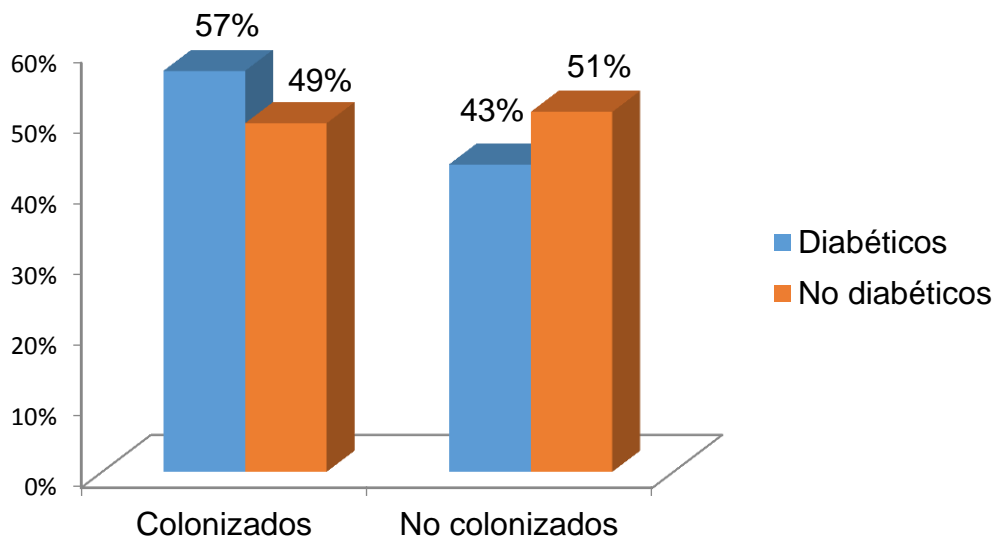
Para la proporción de colonización, se encontró que de los 172 pacientes, 93 (54,1%) estaban colonizados en pie y en 79 (45,9%) no presentaron aislamientos. De los colonizados, 32 (34,3%) fueron por *C. parapsilosis*, el cual fue el microorganismo más frecuente, colonizando tanto a pacientes diabéticos (32,8%) como al grupo de los no diabéticos (37,9%). La segunda especie de *Candida* aislada fue *C. tropicalis* con 17(18,2%) aislamientos, seguido de *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* con 15 (16,1%), 13 (14%), 7 (7,52%), 5 (5,37%), 2 (2,15%) y 2 (2,15%) respectivamente.

En el grupo de pacientes con DM, 64 (56,6%) estuvieron colonizados por *Candida* spp. y 49 (43,4%) no se encuentran colonizados. (Gráfica 2) La especie que más sobresalió fue *C. parapsilosis* con 21(32,8%) aislamiento, seguido de *C. guilliermondii* 12 (18,7%), *C. krusei* 10 (15,6%), *C. tropicalis* 9 (14,0%), *C. albicans* 6 (9,37%), *C. lusitaniae* 3 (4,6%), *C. glabrata* 2 (3,1%) y *C. dubliniensis* 1 (1,5%).
Gráfica 3

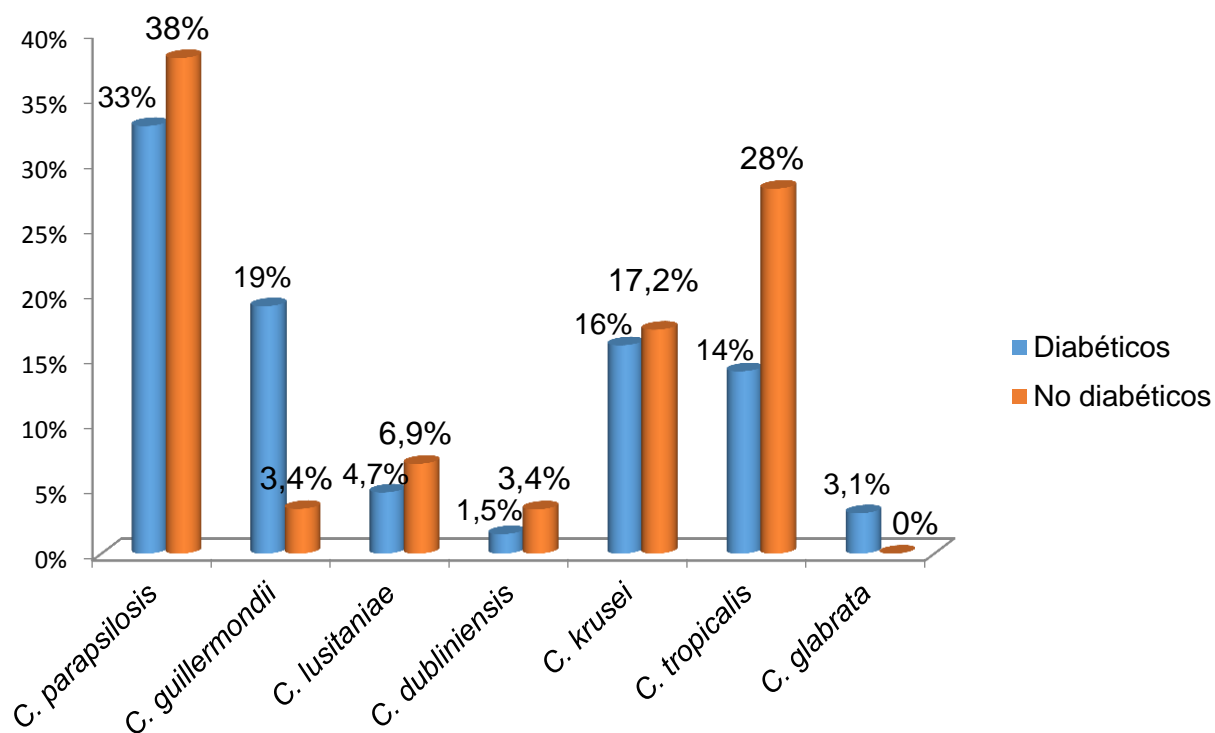
En los pacientes control, se encontró que 29 (49,2%) son colonizados y 30 (50,8%) no. (Gráfica 2) La distribución de especies de *Candida* fue: 37,9% (11) para *C. parapsilosis*, 27,5% (8) *C. tropicalis*, 17,2% (5) *C. krusei*, 6,9% (2) *C. lusitaniae*, 3,44% (1) *C. dubliniensis*, 3,44% (1) *C. albicans*, 3,44% (1) *C. guilliermondii* y (0) *C. glabrata*. (Gráfica 3)

C. albicans se aisló en menor proporción con 5,3% (6) en los pacientes diabéticos y en el grupo de *C. no albicans* se encontró en 94,7% (107); mientras que en los no diabéticos *C. albicans* fue de 1,7%(1) y *C. no albicans* se halló 98,3%(58). El grupo de *C. no albicans* fue el que predominó con un mayor aislamiento.

En nuestro hallazgo en el grupo de pacientes controlados (HbA1C) fueron colonizados, en un 57,2% (36) y los controlados, no colonizados fue de 42,8% (27) y no controlados, colonizados fue de 54% (27) y no colonizados, no controlados fue 46% (23).



Gráfica 2. Distribución porcentual de pacientes diabéticos y no diabéticos, frente a la frecuencia de colonización.



Gráfica 3. Porcentajes en pacientes diabéticos y no diabéticos, con sus especies de *Candida*.

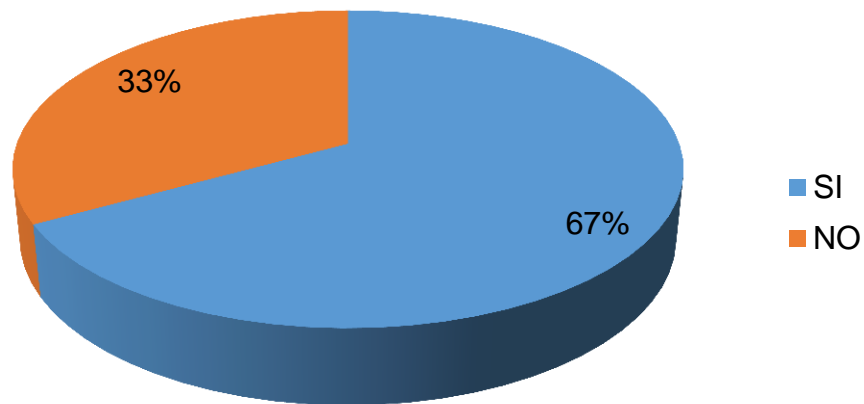
4. Análisis Microbiológico

4.1. Identificación por CHROMagar™ Candida: El espectro de colores obtenido fue diversos como el blanco, azul, rosado y/o verde observándose diferentes intensidades. Las colonias blancas fueron las que mayor predominaron y son compartidas por distintas especies de *Candida*, de las cuales se obtuvo 52 (55,9%) para las colonias blancas, 17 (18,2%) colonias azules, 15 (16,1%) colonias rosadas y 9 (9,6%) para las colonias verdes.

4.2. Prueba de tubo germinal en suero: La presencia de tubos germinales es un importante factor distintivo entre las especies de *Candida*. De 9 cepas que se identificaron como *C. albicans* y/o *C. dubliniensis* por CHROMagar™ Candida se realizó la prueba de tubo germinal. (Gráfica 4) *C. albicans* desarrollo tubo germinal en suero en un 86% (6) y 14% (1) no desarrollaron esta estructura. Para *C.*

dublinskiensis, ninguna formo tubo germinal, de igual manera no desarrollo clamidosporas en agar harina de maíz. En la prueba de clamidosporas y tubo germinal se observó un 66,6% (6) con un 33,3% (3) que no desarrollaron esta estructura. Figura 5

Prueba de tubo germinal en suero en colonias verdes



Gráfica 4. Porcentajes de cepas positivas y negativas que formaron tubos germinales



Figura 5. Imágenes de aislados observados al microscopio (40X) donde se observa la formación de clamidosporas terminales, en agar harina de maíz.

4.3. Identificación por PCR Multiplex: De los 93 aislados, todos originaron un patrón de banda esperado, cuando los productos de PCR multiplex se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Figuras 6 y 7.

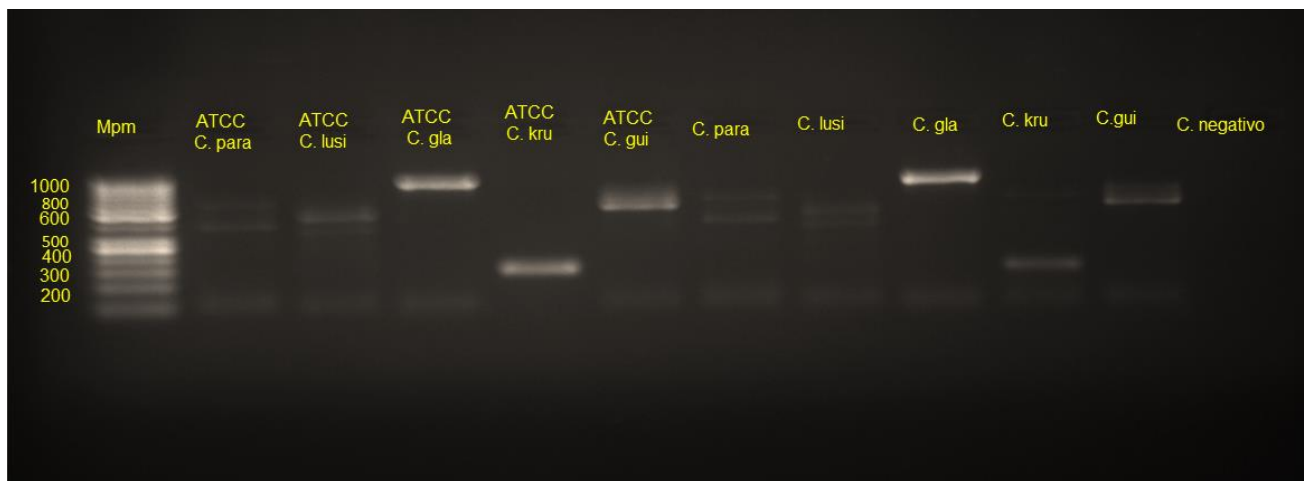


Figura 6. Amplificación por PCR multiplex para confirmar los aislamientos por CHROMagar™ Candida. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 ATCC de C.

parapsilosis, carril 3 ATCC de *C. lusitaniae*, carril 4 ATCC de *C. glabrata*, carril 5 ATCC de *C. krusei*, Carril 6 ATCC de *C. guilliermondii*, carriles 7 a 11 muestras clínicas y carril 12 control de la reacción.

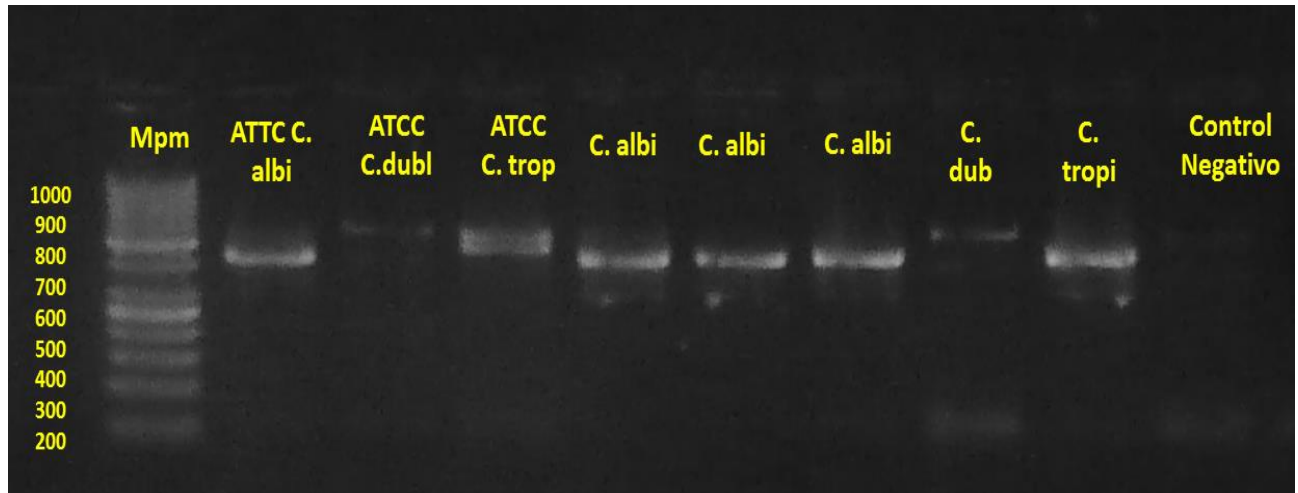
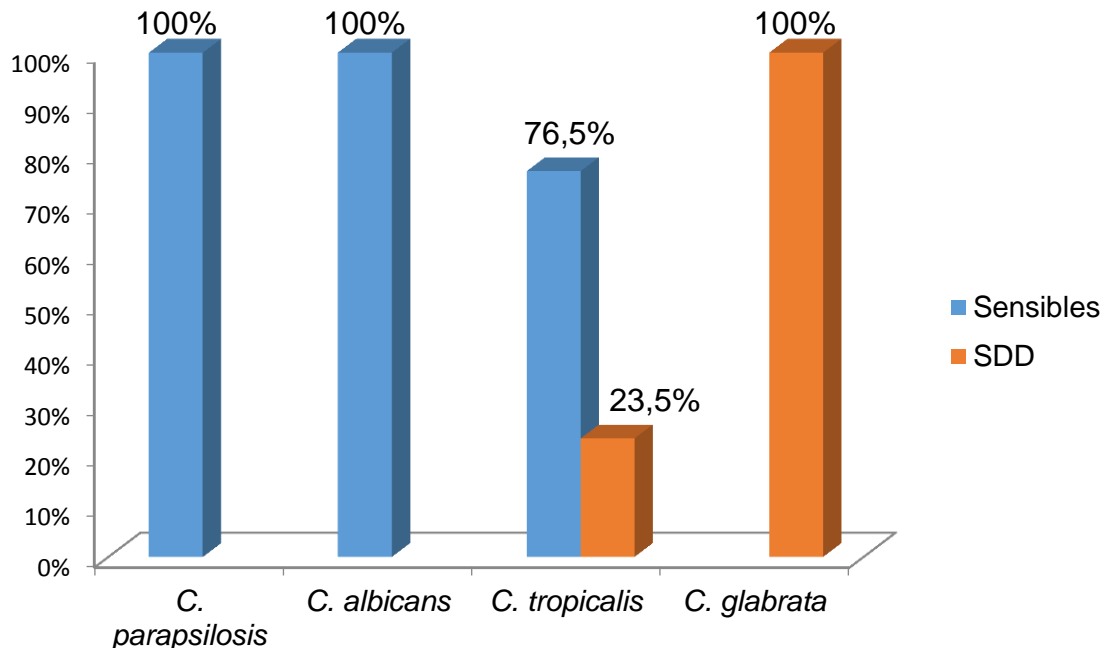


Figura 7. Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, donde se muestra los productos obtenidos para PCR multiplex los ADN de *Candida* spp.. En esta imagen se muestra *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* que se identificaron. Carril 1 marcador de peso molecular . Carril 2 control positivo de *C. albicans* de la cepa ATCC, carril 2 ATCC de *C. dubliniensis*, carril 3 ATCC de *C. tropicalis*. Carriles 5 y 9 muestras clínicas y 10 carril control negativo

5. Pruebas de susceptibilidad: En la evaluación de la susceptibilidad a fluconazol de los 93 aislados, el 90% fueron sensible (CMI \leq 2 $\mu\text{g/mL}$), con un 100% para *C. parapsilosis* y *C. albicans*. Seguido por el 76,5% de *C. tropicalis*.

En el caso de los aislamientos con comportamiento de sensibilidad dependiente de la dosis (SDD) fue de un 10% de las cuales corresponden a un 100% para *C. glabrata* (CMI \leq 32 $\mu\text{g/mL}$) y 23,5% de *C. tropicalis* (CMI 4 $\mu\text{g/mL}$); (Gráfica 5) *C. krusei* es una especie intrínsecamente resistente a fluconazol. Para las especies

de *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis* aún no se han establecidos puntos de cortes por el CLSI.



Gráfica 5. Porcentaje de sensibilidad y SDD a fluconazol en las diferentes cepas aisladas.

Los valores de CMI del fluconazol obtenidos se distribuyeron en el rango de 0,25 hasta 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una media de 1,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un coeficiente de variación 1,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la mayor cantidad de *Candida* spp. fue susceptible a concentraciones de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 28 (30,10%). También se analizó los datos de susceptibilidad a fluconazol frente a la edad de los pacientes y no se observó diferencias entre los menores y mayores de 65 años de edad, con valor de $P=0,339$.

En los pacientes diabéticos 63 (98,5%) fueron susceptibles a fluconazol y 1 (1,5%) presentaron dosis sensible dependiente (SDD) y para los no diabéticos una susceptibilidad de 28 (96,5%) y SDD con 1 (3,5%).

6. Análisis de otras variables

Los niveles de glucosa encontrados oscilaron entre 71 y 132,9 mg/dL, la media fue de $89,08 \pm 12,2$; para la hemoglobina glicosilada los valores se encuentran entre 5.0-15,6% cuyo promedio fue de $7,6 \pm 2,7$. Los esquemas de tratamiento hipoglicemiante, se concentraron en los siguientes medicamentos, metformina 32 (21,0%), glibenclamida 3 (1,97%), insulina 16 (10,52%). Respecto al resto de medicamentos el comportamiento fue el siguiente: Estatinas 58(38,1%), ASA 37(24,3%) hormonal 4 (2,63%), antibióticos 1(0,65%) e inmunosupresores 1(0,65%).

7. Análisis estadístico

Para establecer la asociación entre variables cualitativas se utilizó la prueba de chi-cuadrado, al analizar el grupo de pacientes colonizados con las variables: hemoglobina glicosilada ($P=0,23$), edad ($P=0,14$), género ($P= 0,19$), diabetes ($P=0,35$), no se halló diferencia estadísticamente significativa.

Respecto a la influencia de la ingesta de estatinas, en la inhibición del crecimiento de *Candida* spp. ($P=0,29$), tampoco se asoció significativamente. En el análisis multivariante, no se encontró asociación significativa en ninguna de las variables. (Tabla 4 y 5)

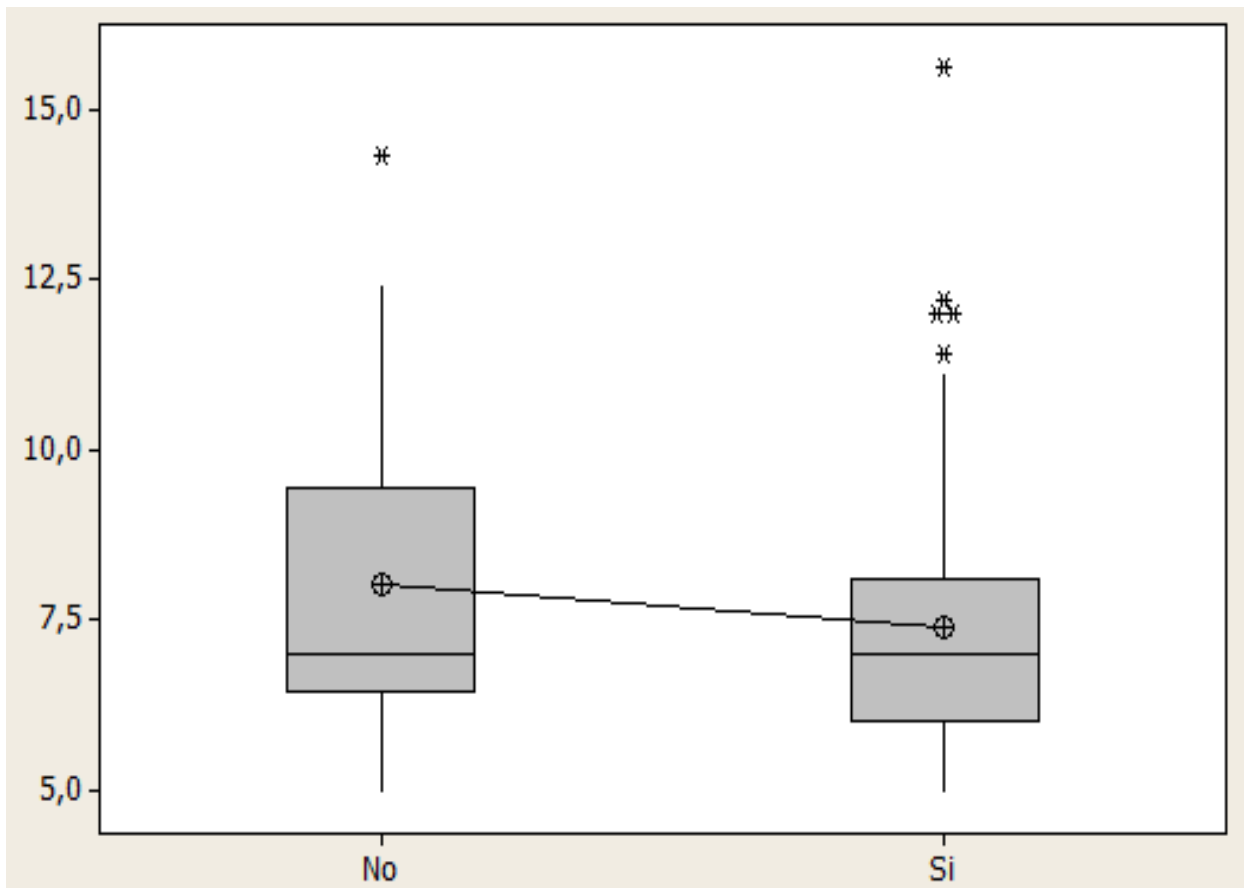
Tabla 4. Odds Ratio (OR) ajustado e intervalo de confianza (IC) 95%.

Variables	OR Crudo	IC 95%	OR Ajustado	IC 95%	Valor P
Edad	0,64	0,35-1,17	0,60	0,32-1,11	0,14
Género	0,46	0,14-1,50	0,43	0,12-1,46	0,19
Diabetes Mellitus	1,35	0,71-2,54	1,45	0,76-2,76	0,35
Hemoglobina glicosilada	1,73	0,79-3,79	1,77	0,81-3,99	0,16

Tabla 5. Frecuencia y comparación de las características de pacientes colonizados.

Variables	Colonizados N= 93 n (%)	No colonizados N=79 n (%)	Valor de P
Edad (Media(DE))	67,2 (11,3)	62,9(11,4)	0,34
Género Femenino	76 (82)	58 (73,4)	0,19
Masculino	17 (18)	21 (26,6)	
Diabéticos	64 (69)	49 (62)	0,35
No diabéticos	29 (31)	30 (38)	
HbA1C			0,16
Controlada	45 (70,3)	28 (57)	
No controlada	19 (29,7)	21 (43)	
Ingesta de estatinas			0,29
SI	29 (60,4)	19 (51,6)	
NO	64 (39,6)	60(48,4)	

Para la variable cuantitativa, se utilizó la prueba T de Student, del total de pacientes incluidos en el estudio, 113 reportaban los valores de hemoglobina glicosilada, de estos 64 presentaron aislamientos para *Candida* spp. y 49 no. Al comparar los valores de hemoglobina glicosilada de los pacientes que presentaron aislamientos frente a los libres de *Candida*, se encontró que no hubo diferencia significativa, al aplicar una prueba T. Gráfica 6



Gráfica 6. Comparación de los niveles de hemoglobina glicosilada de pacientes con aislamiento y sin aislamiento.

VI. Discusión

En las últimas décadas, *Candida* se ha convertido en un microorganismo emergente, presentándose como la causa más común en las infecciones fúngicas, es necesario conocer la epidemiología local contribuye a conocer su comportamiento en este grupo de pacientes.

Considerando que la colonización es un factor de riesgo para la infección por *Candida* spp., principalmente en los pacientes diabéticos que para este estudio constituyen la mayoría de la población, se encontró que el 57% de los pacientes diabéticos estudiados están colonizados por *Candida* spp. esto concuerda con estudios realizados por Mlinaric y colaboradores, con 509 pacientes diabéticos, en los cuales reportaron una colonización de 58,7%, por este microorganismo, semejante a los que se evidenciaron en el presente trabajo [105].

Al-Attas y colegas, en su estudio con 150 pacientes diabéticos dentro de los cuales reportaron una prevalencia de colonización mayor para los pacientes diabéticos con 33,3% [26]. Por otro lado, Duque y colaboradores en 200 pacientes diabéticos, encontraron que el 48% fueron positivas para *Candida* spp.[12]. Goswami y colegas, en su investigación encontraron que el 67,5% fueron positivos para *Candida* spp. en los pacientes diabéticos [106] .

Aunque es motivo de controversia, si la diabetes es un factor de riesgo para desarrollar infección [26, 107]. Se puede considerar un desorden en el metabolismo de la glucosa, algunos aspectos de la inmunidad se pueden ver afectados en estos pacientes y podría ser atribuido al deterioro en el sistema inmune, caracterizado por la afectación en la función de los leucocitos polimorfonucleares, la adhesión leucocitaria, la quimiotaxis y fagocitosis. El aumento en las altas concentraciones de glucosa y un bajo nivel de lactato que favorece el crecimiento de *Candida* spp. [73, 105].

Se encontró que la prevalencia de *C. no albicans* fue mayor que la *C. albicans* (96% y 4%) respectivamente, observándose a *C. parapsilosis* en un 34,4% como

el agente etiológico que ocupa el primer lugar. Mlinaric y colaboradores, hallaron en su investigación a esta especie en un 38,1%; seguida de *C. albicans* con 5,5% [105]. *C. parapsilosis* constituye la flora principal en la zona interdigital de los pies, resultados corroborados en la presente tesis [105].

Las levaduras colonizantes encontradas en los pies mostraron altos valores de susceptibilidad a fluconazol con un 90%, resultados parecidos fueron reportados por Duque y colaboradores en el año de 2012, ellos encontraron porcentaje cercanos con un 97% en cepas susceptibles a fluconazol colonizantes en pacientes diabéticos [108].

En nuestro estudio, *C. parapsilosis* fue la especie más abundante y se obtuvo una susceptibilidad de 100% frente a fluconazol, estudios realizados por Alburqueque y colegas, también hallaron una susceptibilidad de 100% para esta especie [109]. Por otra parte, Torres y colegas, evaluaron la sensibilidad frente a fluconazol en *Candida* spp. y obtuvieron una sensibilidad del 90% [40].

En la literatura, la mayor parte de la resistencia a fluconazol, por parte de *Candida* spp. es característica de *C. krusei* y *C. glabrata*. Por lo tanto, *C. krusei* se considera una especie con resistencia intrínseca y no se hace tratamiento con fluconazol. Para *C. glabrata* resultó SDD para una concentración de ≤ 32 $\mu\text{g/mL}$ con un (100%). Esta investigación se caracterizó por presentar un buen patrón de susceptibilidad a fluconazol, siendo importante como guía para poder ofrecer un tratamiento antifúngico oportuno y adecuado.

En la identificación presuntiva en el medio CHROMagar™ *Candida* fue de mucha utilidad para el reconocimiento temprano de las diferentes *Candida* spp. especialmente para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *Candida* spp. el cual mostro ser útil para cada una de las especies que posteriormente se confirmaron por PCR multiplex, también es importante resaltar que este medio no diferencia entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* esto coincide con estudios realizados por

Yurvesoy y colegas, quienes también utilizaron este medio para la identificación presuntiva de *Candida* spp. [77]. Otros autores como Suarez y colegas, también lo confirman realizando esta prueba en 107 aislados y habían sido previamente identificadas el cual presento alta concordancia para *C. albicans* y/o *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *Candida* spp. [110].

Se han realizados varios estudios, acerca de la colonización por *Candida* spp. en pacientes diabéticos, no se halló diferencias significativas, entre los niveles de hemoglobina glicosilada y colonización de *Candida* spp., aunque es evidente la colonización y otros autores han reportado que un mal control de la glicemia, predispone a infección por *Candida* spp. en los pacientes diabéticos [17]. Sin embargo, Manfredi y colaboradores mencionan que el estado de portador de *Candida* es independiente, al nivel de hemoglobina glicosilada [111].

Tampoco se halló diferencias significativas entre edad y colonización; Darwazeh y colegas en su estudio de colonización en pacientes diabéticos, no obtuvieron diferencias significativas con respecto a edad, los niveles de hemoglobina glicosilada y/o colonización por *Candida* spp. en ninguno de los dos grupos, resultados que también confirman nuestro hallazgo [112]. Mlinaric y colaboradores, no hallaron diferencia significativa en su estudio ($p= 0,344$), resultados parecidos a estos ($P= 0,341$) [105].

Otro dato que se analizó fue la susceptibilidad a fluconazol, frente a la edad de los pacientes y no se observó diferencias entre los dos rangos de edad, sin embargo; se observó una alta susceptibilidad en ambos grupos. Pema y colegas cuando analizaron la susceptibilidad a fluconazol, no presenciaron diferencia entre los dos rangos de edades, menores y mayores de 65 de años, hallazgos que concuerdan con este estudio [113].

En una revisión bibliográfica sobre diabetes e hipertensión, Crespo y colegas, hallaron el 53,2% con hipertensión arterial en un grupo de pacientes diabéticos, resultados aproximados en este estudio con un 41,3%. Por lo que, la HTA está asociada a los pacientes diabéticos, observándose en una mayor proporción en este grupo de pacientes que en la población general. La DM y la HTA son factores de riesgos en la enfermedad vascular y diversos estudios han confirmado que la HTA es un componente agravante en el paciente diabético [114].

VII. CONCLUSIONES

En este estudio se evidenció, un alto porcentaje de pacientes colonizados por *Candida* spp. El grupo que sobresalió fue *Candida* no *albicans*, especialmente *C. parapsilosis* en el grupo de pacientes diabéticos y no diabéticos.

En la identificación del medio CHROMagar™*Candida* demostró ser de gran ayuda para la identificación presuntiva de diferentes especies de *Candida* y las tonalidades del mismo, no permitieron el diagnóstico presuntivo de una u otra especie. La PCR multiplex, demostró ser altamente específica y sensible para *Candida* spp.

Al conocer los perfiles de susceptibilidad y la distribución de *Candida* spp. fue de gran importancia, gracias a la identificación de las especies que se encuentran colonizando a este grupo de pacientes, estos que pueden variar según el género, el área geográfica, el sitio anatómico, año y el factor de riesgo al cual este asociado.

El fluconazol es una adecuada opción antifúngica, en este trabajo se encontró una alta susceptibilidad sobre las cepas aisladas en este grupo de pacientes; demostrando adecuada actividad frente a las especies más importantes de *Candida* spp.

El constante cambio hacia la resistencia antimicótica es un riesgo, por lo que identificar las especies colonizantes en pies y conocer la susceptibilidad de estas especies, evita fracasos terapéuticos y su uso indiscriminado, es bueno conocer su epidemiología en esta área, debido que en la región caribe, no se han realizado trabajos en este grupo de pacientes, encaminados en este mismo sentido. Los resultados obtenidos muestran la importancia y la necesidad de identificar los aislamientos fúngicos y evaluar su patrón de susceptibilidad a los antifúngicos, con el fin de poder establecer las mejores alternativas para acceder a tratamientos con mayor grado de racionalidad.

VIII. ANEXOS



**ANEXO A
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**



FACULTAD DE MEDICINA

PROYECTO: Identificación molecular y evaluación de la susceptibilidad de *Candida* spp. colonizantes de pie en pacientes diabéticos de un grupo de promoción de la salud en Turbaco, Bolívar.

FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FECHA _____

DATOS PERSONALES

NOMBRE _____

D.I _____

Fecha de nacimiento _____

Edad _____ Sexo _____

Procedencia: Rural _____ Urbana _____

Estrato Socioeconómico 1 ___ 2 ___ 3 ___ 4 ___ 5 ___

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS- COMORBILIDADES

HTA _____	Adicción a drogas intravenosas _____
Diabetes Mellitus _____ <i>Controlada</i> _____	Alcoholismo _____
Último Nivel de HbA1C _____	VIH _____
IMC _____ Obesidad _____	Lupus _____
Anemia _____ Hematocrito _____ Hb _____	Malignidad en Quimioterapia _____
Hiperuricemia _____	Radioterapia _____
Síndrome de Cushing _____	Lesiones en mucosa oral _____
Vasculopatía/Neuropatía Periférica _____	Descripción de la lesión _____
Prótesis dental _____	Posible diagnóstico _____
Embarazo _____	Lesiones interdigitales _____
Tratamiento con Corticoides _____	Descripción de la lesión _____
Tratamiento con Citostáticos _____	Posible diagnóstico _____
Tratamiento con Antibióticos _____	
Inmunomoduladores _____	
Anticonceptivos _____	

REFERENCIAS

1. Moran, G.P., Coleman, D. C., Sullivan, D. J., *Candida albicans versus Candida dubliniensis: Why Is C. albicans More Pathogenic?* Int J Microbiol, 2012. 2012: p. 205921.
2. Lopez-Martinez, R., *Candidosis, a new challenge.* Clin Dermatol, 2010. 28(2): p. 178-84.
3. Grubb, S.E., Murdoch, C., Sudbery, P. E., Saville, S. P., Lopez-Ribot, J. L., Thornhill, M. H., *Candida albicans-endothelial cell interactions: a key step in the pathogenesis of systemic candidiasis.* Infect Immun, 2008. 76(10): p. 4370-7.
4. Ramirez, J., and De la Torre, *Evaluacion de los cebadores de los ITS3 e ITS4 para la detección de infecciones por Candida spp. en muestras de flujo vaginal y humor acuoso.* 2008.
5. Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., Hube, B., *Candida albicans proteinases and host/pathogen interactions.* Cell Microbiol, 2004. 6(10): p. 915-26.
6. De Luca, C., Guglielminetti, M., Ferrario, A., Calabr, M., Casari, E., *Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility.* New Microbiol, 2012. 35(4): p. 459-68.
7. Guzel, A.B., Ilkit, M., Akar, T., Burgut, R., Demir, S. C., *Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID Candida agar versus CHROMagar Candida for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species.* Med Mycol, 2010. 49(1): p. 16-25.
8. Kothavade, R.J., Kura, M. M., Valand, A. G., Panthaki, M. H., *Candida tropicalis: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole.* J Med Microbiol, 2010. 59(Pt 8): p. 873-80.
9. Parmeland, L., Gazon, M., Guerin, C., Argaud, L., Lehot, J. J., Bastien, O., Allaouchiche, B., Michallet, M., Picot, S., Bienvenu, A. L., *Candida albicans and non-Candida albicans fungemia in an institutional hospital during a decade.* Med Mycol, 2012. 51(1): p. 33-7.
10. Trofa, D., Gacser, A., Nosanchuk, J. D., *Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen.* Clin Microbiol Rev, 2008. 21(4): p. 606-25.
11. Trevino-Rangel Rde, J., Gonzalez, J. G., Gonzalez, G. M., *Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the Candida parapsilosis species complex.* Med Mycol, 2012. 51(3): p. 331-5.
12. Duque, C., C.E., Rendón, J., Bedoya, J., Hernandez, O., *Frequency of Candida sp in the oral cavity of diabetics patients of Medellín.* Ciencias biomédicas, 2012. 10 (17)
13. Rodriguez, A.Z., Gomez Cde, B., Restrepo, C. A., Parra, H. H., Arteaga, M. A., Moreno, A. R. Marin, A. G., *[Susceptibility to fluconazole and voriconazole of Candida species isolated from intensive care units patients in Medellin, Colombia (2001-2007)].* Rev Iberoam Micol, 2010. 27(3): p. 125-9.

14. Reboli, J.G.a.A.C., *Anidulafungin: when and how? The clinician's view*. 2011.
15. Sandven, P., *Epidemiology of candidemia*. Rev Iberoam Micol, 2000. 17(3): p. 73-81.
16. Senet, J.M., *Risk factors and physiopathology of candidiasis*. Rev Iberoam Micol, 1997. 14(1): p. 6-13.
17. Soysa, N.S., Samaranyake, L. P., Ellepola, A. N., *Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis*. Diabet Med, 2006. 23(5): p. 455-9.
18. Vecchiarelli, A., Pericolini, E., Gabrielli, E., Pietrella, D., *New approaches in the development of a vaccine for mucosal candidiasis: progress and challenges*. Front Microbiol, 2012. 3: p. 294.
19. Yang, Y.L., Leaw, S. N., Wang, A. H., Chen, H. T., Cheng, W. T., Lo, H. J., *Characterization of yeasts colonizing in healthy individuals*. Med Mycol, 2010. 49(1): p. 103-6.
20. Jacobsen, I.D., Wilson, D., Wachtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., Hube, B., *Candida albicans dimorphism as a therapeutic target*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. 10(1): p. 85-93.
21. Plantinga, T.S., Johnson, M. D., Scott, W. K., Joosten, L. A., van der Meer, J. W., Perfect, J. R., Kullberg, B. J., Netea, M. G., *Human genetic susceptibility to Candida infections*. Med Mycol, 2012. 50(8): p. 785-94.
22. Conti, H.R., Gaffen, S. L., *Host responses to Candida albicans: Th17 cells and mucosal candidiasis*. Microbes Infect, 2010. 12(7): p. 518-27.
23. Antony, G., Saralaya, V., Gopalkrishna Bhat, K., Shalini Shenoy, M., Shivananda, P. G., *Effect of phenotypic switching on expression of virulence factors by Candida albicans causing candidiasis in diabetic patients*. Rev Iberoam Micol, 2009. 26(3): p. 202-5.
24. Gupta, S., Koirala, J., Khardori, R., Khardori, N., *Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia*. Infect Dis Clin North Am, 2007. 21(3): p. 617-38, vii.
25. Alayón. A.N., A.S.C., *Prevalencia de desórdenes del metabolismo de los glúcidos y perfil del diabético*. . SaludUninorte, 2006. 22(1): p. 20-28.
26. Al-Attas, S.A., Amro, S. O., *Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients*. Ann Saudi Med, 2010. 30(2): p. 101-8.
27. Geerlings, S.E., Hoepelman, A. I., *Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM)*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999. 26(3-4): p. 259-65.
28. Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., Nanjo, K., Sasaki, A., Seino, Y., Ito, C., Shima, K., Nonaka, K., Kadowaki, T., *Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2002. 55(1): p. 65-85.
29. Dorocka-Bobkowska, B., Zozulinska-Ziolkiewicz, D., Wierusz-Wysocka, B., Hedzelek, W., Szumala-Kakol, A., Budtz-Jorgensen, E., *Candida-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. 90(1): p. 81-6.

30. Bastos, A.S., Leite, A. R., Spin-Neto, R., Nassar, P. O., Massucato, E. M., Orrico, S. R., *Diabetes mellitus and oral mucosa alterations: prevalence and risk factors*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011. 92(1): p. 100-5.
31. Shilling, A.M., Raphael, J., *Diabetes, hyperglycemia, and infections*. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2008. 22(3): p. 519-35.
32. Knapp, S., *Diabetes and infection: is there a link?--A mini-review*. *Gerontology*, 2012. 59(2): p. 99-104.
33. Saba Fata., M.H., Saeed Modaghegh., Rabe'eh Faizi., Mohammad Javad Najafzadeh., Monavvar Afzalaghaee., Mohsen Ghasemi., Mohammad Mohammadian., Ali Naseri., Mojtaba Meshkat., Abdolmajid Fata., *Mycotic infections in diabetic foot ulcers in Emam Reza hospital, Mashhad, 2006-2008*. *Jundishapur J Microbiol.*, 2010. 2011; 4(1): 11-6.
34. Chanussot, C., Arenas, R., *[Interdigital and foot fungal infection in patients with onychomycosis]*. *Rev Iberoam Micol*, 2007. 24(2): p. 118-21.
35. Cuenca-Estrella, M., *[Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances]*. *Rev Esp Quimioter*, 2010. 23(4): p. 169-76.
36. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of Candida*. *Clin Microbiol Infect*, 2004. 10 Suppl 1: p. 11-23.
37. Chi, H.W., Yang, Y. S., Shang, S. T., Chen, K. H., Yeh, K. M., Chang, F. Y., Lin, J. C., *Candida albicans versus non-albicans bloodstream infections: the comparison of risk factors and outcome*. *J Microbiol Immunol Infect*, 2011. 44(5): p. 369-75.
38. Estrada-Barraza, D., Davalos Martinez, A., Flores-Padilla, L., Mendoza-De Elias, R., Sanchez-Vargas, L. O., *[Comparison between conventional methods, ChromAgar Candida(R) and PCR method for the identification of Candida species in clinical isolates]*. *Rev Iberoam Micol*, 2011. 28(1): p. 36-42.
39. Garnacho-Montero, J., Diaz-Martin, A., Ruiz-Perez De Piappon, M., Garcia-Cabrera, E., *[Invasive fungal infection in critically ill patients]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012. 30(6): p. 338-43.
40. Torres, D.N.A., M. Ca. Rondon, S. Ma, *[Fluconazole susceptibility of invasive Candida sp isolates as determined by three methods: Bogota - Colombia]*. *Rev Chilena Infectol*, 2009. 26(2): p. 135-43.
41. Carrillo-Munoz, A.J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A., Quindos, G., *Antifungal agents: mode of action in yeast cells*. *Rev Esp Quimioter*, 2006. 19(2): p. 130-9.
42. Gomez, J.G.-V., E. Hernandez, A. Espinosa, C. Ruiz, J., *[Nosocomial candidemia: new challenges of an emergent problem]*. *Rev Esp Quimioter*, 2010. 23(4): p. 158-68.
43. Bonifaz, *Micología Médica Básica*. MC Graw Hill, ed. T. edición. 2010.
44. Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., Kozik, A., *Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of Candida albicans, Cryptococcus*

- neoformans and Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol, 2009. 56(2): p. 211-24.
45. George, J.R., A. C., *Anidulafungin: when and how? The clinician's view*. Mycoses, 2011. 55(1): p. 36-44.
 46. Cornistein, W.M., A.Orellana, N.Capparelli, F. J.del Castillo, M., [*Candida: epidemiology and risk factors for non-albicans species*]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2012. 31(6): p. 380-4.
 47. Enache-Angoulvant, *Reglas de interpretación de las infecciones por Candida*. Act Bioquím clín Latinoam 2007. 41(4).
 48. Treviño-Rangel, J.G.G.-G., Elvira Garza- González, Gloria M. González., *Candida parapsilosis, una amenaza desafiante* ELSEVIER, 2012. 14(56)157-165.
 49. Yamamoto Akeme, R.d.P.c., Basili dias luciana, *Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospital cuiabá- Mato Grosso Brazil* Revista Iberoamericana de Micología, 2012. 29 (3)164-168.
 50. Aguirre Urizar, J.M., [*Oral candidiasis*]. Rev Iberoam Micol, 2002. 19(1): p. 17-21.
 51. Serrano, R., Gimeno, A.,Plumed, L.,Peman, J.,Alvarez, B.,Plazas, J.,Caturla, J., [*Epidemiological profile and sensitivity pattern of isolates causing invasive fungal infection vs. colonizing isolates in non-neutropenic critically ill patients*]. Rev Iberoam Micol, 2012. 30(1): p. 14-20.
 52. Shibata, N., Kobayashi, H.,Suzuki, S., *Immunochemistry of pathogenic yeast, Candida species, focusing on mannan*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2012. 88(6): p. 250-65.
 53. Hernández-Hernández F, I.C.-M.E., Manzano-G. P; López-Alvarez,Bazán-Mora, López-Martínez, R, *Frequency of mycoses in immunosuppressed patients in a regional hospital in Mexico City*. 2003. 45 N (6)
 54. Cannon, R.D., Chaffin, W. L., *Oral colonization by Candida albicans*. Crit Rev Oral Biol Med, 1999. 10(3): p. 359-83.
 55. Lewis, R.E., Viale, P.,Kontoyiannis, D. P., *The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to Candida*. Virulence, 2012. 3(4): p. 368-76.
 56. Naglik, J.R., Challacombe, S. J.,Hube, B., *Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. 67(3): p. 400-28, table of contents.
 57. Treviño-Rangel, G.J., Garza Gonzáles,Gonzáles gloria, *Candida parasilopsis, una amenaza desafiante*. ELSEVIER, 2012. 14(56):157-165.
 58. Willis, A.M., Coulter, W. A.,Fulton, C. R.,Hayes, J. R.,Bell, P. M.,Lamey, P. J., *The influence of antifungal drugs on virulence properties of Candida albicans in patients with diabetes mellitus*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001. 91(3): p. 317-21.
 59. Ghalehnoo, Z.R., Rashki, A.,Najimi, M.Dominguez, A., *The role of diclofenac sodium in the dimorphic transition in Candida albicans*. Microb Pathog, 2009. 48(3-4): p. 110-5.

60. Ramesh, N., Priyadharsini, M., Sumathi, C. S., Balasubramanian, V., Hemapriya, J., Kannan, R., *Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of Candida Sp. Isolated from HIV and TB Patients*. Indian J Microbiol, 2012. 51(3): p. 273-8.
61. Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Ghannoum, M. A., *Comparison of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces*. Infect Immun, 2002. 70(2): p. 878-88.
62. Almeida, R.S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., Filler, S. G., Hube, B., *the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of Candida albicans mediates iron acquisition from host ferritin*. PLoS Pathog, 2008. 4(11): p. e1000217.
63. Naglik, J.R., S.J. Challacombe, and B. Hube, *Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. 67(3): p. 400-28, table of contents.
64. Mojazi Amiri, H., Frandah, W., Colmer-Hamood, J., Raj, R., Nugent, K., *Risk factors of Candida colonization in the oropharynx of patients admitted to an intensive care unit*. J Mycol Med, 2013. 22(4): p. 301-7.
65. Miranda, L.N., van der Heijden, I. M., Costa, S. F., Sousa, A. P., Sienna, R. A., Gobara, S., Santos, C. R., Lobo, R. D., Pessoa, V. P., Jr., Levin, A. S., *Candida colonisation as a source for candidaemia*. J Hosp Infect, 2009. 72(1): p. 9-16.
66. Mayer, F.L., Wilson, D., Jacobsen, I. D., Miramon, P., Grosse, K., Hube, B., *The novel Candida albicans transporter Dur31 Is a multi-stage pathogenicity factor*. PLoS Pathog, 2012. 8(3): p. e1002592.
67. Maurya, V., Srivastava, A., Mishra, J., Gaiind, R., Marak, R. S., Tripathi, A. K., Singh, M., Venkatesh, V., *Oropharyngeal candidiasis and Candida colonization in HIV positive patients in northern India*. J Infect Dev Ctries, 2013. 7(8): p. 608-13.
68. Sitheequ, M.A. and L.P. Samaranayake, *Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia)*. Crit Rev Oral Biol Med, 2003. 14(4): p. 253-67.
69. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2009. 32 Suppl 1: p. S62-7.
70. Spijkerman, A.M., Dekker, J. M., Nijpels, G., Adriaanse, M. C., Kostense, P. J., Ruwaard, D., Stehouwer, C. D., Bouter, L. M., Heine, R. J., *Microvascular complications at time of diagnosis of type 2 diabetes are similar among diabetic patients detected by targeted screening and patients newly diagnosed in general practice: the hoorn screening study*. Diabetes Care, 2003. 26(9): p. 2604-8.
71. Micheal J. Fowler, *Microvascular and Macrovascular complications of diabetes*. Clinical Diabetes, 2008. 26, number 2.
72. Michael J. Fowler, *Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes*. 2008. Clinical Diabetes • Volume 26, number 2, 2008.

73. Casqueiro, J., Alves, C., *Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis*. Indian J Endocrinol Metab, 2012. 16 Suppl 1: p. S27-36.
74. salud, O.m.d.l., *Diabetes Mellitus*. 2012.
75. Yucesoy, M., Marol, S., *Performance of CHROMAGAR candida and BIGGY agar for identification of yeast species*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2003. 2: p. 8.
76. Linares, M.J.S., F, *Identificación de levaduras*. Revista Iberoamericana de Micología, 2007.
77. Garcia-Martos, P., Garcia-Agudo, R.,Hernandez-Molina, J. M.,Marin, P.,Tallero, E.,Mira, J., *[Identification of yeasts of clinical interest on CHROMagar Candida culture medium.]*. Rev Iberoam Micol, 1998. 15(3): p. 131-5.
78. Orbera-Raton, T., *[Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest]*. Rev Iberoam Micol, 2004. 21(1): p. 15-9.
79. Carvalho, A., Costa-De-Oliveira, S.,Martins, M. L.,Pina-Vaz, C.,Rodrigues, A. G.,Ludovico, P.,Rodrigues, F., *Multiplex PCR identification of eight clinically relevant Candida species*. Med Mycol, 2007. 45(7): p. 619-27.
80. Espinosa, L., *Guía práctica sobre la técnica de PCR*. 2012.
81. Vijayakumar, R., Giri, S.,Kindo, A. J., *Molecular species identification of Candida from blood samples of intensive care unit patients by polymerase chain reaction - restricted fragment length polymorphism*. J Lab Physicians, 2012. 4(1): p. 1-4.
82. Mirhendi, H., Makimura, K.,Khoramizadeh, M.,Yamaguchi, H., *A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species*. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2006. 47(3): p. 225-9.
83. Mahmoudi Rad, M., Zafarghandi, ASH,Amel Zabihi, M.,Tavallae, M.,Mirdamadi, Y., *Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2012. 2012: p. 872169.
84. Ruiz-Camps, I., Cuenca-Estrella, M., *[Antifungals for systemic use]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009. 27(6): p. 353-62.
85. Marotta, F., Tiboni, G. M., *Molecular aspects of azoles-induced teratogenesis*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2010. 6(4): p. 461-82.
86. Díaz, A., Gárces.C, *Current use of triazole antifungal agents in children*. elsevier.es, 2012.16(Supl 3): 82-93.
87. Sanglard, D., *Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2002. 20(9): p. 462-9; quiz 470, 479.
88. Ghannoum, M.A., Rice, L. B., *Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*. Clin Microbiol Rev, 1999. 12(4): p. 501-17.
89. Espinel-Ingroff, A., *Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi*. Rev Iberoam Micol, 2008. 25(2): p. 101-6.
90. Pfaller, M.A., *Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment*. Am J Med, 2012. 125(1 Suppl): p. S3-13.

91. Tapia, P.C., [An update on antifungal susceptibility testing]. Rev Chilena Infectol, 2009. 26(2): p. 144-50.
92. Canton L., M.E., Espinel A., *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. Rev Iberoamericana de Micología 2007.
93. Pfaller, M.A., Diekema, D. J., *Progress in antifungal susceptibility testing of Candida spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012*. J Clin Microbiol, 2010. 50(9): p. 2846-56.
94. Cuenca-Estrella.M, G.I., Martín., Pemán G., Pontón J.,Rodríguez T., *Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos*. 2006.
95. Cercenado, E., Cantón.,R., *Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos* 2006.
96. Leclercq, R., Canton, R.,Brown, D. F.Giske, C. G.,Heisig, P.,MacGowan, A. P.,Mouton, J. W.,Nordmann, P.,Rodloff, A. C.,Rossolini, G. M.,Soussy, C. J.,Steinbakk, M.,Winstanley, T. G.,Kahlmete G., *EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing*. Clin Microbiol Infect, 2011. 19(2): p. 141-60.
97. Cuenca-Estrella, M., Arendrup, M. C.,Chryssanthou, E.,Dannaoui, E.,Lass-Florl, C.,Sandven, P.,Velegraki, A.,Rodriguez-Tudela, J. L., *Multicentre determination of quality control strains and quality control ranges for antifungal susceptibility testing of yeasts and filamentous fungi using the methods of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST)*. Clin Microbiol Infect, 2007. 13(10): p. 1018-22.
98. J. L. Rodriguez-Tudela, M.C.A., S. Arian., F. Barchies., J. Bille, E, Chryssanthou., M. Cuenca-Estrella, *Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para hongos filamentosos formadores de conidias* 2012.
99. Cuenca E. M, G.I., Martín E., Pemán J., Pontón J.,Rodríguez J, *DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS MICOSIS Y ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS*. 2006.
100. Liguori, G., Galle, F.,Lucariello, A.,Di Onofrio, V.,Albano, L.,Mazzarella, G.,D'Amora, M.,Rossano, F., *Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for Candida spp. identification*. New Microbiol, 2010. 33(1): p. 63-7.
101. CLSI, *M27-S4, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Fourth Informational Supplement*. Clinical and Laboratory Standards Committe Institute, 2012.
102. Kiraz, N., Dag, I.,Oz, Y.,Yamac, M.,Kiremitci, A.,Kasifoglu, N., *Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against Candida glabrata*. J Microbiol Methods, 2010. 82(2): p. 136-40.

103. CLSI, *M27 A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test of Yeasts*. Clinical and Laboratory Standards Committee 2008.
104. Millar, B.C., Jiru, X., Moore, J. E., Earle, J. A., *A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material*. J Microbiol Methods, 2000. 42(2): p. 139-47.
105. Mlinaric-Missoni, E., S. Kalenic, and V. Vazic-Babic, *Species distribution and frequency of isolation of yeasts and dermatophytes from toe webs of diabetic patients*. Acta Dermatovenerol Croat, 2005. 13(2): p. 85-92.
106. Goswami, D., Goswami, R., Banerjee, U., Dadhwal, V., Miglani, S., Lattif, A. A., Kochupillai, N., *Pattern of Candida species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy*. J Infect, 2006. 52(2): p. 111-7.
107. Joshi, N., Caputo, G. M., Weitekamp, M. R., Karcmer, A. W., *Infections in patients with diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1999. 341(25): p. 1906-12.
108. Duque, C., C.E., Rendon, J., Bedoya, J., Hernandez, O., *Frecuencia de portadores de Candida sp en cavidad oral de pacientes diabéticos de Medellín*. Ciencias Biomedicas, 2012. 10 N° 17.
109. Albuquerque, C., G. Hermosilla, and C. Tapia, *[Species distribution and fluconazole susceptibility of yeasts of genus Candida isolated from hospitalized and ambulatory patients]*. Rev Chilena Infectol, 2009. 26(5): p. 435-9.
110. Alfonso, C., Lopez, M., Arechavala, A., Perrone Mdel, C., Guelfand, L., Bianchi, M., *[Presumptive identification of Candida spp. and other clinically important yeasts: usefulness of Brilliance Candida Agar]*. Rev Iberoam Micol, 2010. 27(2): p. 90-3.
111. Manfredi, M., McCullough, M. J., Al-Karaawi, Z. M., Hurel, S. J., Porter, S. R., *The isolation, identification and molecular analysis of Candida spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus*. Oral Microbiol Immunol, 2002. 17(3): p. 181-5.
112. Darwazeh, A.M., Lamey, P. J., Samaranayake, L. P., MacFarlane, T. W., Fisher, B. M., Macrury, S. M., MacCuish, A. C., *The relationship between colonisation, secretor status and in-vitro adhesion of Candida albicans to buccal epithelial cells from diabetics*. J Med Microbiol, 1990. 33(1): p. 43-9.
113. Peman, J., Canton, E., Minana, J. J., Florez, J. A., Echeverria, J., Ortega, D. N., Alarcon, J. M., Fontanals, D., Sard, B. G., Moreno, B. B., Torroba, L., Ayats, J., Perez, M. A., Fernandez, M. A., Reus, F. S., Natal, I. F., Garcia, G. R., Ezpeleta, G., Martin-Mazuelos, E., Iglesias, I., Rezusta, A., de Ocariz, I. R., Nieto, A. G., *[Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study]*. Rev Iberoam Micol, 2011. 28(2): p. 91-9.
114. Crespo Mojena, N., Martinez Hernandez, Anabel, Rosales Gonzalez, Ernesto, Crespo Valdas, Nelson, Garcia Roura, Juan, *Diabetes mellitus e hipertensión: Estudio en el nivel primario de salud*. Revista Cubana de Medicina General Integral, 2002. 18: p. 331-335.

