



## ORIGINAL BREVE

# Susceptibilidad antifúngica y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y no *albicans* aisladas en un hospital de Chiclayo, Perú

Nelson Fredy Berrios-Estela<sup>1,a</sup> | Rosa Jhaqueline Chapoñan-Coronado<sup>1,a</sup> | Gianina LLontop-Bariandaran<sup>1,b</sup>   
| Roberto Ventura-Flores<sup>1,2,c</sup>

1. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Facultad de Ciencias Biológicas. Lambayeque, Perú.
2. Hospital Regional Lambayeque. Chiclayo, Perú.
- a. Bachiller en Biología
- b. Bióloga, Doctora en Microbiología
- c. Biólogo, Maestro en Microbiología Clínica

**Correspondencia:**

Roberto Ventura-Flores  
Correo: rventuraf@unprg.edu.pe

## Resumen

**Objetivo:** Determinar la susceptibilidad antifúngica y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y no *albicans* en muestras clínicas de un hospital de Chiclayo, Perú. **Material y métodos:** 60 aislamientos fueron identificados con pruebas morfofisiológicas, mientras que la producción de fosfolipasas se determinó empleando el método semicuantitativo en placa de agar Sabouraud dextrosa suplementado con yema de huevo y la susceptibilidad se realizó mediante el método de disco difusión con fluconazol y voriconazol. **Resultados:** el 95,5 % de *C. albicans* fue sensible a fluconazol y voriconazol mientras que *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* mostraron 100 % de sensibilidad para ambos azoles. 14 cepas de *C. albicans* fueron de mayor producción de fosfolipasa con 23,3 % mientras que la más baja fue *C. tropicalis* con 25 %. **Conclusiones:** hubo una alta sensibilidad al fluconazol y voriconazol en los aislamientos de especies de *Candida*. Mientras que el 100 % de *C. albicans* mostraron producción de fosfolipasas.

**Palabras clave:** *Candida albicans*; Candidemia; fosfolipasas; Resistencia Fúngica a Drogas (Fuente: DeCS BIREM)

## Antifungal susceptibility and phospholipase production in *Candida albicans* and non-*albicans* isolated in a hospital in Chiclayo, Peru

### Abstract

**Objective:** Determine the antifungal susceptibility and phospholipase production in *Candida albicans* and non-*albicans* in clinical samples from a hospital in Chiclayo, Peru. **Material and methods:** 60 isolates were identified with morphophysiological tests, while phospholipase production was determined using the semiquantitative method on Sabouraud dextrose agar plates supplemented with egg yolk, and susceptibility was performed using the disk diffusion method with fluconazole and voriconazole. **Results:** 95,5% of *C. albicans* were sensitive to fluconazole and voriconazole, while *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* showed 100% sensitivity to both azoles. 14 strains of *C. albicans* had the highest production of phospholipase with 23,3% while the lowest was *C. tropicalis* with 25%. **Conclusions:** there was a high sensitivity to fluconazole and voriconazole in the isolates of *Candida* species. While 100% of *C. albicans* showed phospholipase production.

**Key words:** *Candida albicans*; Candidemia; Phospholipases; Drug resistance, fungal (Source: MeSH-NLM)

## INTRODUCCIÓN

*Candida* es una levadura oportunista de distribución mundial que puede habitar el tracto genitourinario, mucocutánea, gastrointestinal, sistema urogenital y mucosa respiratoria<sup>(1,2)</sup>. La disbiosis fúngica o alteración de la microbiota se observa en enfermedades humanas que afectan a diferentes superficies como boca, intestino, vagina, piel y pulmones<sup>(3)</sup>, donde *Candida albicans* es más frecuente en 80 % aunque las *Candida*

no *albicans* son cada vez más frecuentes<sup>(4)</sup>. La composición de la microbiota está sustancialmente influenciada por la dieta, el sexo, la edad y la ubicación geográfica<sup>(5)</sup>; por tanto, la epidemiología de la candidemia varía según el paciente, sistema hospitalario asociado a factores de riesgo como uso de fármacos inmunosupresores, antibióticos y catéteres, especialmente en pacientes con enfermedades hematológicas, neutropenia y diabetes mellitus<sup>(6)</sup>.

La manifestación clínica en el paciente se manifiesta cuando se interrumpe el equilibrio del microbioma normal o cuando las defensas inmunológicas se ven comprometidas<sup>(7)</sup>, sumándose a estas los factores de virulencia propias de las especies de *Candida* como las proteasas y fosfolipasas que cumplen un papel importante en la invasión de los tejidos<sup>(8)</sup> manifestándose micosis superficiales hasta micosis diseminadas y mortales<sup>(9)</sup>. Además de lo mencionado, también se toma en cuenta la capacidad de las levaduras de presentar diferentes mecanismos de resistencia como la activación de bombas de expulsión, el estado respiratorio, cambios cualitativos de la enzima diana, cambios cuantitativos causados por la sobreexpresión de ERG11 y alteraciones en la composición de la pared celular que les permite sobrevivir en presencia de un antifúngico<sup>(10,11)</sup>.

Por otro lado, *Candida* spp. han desarrollado una serie de factores fisiológicos y genéticos para invadir y causar infección en el huésped<sup>(12)</sup>; entre ellos la positividad de la fosfolipasa que es mayor en aislamientos respiratorios que en muestras de sangre y orina<sup>(13)</sup>. Esta contribuye a la patogenicidad al igual que el cambio fenotípico de levaduras a hifas, factores de adhesión y formación de biopelículas<sup>(7)</sup>, produciendo elevada morbilidad y mortalidad en unidades críticas y en neonatos especialmente por *Candida no albicans* los mismos que tienen resistencia intrínseca a los azoles<sup>(14)</sup>.

Reportes previos dan cuenta que *C. albicans* fue sensible en 89,5 % y 93,7 % y los resistentes entre 6,3 % y 3,2 % a fluconazol y voriconazol respectivamente<sup>(1)</sup>; mientras que la susceptibilidad de *Candida no albicans* procedentes de pacientes de las unidades de cuidados intensivos encontraron una resistencia de 19,5 % y 21,7 % a los mismos azoles siendo los aislamientos: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*<sup>(15)</sup>.

Por ello, la presente investigación se desarrolló con el fin de determinar el perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en *C. albicans* y no *albicans*, y con ello analizar si existe relación entre sensibilidad y resistencia versus la producción enzimática de las fosfolipasas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Tipo y diseño de estudio

Estudio descriptivo observacional y transversal.

La muestra estuvo constituida por 60 aislamientos del género *Candida* recolectadas en el área de Micología del laboratorio del Hospital Regional Lambayeque entre los meses agosto 2017 y agosto del 2018. Los aislamientos provinieron de pacientes hospitalizados de muestras de sangre, orina y aspirados traqueales mientras que los aislamientos de secreción vaginal y mucosa oral fueron obtenidos de usuarios del consultorio externo.

La identificación de las especies de *Candida* fue realizada considerando características morfofisiológicas como la técnica

del tubo germinativo que consistió en inocular una porción de colonia cultivado en agar Sabouraud en 0,5 mL de suero e incubado a 37 °C por dos horas, luego se realizó la observación microscópica considerando positivo la presencia de apéndices de 3 a 4 veces la longitud de las células de levadura de las cuales se originan<sup>(16)</sup>. También se realizó la producción de velo o película para lo cual se inoculó una alícuota de la colonia de *Candida* spp en caldo BHI y se incubó a 37 °C por 24 horas<sup>(17)</sup>. Para la producción de clamidosporas se empleó agar arroz en el cual se sembró por la técnica de estría en dos líneas paralelas de 1,5 cm cada una, luego se cubrió con una laminilla y se incubó a 26 °C en cámara húmeda por 48 horas<sup>(18)</sup>. Las cepas fueron luego sembradas en placas petri conteniendo CHROMagar TM *Candida* e incubadas a 37 °C durante 48 horas, las levaduras fueron identificadas según el color que especificaba el fabricante.

Finalmente, para la identificación, se empleó el equipo automatizado vitex 2 para la identificación de algunas cepas.

La susceptibilidad antifúngica se realizó siguiendo las recomendaciones del documento M44-2A: 2018 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>(19)</sup> en la que se evaluó la susceptibilidad por disco difusión a fluconazol y voriconazol en agar Mueller-Hinton suplementado con 2 % de glucosa y, para la interpretación, se consideraron los puntos de corte clínicos establecidos en el M60 DEL CLSI<sup>(20)</sup>.

La producción de fosfolipasas se determinó por el método semicuantitativo en medio agar Sabouraud dextrosa (ASD) suplementado con yema de huevo. Para la cual se realizaron suspensiones en solución salina de aproximadamente 10<sup>6</sup> células (10 µL.) de cada uno de los aislamientos de las especies de *Cándida* e inoculados por triplicado en la superficie del medio<sup>(21,22)</sup>, luego se incubó a 37 °C por tres a ocho días (23). Posteriormente se calculó un coeficiente de actividad enzimática (Pz) al dividir el diámetro de crecimiento de la colonia levaduriforme entre el diámetro de la colonia más la zona de precipitación por acción de la producción enzimática considerando los siguientes rangos: Una PZ ≤ 0,699 muy alta actividad enzimática (++++); un PZ entre 0,700 – 0,799 correspondió a una alta actividad enzimática (+++), una PZ entre 0,800 - 0,899 indicó baja actividad enzimática (++) y valores de PZ ente 0,900 – 1,000 significo muy baja actividad enzimática (+)<sup>(21-24)</sup>.

Una vez obtenidos, los datos de las variables fueron ordenados en tablas y figuras, y se procedió a su descripción utilizando porcentajes. Adicionalmente se realizó la prueba de Fisher exacta para evaluar la asociación entre la susceptibilidad antifúngica y producción de fosfolipasas en cepas de *C. albicans* y *C. no albicans*. Se utilizaron los programas de Microsoft Office Word y Excel versión 2010.

La autorización del protocolo fue aprobada por el comité de ética del Hospital Regional Lambayeque (0211-014-18). Los aislamientos fueron identificados con códigos numéricos para mantener la confidencialidad de los pacientes de quienes procedieron las muestras.

## RESULTADOS

De 60 cultivos aislados, el 36,7 % fue *C. albicans* y 63,3 % *Candida no albicans*. De las cepas procesadas el 95,5 % de *C.*

*albicans* fue sensible a fluconazol y voriconazol mientras que *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* mostraron 100 % de sensibilidad para ambos azoles (Tabla 1).

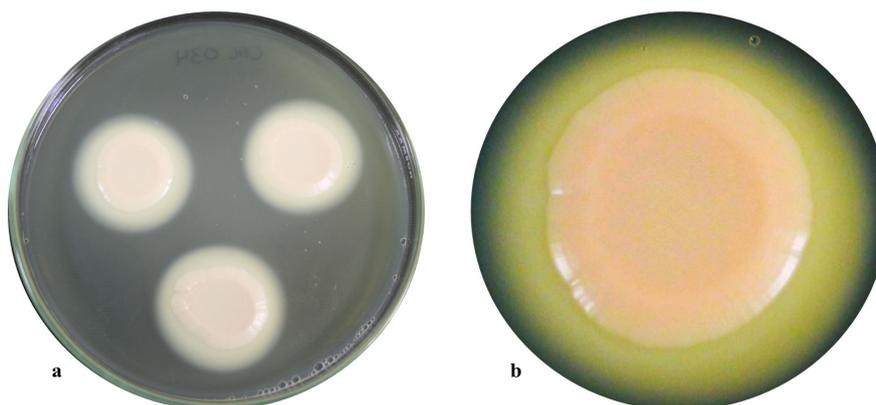
**Tabla 1.** Susceptibilidad antifúngica de *Candida albicans* y no albicans a fluconazol y voriconazol.

| Especies                          | Fluconazol        |                     | Voriconazol       |                     | Total<br>N (%) |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------|
|                                   | Sensible<br>N (%) | Resistente<br>N (%) | Sensible<br>N (%) | Resistente<br>N (%) |                |
| <b><i>Candida albicans</i></b>    | 21 (95,5)         | 1 (4,5)             | 21 (95,5)         | 1 (4,5)             | 22 (36,7)      |
| <b><i>Candida no albicans</i></b> |                   |                     |                   |                     |                |
| <i>C. tropicalis</i>              | 21 (100,0)        | 0 (0,00)            | 21 (100,0)        | 0 (0,00)            | 21 (35,0)      |
| <i>C. glabrata</i>                | -*                | 1 (14,3)            | -*                | -*                  | 7 (11,6)       |
| <i>C. krusei</i>                  | -*                | -*                  | 4 (100)           | 0 (0,00)            | 4 (6,7)        |
| <i>C. parapsilosis</i>            | 4 (100)           | 0 (0,00)            | 4 (100)           | 0 (0,00)            | 4 (6,7)        |
| <i>C. famata</i>                  | -*                | -*                  | -*                | -*                  | 2 (3,3)        |

\* no hay puntos de corte establecidos

En la figura 1 se muestra la producción de fosfolipasas y en la tabla 2 la clasificación enzimática en cuatro categorías donde 19 (31,7 %) cepas mostraron actividad muy alta, 13 (21,6 %) alta, 4 (6,7 %) baja y solo 24 (40,0 %) muy baja o nula. 14 aislamientos de *C. albicans* fueron las de mayor producción con 23,3 % del total de las cepas analizadas mientras que el 25 % de *C. tropicalis* tuvieron muy baja.

El índice o coeficiente de actividad enzimática (Pz) para *C. albicans* se ubicaron en 0,477 el mínimo y de 0,791 el máximo; no obstante, en las *C. no albicans*, se mostró un valor mínimo de 0,518 para *C. famata* y un Pz máximo de 1,00 para quince cultivos de *C. tropicalis*, seis *C. glabrata* y tres en *C. parapsilosis* (Tabla 3).



**Figura 1.** Observación macroscópica de actividad de fosfolipasa en *C. albicans* a los ocho días de incubación: a) zona hidrolizada alrededor de las colonias; b) hidrolisis definida en una colonia.

**Tabla 2.** Producción de fosfolipasas en *C. albicans* y no *albicans* aisladas de muestras clínicas de un hospital de Chiclayo, Perú.

| Especies                   | Muy baja<br>N (%) | Baja<br>N (%) | Alta<br>N (%) | Muy alta<br>N (%) | total<br>N (%) |
|----------------------------|-------------------|---------------|---------------|-------------------|----------------|
| <i>Candida albicans</i>    | 0 (0,0)           | 0 (0,0)       | 8 (13,4)      | 14 (23,3)         | 22 (36,7)      |
| <i>Candida no albicans</i> | 24 (40)           | 4 (6,7)       | 5 (8,3)       | 5 (8,3)           | 38 (63,3)      |
| <i>C. tropicalis</i>       | 15 (25)           | 2 (3,3)       | 3 (5)         | 1 (1,7)           | 21 (35,0)      |
| <i>C. glabrata</i>         | 6 (10)            | 1 (1,6)       | 0 (0,0)       | 0 (0,0)           | 7 (11,6)       |
| <i>C. krusei</i>           | 0 (0,0)           | 1 (1,7)       | 2 (3,3)       | 1 (1,7)           | 4 (6,7)        |
| <i>C. parapsilosis</i>     | 3 (5)             | 0 (0,0)       | 0 (0,0)       | 1 (1,7)           | 4 (6,7)        |

**Tabla 3.** Índice de actividad enzimática en *C. albicans* y no *albicans*.

| Actividad enzimática<br>(Pz) | Clase | <i>Candida albicans</i> |      | <i>Candida no albicans</i> |      |
|------------------------------|-------|-------------------------|------|----------------------------|------|
|                              |       | n                       | %    | n                          | %    |
| 1,00                         | 1+    | 0                       | 0,0  | 24                         | 63,0 |
| 0,90 - 0,99                  | 1+    | 0                       | 0,0  | 0                          | 0,0  |
| 0,80 - 0,89                  | 2++   | 0                       | 0,0  | 4                          | 10,5 |
| 0,70 - 0,79                  | 3+++  | 8                       | 36,4 | 5                          | 13,2 |
| 0,60 - 0,69                  | 4++++ | 7                       | 31,8 | 2                          | 5,3  |
| 0,50 - 0,59                  | 4++++ | 5                       | 22,7 | 3                          | 7,8  |
| 0,00 - 0,49                  | 4++++ | 2                       | 9,1  | 0                          | 0,0  |

La prueba de chi cuadrado al 95 % de confianza (P=0,005) en *C. albicans* mostró que no existe diferencias significativas entre la susceptibilidad y producción de fosfolipasas (Tabla 4)

**Tabla 4.** Asociación entre la susceptibilidad antifúngica y producción de fosfolipasas en *C. albicans*.

| Susceptibilidad<br>antifúngica | Producción de fosfolipasas |          |          | Total |
|--------------------------------|----------------------------|----------|----------|-------|
|                                | Alta                       | Muy alta | Valor p* |       |
| <b>Sensible</b>                | 8                          | 13       | 0,469    | 21    |
| <b>Resistente</b>              | 0                          | 1        |          | 1     |

\*Valor p de prueba exacta de Fisher

## DISCUSIÓN

El diagnóstico y la susceptibilidad antifúngica es de vital importancia a fin de brindar un tratamiento adecuado en beneficio del paciente infectado por especies de *Candida*. Los resultados de este estudio permiten analizar algunos aspectos importantes acerca de la sensibilidad y resistencia, así como la producción de fosfolipasas permitiendo obtener datos confiables de vigilancia local para la toma de decisiones en salud pública.

Dentro de los aislamientos *C. albicans* fue la más común, siendo este resultado similar a otros estudios que encontraron una frecuencia de 65,3 % y 86 %, existiendo variación en una evaluación de vigilancia en *Candida no albicans* donde *C. glabrata* y *C. tropicalis* predominaron en 11,3 % y 7,2 % respectivamente<sup>(25)</sup>. En aislamientos vaginales el 9,1 % y 2,7 % fue *C. glabrata* y *C. parapsilosis* respectivamente<sup>(1)</sup>, mientras que el 67,4 % y 17,4 % de los aislados en un hospital de alta complejidad fueron *C. tropicales* y *C. glabrata* respectivamente<sup>(15)</sup>; por tanto, la especie levaduriforme varía de acuerdo con el tipo de muestra, estancia hospitalaria y área geográfica.

En relación con los perfiles de susceptibilidad fue posible constatar que la especie *C. albicans* presenta altos niveles de sensibilidad a pesar del uso profiláctico del fluconazol. Resultados similares fueron encontrados por Zuluaga et al., quienes encontraron un 78,3 % de sensibilidad en un total de 337 aislamientos<sup>(26)</sup>. Otros reportes dan cuenta que 89,5 % y 93,7 % fueron sensibles a fluconazol y voriconazol respectivamente y un 6,3 % y 3,2 % resistentes<sup>(1)</sup>. Mientras en un hospital chileno la sensibilidad fue 100%.<sup>(27)</sup> Sin embargo, la susceptibilidad de *Candidas no albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*) procedentes de pacientes en las unidades de cuidados intensivos alcanzó una resistencia de 19,5 % y 21,7 % a los mismos azoles, respectivamente<sup>(15)</sup>, dicha resistencia está en aumento sobre todo en aislamientos de candidas no albicans,<sup>(28)</sup> debido a diferentes mecanismos intrínsecos o adquiridos<sup>(29,30)</sup> en donde la mayor parte de resistencia a los azoles es por la afinidad reducida de la enzima diana, lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa y sobreexpresión de bombas de eflujo<sup>(25,31)</sup>.

Por otro lado, varios estudios han demostrado la actividad de fosfolipasas hasta 100 %, <sup>(22,32)</sup> 97 % <sup>(33)</sup> y 92,3 %, <sup>(21)</sup> lo cual coincide con el presente estudio donde el 100 % de *C. albicans* produjo dicha enzima. Sin embargo, la categoría de producción muy alto fue de 23,3 % para *C. albicans* lo cual difiere con lo reportado por Puello et al, quien encontró 48,2 % de producción, pero afirma que existe la probabilidad que la actividad de fosfolipasa sea la que cumple un papel preponderante en el proceso de interacción entre huésped y parásito<sup>(8)</sup>.

Sin embargo, del total de cepas analizadas solo se obtuvo un 60 % de producción, similar al informe de otros autores donde encontraron una incidencia de 60,9 % <sup>(21)</sup> pero difiere al reporte del 95 % en *Candida spp.* <sup>(24)</sup>. Estas discrepancias se relacionan probablemente con las diferentes especies, número de aislados y metodologías empleadas. Así, por ejemplo, en estudio semicuantitativo en placa, Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo obtuvieron más alta actividad enzimática de fosfolipasas en *C. albicans* (0,248) y *C. tropicalis* (0,256) por lo tanto

la producción de fosfolipasas es importante para entender la correlación entre las especies y la infección<sup>(22)</sup>; sin embargo, no encontramos relación entre la susceptibilidad antifúngica y la actividad de fosfolipasas con los aislamientos de *C. albicans* evaluados.

Una limitación del estudio fue no contar con mayor número de aislamientos lo que hubiese permitido sincerar con mayor amplitud el análisis de susceptibilidad y producción de fosfolipasas. Se recomienda prestar mucha atención en las especies de *Candida no albicans* debido a que algunas de ellas no cuentan con puntos de corte clínico establecidos en el documento M60 del CLSI para la evaluación de la susceptibilidad que pudiesen influenciar en los resultados y en análisis comparativos.

Se concluye que los aislamientos de *C. albicans* y *C. tropicalis* mostraron más del 95 % de sensibilidad a fluconazol y voriconazol. Mientras que el 31,7 % de los cultivos presentaron producción enzimática de fosfolipasas muy alto, dichos hallazgos son de importancia para los laboratorios de microbiología clínica y vigilancia epidemiológica local.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

**Financiamiento:** Autofinanciamiento.

**Contribuciones de autoría:** NFBE y RJCC concibieron el estudio, realizaron los ensayos, interpretaron resultados, escribieron el borrador del manuscrito y aprobaron la versión final. GLB y RVF participaron en la recolección de datos, análisis e interpretación de resultados, revisión crítica del artículo y aprobaron la versión final del artículo.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Herreras-Gomez LR, Cárdenas-López VL. Perfil de resistencia antifúngica en el tratamiento de candidiasis vaginal: Un diagnóstico de agentes etiológicos. Rev Haban Cienc Méd [Internet]. 2022 [Citado el 15 de marzo del 2024]; 21(2): e4241. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4241>
- d'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, Chakraborty S, Cole N, Delavy M, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. FEMS Microbiol Rev. 2021; 45(3): fuaa060. doi: 10.1093/femsre/fuaa060.
- Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico del Perú - Volumen 11, semana 11 - 2022. Lima: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, MINSA; 2022 [Citado el 6 de febrero del 2024]. Disponible en: [https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin\\_202211\\_08\\_173444.pdf](https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_202211_08_173444.pdf)
- Ciurea CN, Kosovski I-B, Mare AD, Toma F, Pinteau-Simon IA, Man A. *Candida* and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. Microorganisms. 2020; 8(6):857. doi: 10.3390/microorganisms8060857.

5. Strati F, Di Paola M, Stefanini I, Albanese D, Rizzetto L, Lionetti P, et al. Age and Gender Affect the Composition of Fungal Population of the Human Gastrointestinal Tract. *Front Microbiol.* 2016; 7:1227. doi: 10.3389/fmicb.2016.01227. Millet JP, Shaw E, Orcau A, Casals M, Miró JM, Caylà JA, et al. Tuberculosis recurrence after completion treatment in a European city: reinfection or relapse? *PLoS One.* 2013;8(6):1-8. Doi: 10.1371/journal.pone.0064898
6. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4:18026. DOI: 10.1038/nrdp.2018.26.
7. D'Eça A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Figueiredo P de MS, Monteiro C de A, et al. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):334-8. doi: 10.1590/s0037-86822011005000036
8. Puello M, Young G, Suárez P. Phospholipase and proteinase activities of isolates of colonizing *Candida* spp. causing vulvovaginitis in pregnant women. *Biomedica.* 2022;43(Suppl. 1):89-96. doi: 10.7705/biomedica.6759
9. García-Vargas M, Casado MA, Mir N, Barrueta JA. Análisis de costes de tres candidas en el tratamiento de la candidiasis invasora en pacientes adultos no neutropénicos en España. *Farm Hosp.* 2012; 36(4):207-15. doi: 10.1016/j.farma.2011.03.007
10. Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, Peng Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(4):778-85. doi: 10.1093/jac/dks481
11. Scorzoni L, de Paula E Silva AC, Marcos CM, Assato PA, de Melo WC, de Oliveira HC, et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front Microbiol.* 2017; 8: 36. doi: 10.3389/fmicb.2017.00036
12. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, Del Castillo M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(6):380-4. doi: 10.1016/j.eimc.2012.09.011
13. Yenişehirli G, Bulut Y, Tunçoglu E. Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolates obtained from clinical specimens. *Mikrobiyol Bul* [Internet]. 2010 [Citado el 15 de marzo del 2024]; 44(1): 71-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20455401/>
14. Ajenjo MC, Aquevedo A, Guzmán AM, Poggi H, Calvo M, Castillo C, et al. Perfil epidemiológico de la candidiasis invasiva en unidades de cuidados intensivos de un hospital universitario. *Rev Chil Infectología.* 2011;28(2):118-22. Doi: 10.4067/S0716-10182011000200003
15. Vázquez Zamora KG, Villalobos Barboza K, Vergara Espinoza MA, Ventura Flores R, Silva Díaz H. Frecuencia y susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp. (no *C. albicans*) aislado de pacientes en unidades de cuidados intensivos de un hospital terciario en el norte de Perú. *Horiz. Medicina.* 2020; 20(4): e1230. doi: 10.24265/horizmed.2020.v20n4.07
16. Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC. Guía práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. *Revista Iberoamericana de Micología* [Internet]. 2007 [Citado el 15 de marzo del 2024]; 2. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/>
17. Zurita-Macalopú S, Urcia-Ausejo, Navarro-Mariñas A. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Salud, MINSA; 2017 [Citado el 15 de marzo del 2024]. Disponible en: <https://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4533.pdf>
18. Kumar CP, Menon T. Tobacco agar: a new medium for chlamydo sporulation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Med Mycol.* 2005; 43(5): 473-5. doi: 10.1080/13693780400029205
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast. 3rd ed. CLSI supplement M44-A2 [Internet]. 2018 [Citado el 15 de marzo del 2024]. Disponible en: [https://clsi.org/media/2634/m44ed3\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/2634/m44ed3_sample.pdf)
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. 1st ed. CLSI supplement M60 [Internet]. 2017 [Citado el 15 de marzo del 2024]. Disponible en: [https://clsi.org/media/1895/m60ed1\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1895/m60ed1_sample.pdf)
21. Sachin C., Ruchi K, Santosh S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. *Int J Med Biomed Res.* 2012;1(2):153-7. Doi: 10.14194/ijmbr.1211
22. Ramos L de S, Barbedo LS, Braga-Silva LA, dos Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol.* 2015; 32(2):122-5. doi: 10.1016/j.riam.2014.01.003
23. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, et al. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis* [Internet]. 2007 [Citado el 15 de marzo del 2024]; 60(5): 280-3. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17881867/>
24. Panizo M, Reviákina V, Flores Y, Montes V, González G. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. *Rev la Soc Venez Microbiol* [Internet]. 2005 [Citado el 15 de marzo del 2024]; 25(1): 88-95. [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_vm/article/view/447/405](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/view/447/405)
25. Beardsley J, Halliday CL, Chen SC, Sorrell TC. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. *Future Microbiol.* 2018;13(10):1175-1191. doi: 10.2217/fmb-2018-0059.
26. Zuluaga A, de Bedout C, Agudelo CA, Hurtado H, Arango M, Restrepo Á, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001-2007). *Rev Iberoam Micol.* 2010; 27(3):125-9. Doi: 10.1016/j.riam.2010.04.001
27. Márquez F, Iturrieta I, Calvo M, Urrutia M y Godoy-Martínez P. Epidemiología y susceptibilidad antifúngica de especies causantes de candidemia en la ciudad de Valdivia, Chile. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2017 [Citado el 15 de marzo del 2024]; 34(5): 441-446. Disponible en: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182017000500441](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182017000500441)
28. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolcar S, et al. Comparison of results of fluconazole and voriconazole disk diffusion testing for *Candida* spp. with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;43(10):5208-13. Doi: 10.1128/JCM.43.10.5208-5213.2005
29. Morio F, Jensen RH, Le Pape P, Arendrup MC. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 50(5):599-606. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.012.
30. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol.* 2018; 45: 70-76. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.005.
31. Fisher, M.C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nat Rev Microbiol* (2022). Doi: 10.1038/s41579-022-00720-1
32. Deepa K, Jeevitha T, Michael A. In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. *J Microbiol Antimicrob.* 2015;7(3):28-32. Doi: 10.5897/jma2015.0337
33. Campos L. Estudio del papel de las fosfolipasas fúngicas en la inducción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) por especies del género *Candida* [Tesis de maestría]. Monterrey: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León; 2015. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/9605/1/1080214978.pdf>