

Candida glabrata: un oportunista emergente en vulvovaginitis

Rafael Buitrón García-Figueroa,* Javier Araiza-Santibáñez,**
Erich Basurto-Kuba,*** Alejandro Bonifaz-Trujillo***

Resumen

Introducción: El género *Candida* comprende varias especies; en años recientes algunas como *Candida glabrata* ha incrementado su frecuencia con trascendencia clínica.

Material y métodos: Se realizó un estudio para determinar la frecuencia de *Candida glabrata* en 468 pacientes con sintomatología clínica para candidosis vulvovaginal, así como la sensibilidad de la misma a fluconazol por métodos de difusión en agar con sensidiscos y microdilución en caldo.

Resultados: La frecuencia para esta especie fue de 12.6 %. La resistencia de *Candida glabrata* al tratamiento con fluconazol se corroboró en este estudio: 68.2 % de las cepas fue resistente en pruebas de placas (sensidiscos) y 51.2 % en prueba de microdilución en caldo (método NCLSI), con una concentración mínima inhibitoria de 16 µg/ml.

Conclusiones: La frecuencia de *Candida glabrata* se ha incrementado y presenta resistencia a los tratamientos habituales, lo que influye en la persistencia y recurrencia de infecciones genitales y sistémicas.

Palabras clave: Candidiasis, *Candida glabrata*, resistencia, vulvovaginitis.

Summary

Background: *Candida* genus has various species. The incidence of *C. glabrata* has presented itself with more frequency over the past years with clinical importance.

Methods: A case study was made to determine the frequency of *C. glabrata* in 468 patients who presented clinical symptomatology for vulvovaginal candidiasis and the *in vitro* response for fluconazole using two methods: diffusion in agar plates and microdilution in liquid medium [NCLSI (NCCLS) method].

Results: The frequency for this specie was 12.6%, almost double the frequency observed 10 years ago. The resistance of *C. glabrata* to fluconazole treatment was confirmed in this study, representing 68.2% resistance in all the stains on test plates and 51.2% on NCLSI method with a MIC of 16 µg/ml.

Conclusions: The frequency of *Candida glabrata* has increased over the past years. It presents resistance to usual treatments, which promotes the persistency and recurrence of genital and systemic infections.

Key words: Candidiasis, *Candida glabrata*, resistance, vulvovaginitis.

Introducción

Las candidiasis o infecciones por el género *Candida* han aumentado su incidencia en las tres últimas décadas, constituyendo actualmente una causa importante de morbilidad y mortalidad, especialmente las hematógenas. Aunque *Candida albicans* continúa aislando como la especie más frecuente, se ha descripto un significativo aumento de otras, que se han comprendido

dentro del grupo denominado *Candida no albicans*, entre las cuales las más importantes son *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*.^{1,2} Esta última es una especie ubíqua que se aísla de las cavidades oral y vaginal de individuos sanos y en las manos de personal sanitario.¹ La colonización por esta levadura se incrementa con la prolongación de la hospitalización y el deterioro clínico del enfermo, considerándose el primer paso de muchas infecciones.

C. glabrata se aísla cada vez con mayor frecuencia de muestras clínicas como agente de candidosis vaginal o produciendo micosis sistémicas graves y candidemia en los enfermos críticos, inmunodeprimidos y con neoplasias hematológicas o sólidas.³⁻⁶ En las mujeres afectadas de vaginitis con flujo aumentado, *C. glabrata* corresponde a la especie cultivada con mayor frecuencia después de *C. albicans*, variando según las series de 0.6 a 36 %, con una frecuencia media entre 15 y 20 %.⁷⁻¹⁰ También se han descrito algunos brotes epidémicos en unidades de cuidados intensivos, considerados como infecciones nosocomiales.

En un estudio realizado en Madrid por Muriel y colaboradores¹¹ en 2000, a partir de 108 cepas procedentes de muestras

* Servicio de Ginecología y Obstetricia.

** Departamento de Micología.

*** Servicio de Cirugía General, Unidad 307.

Hospital General de México OD, México, D. F.
Trabajo de ingreso a la Academia Mexicana de Cirugía.

Solicitud de sobretiros:

Rafael Buitrón García-Figueroa. Frontera 166-D, Col Roma, Del. Cuauhtémoc, 06700 México, D. F. E-mail: bugr03@prodigy.net.mx

Recibido para publicación: 16-04-2009

Aceptado para publicación: 22-09-2009

ginecológicas, 138 de la unidad de cuidados intensivos neonatales y 71 de la unidad de cuidados intensivos de adultos, *C. glabrata* fue identificada en 19.4 % de las muestras vaginales (consideradas infecciones comunitarias), en 27.5 % de las muestras neonatales y en 29.6 % de la unidad de cuidados intensivos de adultos. Estos datos demuestran el carácter predominantemente nosocomial de esta especie.^{1,3,7,12}

Debido a la importancia y el aumento de candidiasis vulvovaginal, es importante conocer la etiología específica, con un enfoque particular en el aislamiento de *C. glabrata*, para tener una idea precisa de su frecuencia en México, así como su comportamiento terapéutico. Nuestro principal objetivo en este estudio fue establecer la frecuencia de *C. glabrata* en cultivos de secreción vaginal en pacientes con síntomas y signos de candidosis vulvovaginal en tres centros hospitalarios de la ciudad de México, y evaluar la susceptibilidad de las cepas de *C. glabrata* frente al fluconazol, debido a que es uno de los azoles más utilizados para tratamiento de candidosis.

Material y métodos

Se estudiaron 468 pacientes de tres centros hospitalarios: Servicio de Ginecología del Hospital General de México; Hospital de la Mujer de la ciudad de México y Servicio de Ginecología del Hospital 20 de Noviembre del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. Previa explicación detallada del estudio, se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente para participar en la investigación. Las pacientes incorporadas tuvieron edad igual o mayor a 18 años y con signos y síntomas de candidiasis vulvovaginal: eritema, edema, leucorrea, excoriaciones, prurito y dispareunia.

A cada una de las pacientes se les realizó historia clínica completa, examen ginecológico, se les tomaron muestras vaginales para examen directo con KOH a 10 %, para observación de las siguientes imágenes: pseudohifas, pseudohifas más blastoconidios y únicamente blastoconidios; con el criterio positivo para todas las imágenes micológicas descritas y considerándose como flora habitual la presencia de solamente levaduras (blastoconidios) en menos de dos por campo. Las muestras para cultivo micológico fueron obtenidas por hisopos de la secreción y sembradas en seis medios: dos en Sabouraud dextrosa agar, dos en Sabouraud dextrosa con antibióticos y dos en Biggy-Nickerson, incubadas por siete días a 28 °C; se observaron macroscópica y microscópicamente para corroborar la presencia de levaduras.

La identificación de las especies aisladas se hizo mediante los siguientes métodos: producción de tubos germinativos en suero humano a 37 °C durante tres horas; formación de pseudohifas y clamidoconidios en medios harina de maíz + tween 80; zimograma en medio comercial de API-yeast-20. Una vez identificadas las especies se determinó sensibilidad antifúngica cuantitativa a fluconazol por medio de sensidiscos y cuantitativa por

el método de microdilución en caldo según protocolo de NCCLS (NCCLS).

Se cumplieron los requisitos éticos y legales de conformidad con las recomendaciones de la Declaración de Helsinki, enmendada en Hong Kong en 1989.

Los resultados se analizaron estadísticamente con medidas de tendencia central, dispersión y porcentaje.

Resultados

Se incorporaron al estudio 468 mujeres con diagnóstico clínico de candidiasis genital, con los siguientes datos generales: edad promedio de 35.96 ± 9.8 años; edad mínima 19 años y máxima 69. El 79.6 % de los pacientes era de raza mestiza y 2.4 % caucásica.

Del total de pacientes estudiadas (468), 227 (48.50 %) refirieron haber tenido episodios similares en los últimos 12 meses; las manifestaciones clínicas que presentaron las pacientes en el episodio actual fue prurito en 425 (90.8 %), eritema en 345 (69.4 %), leucorrea en 451 (96 %), edema en 269 (57.4 %), excoriaciones en 143 (30.5 %) y dispareunia en 275 (58.7 %) casos.

Del total de casos (468), 143 se consideraron negativos, por lo que el universo de estudio fue de 325 casos que presentaron una imagen parasitaria y cultivo positivo con la identificación de la especie. Los resultados micológicos se presentan en el cuadro I. Es importante resaltar que de los 143 casos negativos, 95 presentaron exámenes directos y cultivos negativos, mientras que 48 no dieron imágenes parasitarias pero cultivos positivos con pocas colonias, que se consideraron parte de la flora habitual y correspondieron a 48/468 (10.2 %) de todas las pacientes incluidas.

En el cuadro I se presentan los diferentes resultados micológicos; resalta que 41/325 correspondieron a *C. glabrata* con 12.6 %. Con las cepas de *C. glabrata* obtenidas se realizaron pruebas de sensibilidad a fluconazol por el método de sensidiscos (para obtener puntos de corte en resistencia o susceptibilidad) y por el método de microdilución en caldo según protocolo de NCCLS (NCCLS, para identificar cepas resistentes según la concentración mínima inhibitoria [CMI] obtenida). De estas cepas, 28/41

Cuadro I. Resultado del examen directo y cultivo micológico (n = 325)

Total	Examen directo	Especie	%
220	S + B	<i>C. albicans</i>	67.7
52	S + B	<i>C. tropicalis</i>	16.0
41	B ^{3y4+}	<i>C. glabrata</i>	12.6
8	S + B	<i>C. krusei</i>	2.5
4	S + B	<i>C. parapsilosis</i>	1.2

S = pseudohifas, B = blastoconidios, B^{3y4+} = blastoconidios abundantes 3 y 4 cruces por campo

(68.2 %) mostraron resistencia a la prueba de sensibilidad al fluconazol en pruebas de placas (sensidiscos), ya que no se observaban halos de inhibición visibles a la mayor concentración, que fue de 32 µg, y en 21/41 (51.2 %) en pruebas de microdilución en caldo, con una media de 16 µg/ml.

Discusión

Un estudio epidemiológico realizado en 1996 a partir de un número alto de episodios de candidemias en enfermos neoplásicos, permitió observar que seis de cada 1000 ingresos presentaban un episodio de candidemia, y que 79 % correspondió a enfermos de la unidad de cuidados intensivos. En este estudio se comprobó el aumento de la incidencia de las especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* y se comprobó que *C. glabrata* ocasionaba 11 % de las sepsis, relacionándose principalmente con catéter venoso central y profilaxis con fluconazol. En los pacientes con sida, la candidemia es una complicación poco frecuente y en general, tardía; aunque *C. albicans* suele ser la especie más frecuente, *C. glabrata* también puede ser identificada como agente causal.^{7,12,13}

Esta especie se aísla cada vez con mayor frecuencia en casos de candiduria, especialmente en los pacientes diabéticos, en quienes reciben tratamiento antibiótico múltiple o son portadores de una sonda urinaria. En un estudio retrospectivo para valorar los factores de riesgo para presentar candiduria nosocomial por *C. glabrata* y *C. albicans*, se comprobó que el uso de fluconazol y quinolonas se asociaba específicamente con candiduria por *C. glabrata*. Se cuestiona si la resistencia a este antifúngico, mostrada por un alto número de cepas, es la que ocasiona el reemplazo de *C. albicans* o se trata de un fenómeno independiente. Por estas razones, esta levadura es considerada un oportunista emergente en la mayoría de las publicaciones.⁵ En el cuadro II se especifican los factores más destacados relacionados con la epidemiología de las infecciones por *C. glabrata*.⁵

Situación taxonómica

Candida glabrata pertenece a la clase *Ascomycetes*, orden-forma *Saccharomycetales*, familia-forma *Saccharomycete*, género *Candida*, especie *glabrata*. La creación del género *Torulopsis*, distinto de *Candida*, fue debida principalmente a que, a diferencia de ese último, no presenta blastoconidios capaces de formar pseudomicelio o hifas verdaderas, ni en los tejidos que parasita ni en los cultivos. Actualmente estas características se consideran insuficientes para efectuar una distinción en dos géneros y, desde 1978 se ha propuesto su integración en el género *Candida*, aunque siguen considerándose como sinónimos.

La estructura antigénica de *C. glabrata* ha sido determinada por varios autores, demostrándose que existe cierto grado de reactividad cruzada con otras especies consideradas más virulentas como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guillermondi*, *C. kefyr* y *C. parapsilosis*. Sin embargo, se han descrito algunos componentes antigenicos característicos de esta especie, como el factor número 34, base del sistema de identificación comercializado con el nombre de Candida Check®.^{11,14,15}

Consideraciones fisiológicas

C. glabrata no asimila el inositol y no posee pigmento carotenoido. Es inhibida por la cicloheximida a 0.01 %. La temperatura máxima de crecimiento es de 43 a 45 °C y la temperatura óptima para las cepas de origen clínico es de 35 a 37 °C. Las características diferenciales se resumen en el cuadro III.

Possee 11 cromosomas y debido a su carácter haploide, se considera que *C. glabrata* tiene mayores posibilidades de presentar mutaciones que otras especies diploides como *C. albicans*.^{2,16}

En diversas publicaciones en las que se ha estudiado el aislamiento de *C. glabrata* de diferentes poblaciones y localizaciones, destaca la mayor frecuencia en los pacientes ancianos (27 %) y con estomatitis debida a prótesis dental (22 a 25 %). *C. glabrata* también se ha aislado en 5 a 25 % de las muestras de estómago

Cuadro II. Características de las infecciones por *C. glabrata*

• Infección comunitaria	Vaginitis
• Infección nosocomial	Enfermos inmunodeprimidos y debilitados ingresados en las unidades de cuidados intensivos
• Asociaciones	Frecuentes con otras levaduras
• Origen de la infección	Frecuentemente exógena
• Factores de riesgo de la infección sistémica	Sonda vesical (candiduria) Catéter vascular (candidemia) Antibioticoterapia de amplio espectro
• Factores específicos de riesgo	Administración previa de fluconazol Hospitalización prolongada

y en 5 a 30 % de las de origen ginecológico u obstétrico en mujeres sin vaginitis. Esta especie se aísla con muy baja frecuencia de la piel normal (1 a 2 %) y, por el contrario se ha cultivado hasta en 36 % de las muestras de orina procedentes de pacientes hospitalizados.^{3,4,11,14,15,17}

Factores de virulencia

La ausencia de algunos factores de virulencia como la producción de pseudohifas, consideradas estructuras que incrementan la adherencia y penetración del hongo en los tejidos, lleva a considerar que *C. glabrata* es menos virulenta que otras especies como *C. albicans* o *C. tropicalis*. Este hecho es cierto cuando se utilizan modelos experimentales en animales de laboratorio; sin embargo, existen evidencias que demuestran una rápida diseminación de las infecciones por aquélla en los enfermos inmunodeprimidos, en quienes también se produce elevada tasa de mortalidad. Aunque el conocimiento de los marcadores de virulencia en esta especie es escaso, algunas investigaciones han demostrado que *C. glabrata* genera proteinasas y que la hidrofobicidad de su superficie celular es similar a la de *C. albicans*, lo que asegura su capacidad de adherencia a las células del huésped.

Algunas alteraciones del huésped que contribuyen al desarrollo de las infecciones por esta especie son la disminución en los niveles de IgA secretora vaginal, una menor respuesta inflamatoria y, sobre todo, una disminución cuantitativa o cualitativa de los linfocitos T, hecho que explica su mayor frecuencia en los pacientes con sida, trasplantados y con neoplasias.^{5-6,18-20}

Resistencia *in vitro*

Los mecanismos moleculares de resistencia a los antifúngicos todavía son poco conocidos. En *C. glabrata* se ha podido de-

mostrar que la resistencia a los azoles se debe al incremento en la síntesis del ergosterol dependiente del citocromo P-450 y a la existencia de una bomba de flujo activa para el fluconazol. Cuando se habla de resistencia a los antifúngicos suelen mezclarse dos conceptos diferentes: por un lado, la ausencia de una respuesta clínica a las dosis terapéuticas del fármaco y, por otro, la presencia de CMI elevadas para el antifúngico. En el primero, la falta de respuesta terapéutica suele estar asociada al estado de inmunodepresión del enfermo o a biodisponibilidad insuficiente del fármaco. En el segundo, la resistencia puede ser primaria (innata) o secundaria (adquirida) al antifúngico administrado. Los resultados de las CMI pueden variar según el método utilizado para su determinación.

Candida glabrata es generalmente sensible a los derivados poliénicos, nistatina y anfotericina B. Sin embargo, desde la comercialización y el uso intensivo del fluconazol e itraconazol, se han descrito casos de resistencias *in vitro* a estos azoles y de falta de respuesta en enfermos con candidosis tratados con estos antifúngicos. Gran número de esos estudios se han realizado en pacientes seropositivos para el virus de la inmunodeficiencia humana, con candidosis orofaríngeas mixtas o exclusivas por *C. glabrata*. Las cepas de *C. glabrata* resistentes al fluconazol predominan entre los enfermos seropositivos para el virus de la inmunodeficiencia humana, principalmente los afectados de candidosis orofaríngea y esofágica, aunque se han encontrado cepas resistentes en vaginitis e infecciones sistémicas en pacientes críticos, con o sin neutropenia. Si bien se describen resistencias primarias al fluconazol, las más frecuentes son las adquiridas. El hecho de que *C. glabrata* sea una levadura haploide podría favorecer el desarrollo de resistencias secundarias. La aparición de resistencia cruzada con otros azoles como el itraconazol, ketoconazol y voriconazol no es infrecuente. Al contrario que otras levaduras del género, *C. glabrata* es por lo general muy sensible a 5-fluorocitosina.

Cuadro III. Características diferenciales de *C. albicans* y *C. glabrata*

Característica	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>
Blastoconidios	3-7x3-14 µm	2,5-4,5x4-6 µm
Pseudohifas	+	-
Clamidoconidios	+	-
Número de cromosomas	7-9, diploide	11, haploide
Asimilación de azúcares	G, S, M, T, Gal	G, T, A
Color en medios cromogénicos		
• CHROMagar®	Verde	Lila-púrpura
• Candida ID®	Azul	Blanco
Crecimiento en cicloheximida 0.1 %	+/-	-
Virulencia experimental	+++	+
Resistencia triazoles	+	+++

G = glucosa, S = sacarosa, M = maltosa, T = trehalosa, GAL = galactosa, A = arabinosa; + positivo, - negativo, +/- ocasional.

Utilizando el sistema Fungitest®, que valora las cepas en sensibles, intermedias y resistentes, se ha encontrado 17.6 % de cepas aisladas en infecciones vaginales comunitarias resistentes al fluconazol, mientras que en muestras de pacientes adultos ingresados en la unidad de cuidados intensivos, las resistencias eran de 21 % y en neonatología de 1 %. Para el itraconazol, las resistencias fueron superiores: 23.5, 26.3 y 1 %, respectivamente. En ningún caso se identificó resistencia a anfotericina B.¹¹ En una publicación anterior, los 13 aislados de *C. glabrata* analizados mostraron CMI > 16 µg/ml para fluconazol, y 12 de ellos presentaron para itraconazol CMI > 2 µg/ml. Todas las cepas fueron sensibles a anfotericina B, con CMI < 0.5 µg/ml. Para 5-fluorocitosina, las CMI presentaron un intervalo de < 0.06 a 0.125 µg/ml, confirmándose la gran sensibilidad de esta levadura a este antifúngico.¹⁸

El significado clínico de las resistencias *in vitro* de *C. glabrata* es un asunto debatido. Sin embargo, se considera que la resistencia contribuye al fallo terapéutico y a que el manejo de los enfermos infectados con cepas resistentes no sea satisfactorio. La próxima aparición de antifúngicos dirigidos contra diañas diferentes del ergosterol podría contribuir a mejorar el pronóstico de este tipo de infecciones.^{8-9,11,13,16,18,21-23}

El género *Candida* comprende varias especies predominando *C. albicans* y otras no *albicans*, de estas últimas en años recientes algunas se han incrementado como oportunistas con trascendencia clínica.^{6,8} Las especies diferentes a *C. albicans* son un grupo heterogéneo de más de 200 con diferencias biológicas, unas cuantas se asocian a infección humana, lo que se ha convertido en un verdadero desafío en el diagnóstico y tratamiento de la candidiasis.¹⁹ Hace 100 años, *C. albicans* se consideró la única especie de *Candida* de importancia médica, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guillermondi* fueron calificadas como oportunistas ocasionales.^{7,19} A partir de 1980, especies diferentes a *C. albicans* se han venido aislando a partir de procesos infecciosos, por lo que a la fecha se consideran oportunistas las siguientes especies: *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. lusitania*.^{8,19}

En general, la incidencia *C. glabrata* se ha venido incrementando en los últimos 40 años³ debido a diversos factores como el uso de nuevos tratamientos y procedimientos para las enfermedades neoplásicas y otras patologías, procedimientos invasivos para diagnóstico, uso extendido de antibióticos de amplio espectro, aparición del virus de la inmunodeficiencia humana y síndrome de inmunodeficiencia humana. En este estudio, la frecuencia para *C. glabrata* (12.6 %) duplica la informada en estudios similares hace 10 años² y coincide en el incremento en la frecuencia y resistencia al manejo con antimicóticos.

El fluconazol es uno de los agentes más utilizados en micosis superficiales y sistémicas. *C. glabrata* presenta la capacidad de desarrollar rápidamente resistencia a este medicamento.¹⁷ El estudio muestra un alto porcentaje de resistencia de *C. glabrata* al fluconazol (68.2 % en sensidiscos y 51.2 % en microdiluciones). La resistencia mostrada por *C. glabrata* está en relación con el

incremento de su frecuencia y la ha hecho un factor importante en procesos infecciosos nosocomiales de pacientes de las unidades de cuidados intensivos, lo que ha favorecido aumento en la incidencia de infecciones sistémicas causadas por *C. glabrata* en los últimos 10 años, así como un factor de persistencia y recurrencia en infecciones vulvovaginales.^{10,11,24} Los estudios de epidemiología hospitalaria han demostrado recientemente que *C. tropicalis* va siendo reemplazada por *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.²⁵

Los resultados muestran a *C. albicans* como responsable de 67.6 % casos y a *C. glabrata* de 12.6 %. Se considera que el uso extendido de azoles puede haber inducido el incremento en la incidencia por *C. glabrata*, ya que presenta *in vitro* una susceptibilidad muy limitada a estos productos. En Estados Unidos es la segunda especie aislada después de *C. albicans* como causa de candidiasis sistémica y candiduria. *C. glabrata* y *C. tropicalis* son las especies no *albicans* frecuentemente más recuperadas de vagina, cavidad oral y tracto gastrointestinal, a diferencia de *C. guillermondi* y *C. parapsilosis*, que colonizan más la piel.^{16,25}

En el presente estudio, las especies aisladas del género *Candida* más frecuentes relacionadas con vulvovaginitis fueron *C. albicans* 67.69 %, *C. glabrata* 12.6 % y *C. tropicalis* 16 %. Es importante establecer la correlación de recurrencia de episodios de candidiasis vulvovaginal y especies de *Candida* no *albicans*, por lo que debe realizarse en estos casos pruebas micológicas que permitan determinar la especie. Si los resultados indican *C. glabrata*, se justificará el tratamiento prolongado para erradicar el proceso micótico, o bien realizar pruebas de sensibilidad microbiológica para un tratamiento específico.

Conclusiones

En el presente estudio es posible apreciar un incremento importante de vulvovaginitis candidósica causada por *C. glabrata*, comparado con informes de años anteriores, por lo cual podemos considerar este cambio etiológico como emergente para esta especie; afortunadamente las técnicas disponibles para tipificación de esta especie son accesibles y la disponibilidad de pruebas para determinar susceptibilidad permiten de manera oportuna establecer cepas resistentes a fluconazol, ya que como puede observarse en los resultados, una de cada dos cepas aisladas de *C. glabrata* será resistente a este azol, en cuyo caso un cambio oportuno de esquema terapéutico evitará fracasos y la posible aparición de cepas resistentes.

Referencias

1. Bodey GP. Candidiasis. Pathogenesis, diagnosis, and treatment. 2nd ed. New York: Raven Press; 1993; pp. 1-420.
2. Bonifaz A. Cándidosis. Micología Médica Básica. Tercera edición. México: McGraw-Hill; 2009. pp. 301-329.

3. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. *Am J Med* 1991;91:868-898.
4. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS, et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. *Diag Microbiol Infect Dis* 1999;35:19-25.
5. Harris AD, Castro J, Sheppard DC, Carmeli Y, Samorai MH. Risk factors for nosocomial candiduria due to *Candida glabrata* and *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1999;29:236-238.
6. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:499-511.
7. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:462-478.
8. Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:287-291.
9. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 2000;30:662-678.
10. Buitrón R, Romero R, Bonifaz A. Estudio de especies *Candida* no albicans y su relación con candidiasis vulvovaginal recurrente. *Ginecol Obstet Mex* 2002;70:431-436.
11. Muriel MA, Vizcaíno MJ, Bilbao R, Herruzo N. Identificación de levaduras y sensibilidad in vitro a diversos antifúngicos. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2000;18:120-124.
12. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1997;24:1122-1128.
13. Saballs-Radresa P, Torres-Rodríguez JM, Salvadó M, Sales P, Gimeno-Bayón JL, Knobel H, et al. La candidemia en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Estudio retrospectivo de nueve casos. *Rev Iberoam Micol* 2000;17:2-5.
14. Shin JH, Nolte FS, Holloway BP, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35:1454-1459.
15. Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Lütticken R, Haase G. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalose-generated glucose. *J Clin Microbiol* 1999;37:202-205.
16. Odds F. *Candida* and Candidosis. A Review and Bibliography. 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 1988; pp. 7-15, 68-104.
17. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997;24: 235-247.
18. Torres-Rodríguez JM, Madrenys N, Jiménez T, Saballs P. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y el E-test. *Rev Iberoam Micol* 1997;14 :115-118.
19. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 1996;22:S89-S94.
20. Espinel-Ingrof A, Vázquez JA, Boikov D, Pfaller MA. Evaluation of DNA-based typing procedure for strain categorization of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:231-239.
21. Berrouane YF, Hollis RJ, Pfaller MA. Strain variation among and antifungal susceptibilities of isolates of *Candida krusei*. *J Clin Microbiol* 1996;34:1856-1858.
22. National Committee of Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. NCCLS Document M27-A. Villanova: NCCLS; 1997. pp. 17:16.
23. Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. Global antifungal surveillance group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36:215-223.
24. Abbas J, Bodey GP, Hanna HA, et al. *Candida krusei* fungemia: an escalating serious infection in immunocompromised hosts. *Arch Intern Med* 2000;160:2659-2664.
25. Anaissie E, Hachem R, K-Tin-U C, Stephens LC, Bodey GP. Experimental hematogenous candidiasis caused by *Candida krusei* and *Candida albicans*: species differences in pathogenicity. *Infect Immun* 1993;61:1268-1271.