

Portación de *Candida* spp. en cavidad oral en diabéticos y no diabéticos

Carrying of *Candida* spp. in the oral cavity in diabetic and non-diabetic patients

Indira Llanos González,^I Rina Montoya Ojeda,^I Martha Puello Hoyos,^I Gregorio Young Castro,^I Oscar Correa Jiménez,^{II} Paola Suárez Álvarez^I

^IGrupo de Micología. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia.

^{II}Grupo de Genética y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia.

RESUMEN

Introducción: *Candida* spp. es un habitante normal de la microbiota humana, que puede originar infecciones superficiales y sistémicas de carácter oportunista. En pacientes diabéticos se incrementa el riesgo de infecciones por esta levadura, lo cual estaría determinado por la portación de *Candida* spp. Esta portación es variable, así se observa en cavidad oral desde 13,7 al 64 %.

Objetivo: establecer los porcentajes de colonización y posibles factores asociados en este grupo de alto riesgo.

Método: se realizó un estudio descriptivo en un total de 172 pacientes diabéticos y no diabéticos. Las muestras de enjuague bucal se sembraron en agar Sabouraud y CHROMagar *Candida*. Los aislamientos se sometieron a pruebas fenotípicas y a reacción en cadena de la polimerasa múltiple para su identificación. Las variables demográficas, los hábitos de higiene oral, el uso de prótesis dental, así como los niveles de hemoglobina glucosilada se evaluaron para determinación de frecuencias y asociación por χ^2 y análisis multivariado, mediante el programa SPSS versión 19.0.

Resultados: el porcentaje de colonización en el total de la población diabética y no diabética (n= 172) fue de 33,7 %. La distribución por especies fue de *Candida albicans* (63,8 %), *Candida glabrata* (10,3 %), *Candida tropicalis* (6,9 %), *Candida krusei* (5,2 %), *Candida dubliniensis* (3,4 %), *Candida parapsilosis* (3,4 %), *Candida lusitanae* (1,7 %), *Candida guilliermondii* (1,7 %) y *Candida* spp. (no identificada, 3,4 %). En sujetos no diabéticos el porcentaje de colonización fue de 27,9 % y en diabéticos de 36,9 %. En los sujetos del estudio se encontró que 14,9 % tenía control

glucémico por los niveles de hemoglobina glucosilada, el 57,6 % utilizaba prótesis dentales y el 63,9 % practicaba higiene oral regular.

Conclusión: *Candida albicans* es la especie predominante en ambos grupos, con un porcentaje significativo de las especies no *albicans* en estos pacientes. El uso de prótesis dental es un factor coadyuvante para la colonización por especies del género *Candida*.

Palabras clave: *Candida*; diabetes; colonización; cavidad oral.

ABSTRACT

Introduction: *Candida* spp. is a normal inhabitant of the human microbiota, which can cause superficial and systemic infections of an opportunistic nature. In diabetic patients the risk of infections by this yeast increases, which would be determined by the carrying of *Candida* spp. This carrying is variable, as observed in the oral cavity from 13.7 to 64 %.

Objective: to establish the percentages of colonization and possible associated factors in this high-risk group.

Method: a descriptive study was carried out in a total of 172 diabetic and non-diabetic patients. Mouthwash samples were seeded on Sabouraud agar and CHROMagar *Candida*. The isolates were subjected to phenotypic tests and to a multiple polymerase chain reaction for identification. Demographic variables, oral hygiene habits, the use of dental prostheses, as well as glycosylated hemoglobin levels were evaluated for frequency and association determination by chi2 and multivariate analysis, using the SPSS program version 19.0.

Results: the percentage of colonization in the total of the diabetic and non-diabetic population (n= 172) was 33.7 %. The distribution by species was *Candida albicans* (63.8 %), *Candida glabrata* (10.3 %), *Candida tropicalis* (6.9 %), *Candida krusei* (5.2 %), *Candida dubliniensis* (3.4 %), *Candida parapsilosis* (3.4 %), *Candida lusitaniae* (1.7 %), *Candida guilliermondii* (1.7 %), and *Candida* spp. (unidentified, 3.4 %). In non-diabetic patients the percentage of colonization was 27.9 % and in diabetics 36.9 %. In the study's patients, it was found that 14.9 % had glycemic control by glycosylated hemoglobin levels, 57.6 % used dental prostheses, and 63.9% practiced regular oral hygiene.

Conclusion: *Candida albicans* was the predominant specie in both groups, with a significant percentage of the non-*albicans* species in these patients. The use of dental prostheses was a contributory factor for colonization by species of the genus *Candida*.

Keywords: *Candida*; diabetes; colonization; oral cavity.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Cándida* forman parte de la microbiota normal en la piel, cavidad oral, tracto digestivo y vagina.^{1,2} Diferentes especies se han descrito como patógenos oportunistas involucrados en infecciones superficiales y sistémicas, especialmente en pacientes con inmunosupresión.^{2,3} La diabetes es una enfermedad de base en la que se eleva el riesgo por infecciones oportunistas, particularmente por *Candida* spp.⁴⁻⁸ *Candida albicans* es la especie más comúnmente aislada en estos pacientes, bien sea como colonizante o patógena, seguida por *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondi* y *Candida dubliniensis*.⁹⁻¹¹

La prevalencia de portadores de levaduras en la cavidad oral depende de sus condiciones generales, así como de la región geográfica del estudio y la edad de los pacientes. Se encontraron valores del 13,7 al 64 % sin ninguna sintomatología.¹¹⁻¹⁴ La presencia de estas levaduras en la cavidad oral no necesariamente da lugar a enfermedades, a menos que existan factores predisponentes para el desarrollo de la candidiasis.¹⁵

La colonización por *Candida* spp. es un factor necesario para la presentación de candidiasis orales en pacientes diabéticos, lo que puede afectar su calidad de vida y aumentar la tasa de mortalidad,^{1,11,16} por lo que se hace necesario conocer la proporción en la que estas se encuentran colonizando a los pacientes y sus factores asociados, ya que esta condición representa un factor de riesgo para esa población, así que se hace necesario promover medidas de control y prevención para evitar posibles eventos infecciosos.

MÉTODOS

El estudio, de carácter descriptivo, se realizó en un grupo de 172 participantes voluntarios que acudieron al programa de promoción y prevención del Centro de Salud Turbaco-Bolívar, en el periodo comprendido de agosto a diciembre de 2013. Los participantes fueron debidamente informados de los objetivos del proyecto, y se les solicitó su consentimiento informado de acuerdo con los avales éticos de la institución. Los criterios de inclusión fueron: pacientes diabéticos con control de glucemia y hemoglobina glicosilada (HbA1c), y pacientes no diabéticos saludables sin inmunocompromiso con resultado de glucemia en ayunas no mayor a un mes. Se excluyeron del estudio los pacientes con lesiones en cavidad oral.

Las muestras de cavidad oral se recolectaron mediante enjuague bucal con solución de buffer fosfato salino (PBS).¹⁷ Las siembras de las muestras se realizaron en agar Sabouraud-cloranfenicol (Merck, Alemania) para aislamiento primario. Las cepas utilizadas como control fueron las siguientes: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 64677, *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) ATCC 6258, *Candida lusitanae* ATCC 34449, *Candida guilliermondii* ATCC 6260, *Candida dubliniensis* GM0314 (aislamiento clínico caracterizado fenotípica y molecularmente).

Los aislamientos obtenidos se sembraron en CHROMagar *Candida* (Francia)¹⁸ para diferenciar las especies de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las pruebas fenotípicas adicionales incluyeron: tinción de gram, prueba de tubo germinal en agar leche y suero, zimograma y producción de clamidosporas en agar harina de maíz y agar leche.¹⁹⁻²¹

La prueba del tubo germinal se realizó en suero para verificar la filamentación a 37 °C, para lo cual se siembra el aislamiento a estudiar en 0,5 mL de suero. Después de dos horas de incubación se tomó una gota de la suspensión para su observación microscópica, que sería positiva para *C. albicans*.¹⁹ La prueba en agar leche permite la verificación de la filamentación y la producción de clamidosporas directamente en un portaobjetos preparado previamente con el medio. Para la preparación del medio se pesaron 2 g de agar al 2 %, 100 mL de agua destilada, 1 mL de *tween* 80 al 1 % y 1 mL de leche 1 %. Este medio se fraccionó en tubos y se le agregaron 10 mL a cada uno, se llevó a esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, luego se dejó enfriar aproximadamente a una temperatura 50 °C, para después agregar 1 mL de leche al 1 %. El medio se colocó sobre portaobjetos estériles en cámara húmeda, se sembró una estría por incisión en el

medio y se cubrió con un cubreobjetos estéril. Se incubó a 37 °C durante 3 horas, y se realizó la lectura microscópica con 10X y 40X, para observar la presencia de tubo germinal, luego se volvió a incubar a 30 °C durante 48 horas para visualizar la formación de clamidosporas.¹⁹

Para la prueba de zimograma se utilizaron 5,5 g de extracto de levadura, 7,5 g de peptona, y 40 mg de púrpura de bromocresol para un litro de agua. Una vez estéril por calor húmedo, se dispensó en tubos de 10 mL y se adicionó al medio 1 mL del azúcar a evaluar (glucosa, sacarosa, galactosa, lactosa y maltosa), con una concentración del 6 % y previamente filtrada con millipore de 0,5 µm. Luego se preparó el inóculo a estudiar según la escala 1 (3 x 10⁸ unidades formadoras de colonias [u.f.c]/mL) de Mc Farland, y se agregaron 100 µL de este al medio. Una vez listo, se llevó a incubar a 37 °C por 24-48 horas. El cambio de color indicó la positividad de la prueba.

Para la prueba de clamidosporas en agar harina de maíz, las colonias frescas fueron inoculadas en el medio (Himedia), con asa en punta, realizando una incisión de aproximadamente 1 cm de largo, y cubriéndolo con un cubreobjeto se incubó a 24 °C por 48 horas. Pasado este tiempo, las cajas de Petri cultivadas se observaron en el microscopio en el objetivo 40X para captar la presencia de clamidosporas.

El ADN de los aislamientos de *Candida* spp. se obtuvo por el método de choque térmico descrito por *Millar* y otros,²² sin adición de enzimas. Para la amplificación de las especies de *Candida* se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple descrito por *Carvalho* y otros.²³ Los *primers* universales UNI1 y UNI2 y los *primers* especie-específicos Calb, Cgla, Ckru, Cpar, Ctro, Cgui y Cdub fueron corroborados usando el programa *Primer Blast* en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Los *primers* fueron comprados a *Eurofins Mwg Operon*, con sede en Estados Unidos. La PCR múltiple se realizó de acuerdo con lo descrito por *Carvalho* y otros, pero con un volumen final de 25 µL y con el kit *GoTaq Green Master Mix* de Promega. Las concentraciones finales de los *primers* para la PCR fueron las señaladas por *Carvalho* y otros.²³ La reacción se corrió en un termociclador *Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400*, de la manera siguiente: un periodo inicial de desnaturalización y activación enzimática de 10 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 45 segundos a 65 °C. El gel de agarosa se usó al 2 % en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) más bromuro de etidio (5 µL/100 mL de agarosa). Se utilizó el marcador de peso molecular *Thermo Scientific GeneRuler 50 bp DNA Ladder*. La corrida se realizó en buffer TBE y con un voltaje de 100 V. Las fotografías se registraron con un fotodocumentador, Ingenius 3, Genesys versión 1.2.7.0.²³

Para el análisis estadístico de las variables cualitativas se utilizó la prueba de Fisher o chi², y para las variables cuantitativas Mann-Whitney. Se implementó la regresión logística para el análisis bivariado y multivariado, con *odds ratio* (OR) con un IC 95 % y p < 0,05 utilizando para ello el programa estadístico SPSS para *Windows* versión 19.0.

RESULTADOS

Durante el período del estudio participaron voluntariamente 172 sujetos, 135 mujeres y 37 varones, sin lesiones en cavidad oral; 111 con diagnóstico de diabetes mellitus y 61 no diabéticos. La mediana de la edad fue de 66 años con un

rango intercuartílico entre 57,5 y 75 años. El porcentaje de colonización en el total de la población diabética y no diabética fue de 33,7 % (58 sujetos). En sujetos no diabéticos el porcentaje de colonización fue de 27,9 % y en diabéticos de 36,9 %.

Mediante las pruebas fenotípicas se encontró que *Candida albicans* (67,2 %) fue la especie más frecuente, seguida por *Candida krusei* (13,8 %), *Candida* spp. (12,1 %), y *Candida tropicalis* (6,9 %). En cuanto a los sujetos colonizados por especies del género *Candida* identificadas por CHROMagar, la especie más frecuentemente aislada fue *Candida albicans* (colonias verdes) con 67,2 %, seguida por *Candida krusei* (colonias rosadas) 13,8 %, *Candida* spp. (colonias blancas, no identificadas) 12,1 %, *Candida tropicalis* (colonias azules) 6,9 % (tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de la identificación de las especies de *Candida* por CHROMagar en los pacientes diabéticos y no diabéticos

CHROMagar	Frecuencia	Frecuencia relativa	%
<i>C. albicans</i>	39	0,672	67,2
<i>C. krusei</i>	8	0,138	13,8
<i>C. tropicalis</i>	4	0,069	6,9
<i>C. spp.</i>	7	0,121	12,1
Total	58	1	100,0

Al realizarse la prueba de tubo germinal para la especie *Candida albicans* dio resultados positivos que evidenciaron su presencia, reproducible en ambas pruebas (tanto en suero humano como en agar leche). Se identificó en mayor proporción en el agar leche (100 %) y en suero humano (97,4 %). Las colonias aisladas de CHROMagar de *Candida albicans* dieron resultados positivos para clamidosporas en ambas pruebas, y se observó una identificación en agar leche en 100 % y en agar harina de maíz en 92,1 %. Los resultados obtenidos mediante zimograma fueron muy variables: para *Candida albicans* y *Candida* no *albicans* se obtuvo un crecimiento del 12,2 %.

Los aislamientos se identificaron por PCR múltiple y se encontró concordancia relativa con los resultados obtenidos por los métodos fenotípicos. El 33,7 % de la población (58 sujetos) estaba colonizado por *Candida albicans* (63,8 %), *Candida glabrata* (10,3 %), *Candida tropicalis* (6,9 %), *Candida krusei* (5,2 %), *Candida dubliniensis* (3,4 %), *Candida parapsilosis* (3,4 %), *Candida lusitanae* (1,7 %), *Candida guilliermondii* (1,7 %) y *Candida* spp. (no identificada, 3,4 %) (tabla 2, figuras 1 y 2).

Tabla 2. Frecuencia y comparación de las características generales de los pacientes por diagnóstico o no de diabetes

Variables sociodemográficas de colonización y factores de riesgo	No diabetes N= 61 (%)	Diabetes N= 111 (%)	Valor p
Edad [rango]	68 [60,5-75]	65 [55,5-74,5]	0,1513
Género			
Femenino	41 (67,2)	94 (84,7)	0,0132
Masculino	20 (32,8)	17 (15,3)	-
Colonizado	17 (27,9)	41 (36,9)	0,3049
Especies			
<i>C. albicans</i>	13 (24,6)	24 (21,6)	-
<i>C. tropicalis</i>	-	4 (3,6)	-
<i>C. krusei</i>	1 (1,6)	2 (5,4)	-
<i>C. parapsilosis</i>	0 (0,0)	2 (1,8)	-
<i>C. glabrata</i>	1 (1,6)	5 (4,5)	-
<i>C. dubliniensis</i>	2 (3,3)	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	1 (0,9)	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	1 (0,9)	-
<i>Candida</i> spp. (no identificadas)	-	2 (1,8)	-
Control glucémico (HbA1c)	-	16 (14,9)	-
Prótesis dental	44 (72,1)	55 (49,5)	0,0068
Higiene bucal	38 (62,3)	72 (64,9)	0,8620

En los sujetos del estudio se encontró que 16 (14,9 %) tenían control glucémico medido por niveles de HbA1c. Al indagar por los hábitos orales se encontró que el 57,6 % utilizaba prótesis dentales y el 63,9 % practicaba higiene oral regular. Cuando se compararon todas las variables estudiadas entre los sujetos con diagnóstico o no de diabetes, se encontraron diferencias significativas en el grupo de mujeres y en el uso de prótesis dental ([tabla 2](#)). No se observaron diferencias entre los pacientes con control glucémico. Al asociar diabetes con género femenino, utilización de prótesis dental y práctica de higiene oral regular, con la colonización oral por *Candida*, se encontró asociación causal para la utilización de prótesis dental con OR crudo= 2,33 (IC 95 %= 1,13-4,89) y OR ajustado= 2,72 (IC 95 %= 1,34-5,50) por análisis bivariado y multivariado respectivamente ([tabla 3](#)).

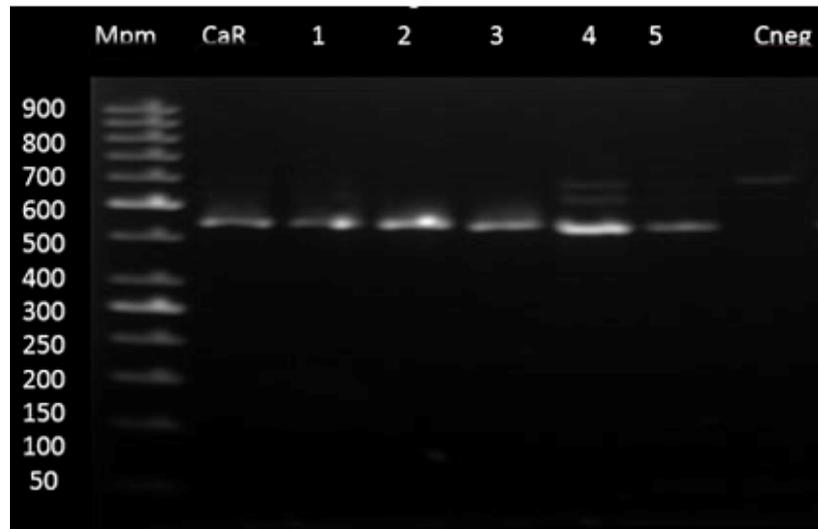


Fig. 1. Electroforesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple: Mpm 50 pb (marcador de peso molecular), CaR (*Candida albicans* de referencia) 1-5 aislamientos de *C. albicans*, control negativo (Cneg).

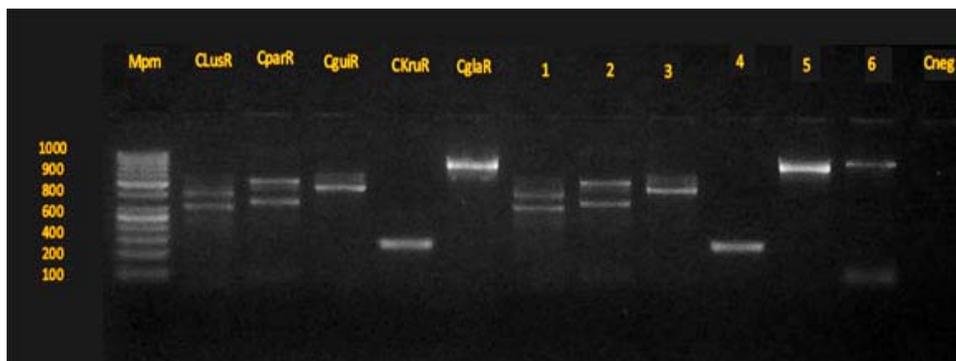


Fig. 2. Gel de electroforesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple: Mpm (marcador de peso molecular), ClusR (*C. lusitanae* referencia), CparR (*C. parapsilosis* referencia), CguiR (*C. guilliermondii* referencia), CKruR (*C. krusei* referencia), CglaR (*C. glabrata* referencia), 1 (*C. lusitanae*), 2 (*C. parapsilosis*), 3 (*C. guilliermondii*), 4 (*C. krusei*), 5 y 6 (*C. glabrata*), control negativo (Cneg).

Tabla 3. Factores asociados a colonización oral por *Cándida spp.* por regresión logística

Factores de riesgo	OR crudo	IC 95 %	OR ajustado	IC 95 %
Diabetes	1,52	0,73-3,20	1,87	0,90-3,86
Género femenino	0,79	0,32-1,84	0,82	0,36-1,89
Prótesis dental	2,33	1,13-4,89	2,72	1,34-5,50
Higiene bucal	1,10	0,54-2,28	1,02	0,52-2,05

OR: odds ratio.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, del total de 172 participantes, 64,5 % (111) eran diabéticos y 35,5 % (61) no diabéticos. El 33,7 % de la población (58 sujetos) estaba colonizado por *Candida albicans* (63,8 %), *Candida tropicalis* (6,9 %), *Candida krusei* (5,2 %), *Candida glabrata* (10,3 %), *Candida dubliniensis* (3,4 %), *Candida parapsilosis* (3,4 %), *Candida lusitaniae* (1,7 %), *Candida guilliermondii* (1,7 %) y *Candida* spp. (no identificada, 3,4 %). Estos resultados difieren al estudio realizado por *Wills* y otros,²⁴ ya que en 414 pacientes diabéticos insulino dependientes se encontró que el 77 % fueron positivos para *Candida* en cavidad bucal, aunque *C. albicans* fue la especie aislada con más frecuencia.

Otro estudio realizado por *Suarez* y otros,²⁵ en Cali, con pacientes diabéticos, también encontró a *C. albicans* como la especie más frecuentemente aislada. *Urizar* y otros,²⁶ mencionan que la relación entre candidiasis oral y diabetes se conoce desde hace mucho tiempo; los estudios comparativos realizados no han sido capaces de demostrar, de forma definitiva, una mayor colonización por *Candida* en los pacientes diabéticos, aunque sí se ha confirmado mayor presencia de *Candida* en la boca de pacientes diabéticos con prótesis dental con respecto a los no portadores. En nuestro estudio se encontró que el 57,6 % utilizaba prótesis dental, que arrojó una asociación causal para la colonización oral por *Candida* spp., con un OR= 2,33 y p= 0,0068.

Gendreau y *Loewy*²⁷ mencionan la prevalencia del 15-70 % en su revisión de la literatura sobre epidemiología y etiología de candidiasis asociada a la prótesis oral, en el que considera que la amplia variabilidad de estos rangos se debe a la diversidad de poblaciones y condiciones de estudio. La prótesis dental impediría la libre circulación de la saliva, y su acción de lavado lubricación y protección, y promovería una alteración duradera del microambiente.²⁸ El papel de la saliva es controvertido, ya que algunos autores afirman que reduce la adherencia del hongo al polímero, debido a la actividad protectora de las enzimas salivales, en tanto, otros han reportado que la formación de películas de saliva y suero favorecen la fase inicial del proceso de adherencia de *Candida albicans* a la prótesis dental, sin afectar las fases posteriores del proceso.^{14,25} En cuanto a la higiene oral, en nuestro estudio, no se encontró asociación con la colonización por especies de *Candida* y la diabetes.

Cuando se compararon las características generales de los sujetos diabéticos con su control glucémico (niveles de HbA1c), se observó en los diabéticos no controlados de sexo femenino una portación del 38,3 %, uso de prótesis dental en 47,9 % e higiene bucal deficiente en un 68,1 %; mientras, en los diabéticos controlados la portación fue del 31,2 y el uso de prótesis dental en 52,2 %. Estos resultados se relacionan con un estudio previo realizado por *Khosravi* y otros,²⁹ que menciona que el grado de colonización de levadura de la cavidad oral puede ser alterado por los niveles de glucosa en la sangre. Sin embargo, nuestro estudio no reveló diferencias estadísticamente significativas.

Manfredi y otros³⁰ afirman que la frecuencia de aislamientos y el estado de portador de *Candida* es independiente del nivel de HbA1c, y sugieren que el crecimiento de las levaduras en la cavidad bucal de los pacientes diabéticos depende de otros factores. Un nivel de HbA1c por encima de 12 % es altamente predictivo de la infección oral debido a *Candida*, sin embargo en nuestro estudio no se encontró asociación. En cuanto al uso de prótesis dental se encontró asociación con la colonización en ambos grupos, pues su uso predispone al paciente y lo hace más susceptible a una candidiasis oral. Sería recomendable realizar regularmente

desinfección a las prótesis dentales y dejarlas expuestas al aire en las noches, sugerencia, sobre todo, para los pacientes diabéticos.

Se concluye que *Candida albicans* es la especie predominante en ambos grupos, con un porcentaje significativo de las especies no *albicans* en estos pacientes. La especie no *albicans* que siguió en el uso de prótesis dental parece un factor coadyuvante para la colonización por especies del género *Candida*.

Agradecimientos

A la señora *María de la Vega* por su solícita colaboración durante el desarrollo del presente trabajo, y a la Universidad de Cartagena por la financiación de este proyecto mediante Resolución N° 04670 de 2012 en la Sexta Convocatoria para la Financiación de Proyectos de Investigación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la realización del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lopez-Martinez R. Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology*. 2010 Mar 04;28(2):178-84.
2. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015 Oct 15;69:71-92.
3. Ng KP, Kuan CS, Kaur H, Na SL, Atiya N, Velayuthan RD. *Candida* species epidemiology 2000-2013: a laboratory-based report. *Trop Med Int Health*. 2015 Nov;20(11):1447-53.
4. WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. World Health Organization. Geneva: WHO press; 2006.
5. Bomberg H, Kubulus C, List F, Albert N, Schmitt K, Graber S, et al. Diabetes: a risk factor for catheter-associated infections. *Reg Anesth Pain Med*. 2015 Jan-Feb;40(1):16-21.
6. Atreja A, Kalra S. Infections in diabetes. *J Pak Med Assoc*. 2015 Sep;65(9):1028-30.
7. Gunther LS, Martins HP, Gimenes F, Abreu AL, Consolaro ME, Svidzinski TI. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *Sao Paulo Medical Journal=Revista Paulista de Medicina*. 2014;132(2):116-20.

8. Wilke T, Boettger B, Berg B, Groth A, Mueller S, Botteman M, et al. Epidemiology of urinary tract infections in type 2 diabetes mellitus patients: An analysis based on a large sample of 456,586 German T2DM patients. J Diabetes Complications. 2015 Sep 1. PubMed PMID: 26476473.
9. Bader MS, Lai SM, Kumar V, Hinthorn D. Candidemia in patients with diabetes mellitus: epidemiology and predictors of mortality. Scand J Infect Dis. 2004;36(11-12):860-4.
10. Al Mubarak S, Robert AA, Baskaradoss JK, Al-Zoman K, Al Sohail A, Alsuwyed A, et al. The prevalence of oral *Candida* infections in periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus. J Infect Public Health. 2013 Aug;6(4):296-301.
11. Suarez P, Llanos I, Montoya R, Puello M, Young G, Reyes N. Colonización por *Candida* spp. en sujetos diabéticos y no diabéticos. Rev Cubana Endocrinol. 2016;27(1):68.
12. Al-Abeid HM, Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ, Hamad MA. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2004 Dec;57(6):279-84.
13. Premkumar J, Ramani P, Chandrasekar T, Natesan A, Premkumar P. Detection of species diversity in oral *Candida* colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine. 2014 Jan;5(1):148-54.
14. Martinez RF, Jaimes-Aveldanez A, Hernandez-Perez F, Arenas R, Miguel GF. Oral *Candida* spp. carriers: its prevalence in patients with type 2 diabetes mellitus. An Bras Dermatol. 2013 Mar-Apr;88(2):222-5.
15. Ship JA. Diabetes and oral health: an overview. Journal of the American Dental Association. 2003 Oct;134(spec no.):4S-10S.
16. Piekarczyk J, Fiedor P, Chomicz L, Szubinska D, Starosciak B, Piekarczyk B, et al. Oral cavity as a potential source of infections in recipients with diabetes mellitus. Transplant Proc. 2003 Sep;35(6):2207-8.
17. Smitha Byadarahally R, Rajappa S. Isolation and Identification of *Candida* from the Oral Cavity. ISRN Dent. 2011;2011:487921.
18. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. Journal of Clinical Microbiology. 1994 Aug;32(8):1923-9.
19. Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Isolation of *Candida dubliniensis* in different clinical samples. Analysis of phenotypical methods to differentiate it from *Candida albicans*. Revista Argentina de Microbiología. 2008 Oct-Dec;40(4):211-7.
20. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. Journal of Clinical Microbiology. 2008 Oct;46(10):3508-9.

21. Pincus DH, Orenga S, Chatellier S. Yeast identification--past, present, and future methods. *Medical Mycology*. 2007 Mar; 45(2):97-121.
22. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods*. 2000 Oct; 42(2): 139-47.
23. Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, et al. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Medical Mycology*. 2007 Nov; 45(7): 619-27.
24. Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ. Oral candidal carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. *Diabetic Medicine: a Journal of the British Diabetic Association*. 1999 Aug; 16(8): 675-9.
25. Suarez BL, Alvarez MI, de Bernal M, Collazos A. *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. *Colombia Médica*. 2013 Jan; 44(1): 26-30.
26. Urizar AJM. Candidosis orales. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2002; 19(19): 17-21.
27. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics: Official Journal of the American College of Prosthodontists*. 2011 Jun; 20(4): 251-60.
28. Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: II. Prevalence and characteristics of *Candida* and Candidal lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2000 May; 89(5): 570-6.
29. Khosravi AR, Yarahmadib S, Baiata M, Shokria H, Pourkabirehc M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. *Journal de Mycologie Medicale*. 2008; 18(2): 6.
30. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiology and Immunology*. 2002 Jun; 17(3): 181-5.

Recibido: 14 de mayo de 2017.

Aprobado: 10 de noviembre de 2017.

Indira Llanos González. Grupo de Micología. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Campus de Zaragocilla, Facultad de Medicina. Cartagena de Indias, Colombia. Correos electrónicos: angexill25@hotmail.com
psuarez@unicartagena.edu.co