



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**COEXISTENCIA DE HONGOS Y BACTERIAS EN PLIEGUES
INTERDIGITALES DE PACIENTES DIABÉTICOS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

José Fernando Manjarrez Ojeda

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS

VOCAL: MISAEL GONZÁLEZ IBARRA

SECRETARIO: MARÍA DE LOS ANGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

1er. SUPLENTE: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

2° SUPLENTE: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Institución que colaboró: Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

ASESOR DEL TEMA:

María de los Angeles Patricia Manzano Gayosso

SUSTENTANTE (S):

José Fernando Manjarrez Ojeda

Agradecimientos

Este trabajo estuvo incluido en el proyecto IN215615 apoyado por PAPIIT bajo la dirección de la Dra. Patricia Manzano Gayosso.

Al programa de apoyo PAPIME PE202414, bajo la dirección de la Dra. Laura Rosio Castañón Olivares, por la beca otorgada durante un mes.

ÍNDICE

1. Antecedentes	1
1.1. Diabetes	1
1.1.1. Definición	1
1.1.2. Historia	1
1.1.3. Prevalencia	1
1.1.4. Patogenia	2
1.1.5. Complicaciones	3
1.1.5.1. Neuropatía diabética	4
1.1.5.2. Intertrigo	6
1.2. Agentes etiológicos	7
1.2.1. Hongos levaduriformes y filamentosos dermatofitos	7
1.2.1.1. Género <i>Candida</i>	7
1.2.1.1.1. Hábitat natural	8
1.2.1.1.2. Métodos de identificación	9
1.2.1.2. Género <i>Trichosporon</i>	11
1.2.1.2.1. Morfología macroscópica	11
1.2.1.2.2. Morfología microscópica	12
1.2.1.2.3. Manifestaciones clínicas	12
1.2.1.3. Dermatófitos	14
1.2.1.3.1. Género <i>Trichophyton</i>	14
1.2.1.3.2. Género <i>Epidermophyton</i>	16
1.2.2. Bacterias	17
1.3. Microorganismos comensales y colonizantes en los pliegues interdigitales	18
1.4. Factores de virulencia de los hongos	23
1.4.1. Biopelículas	25
2. Planteamiento del problema	28
3. Objetivos	29
3.1. Objetivo general	29

3.2. Objetivos particulares	29
4. Material y métodos	30
5. Resultados	41
6. Discusión	60
7. Conclusiones	65
8. Abreviaturas	66
9. Anexos	67
10. Bibliografía	73

1. Antecedentes

1.1. Diabetes

1.1.1. Definición

La Organización mundial de la salud, define a la diabetes como una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce [1].

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 define a esta patología como la enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, caracterizada por hiperglucemia crónica secundaria a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas [2].

1.1.2. Historia

Desde 1500 a. C. existen referencias de la población con diabetes, conocida como “exceso de orina”. Diabetes es una palabra que procede del griego (diabetés) que se forma del prefijo “dia” que significa a través, “báino”, ir y “tes”, agente, es decir “lo que va a través”. Celso fue el primero que describió la enfermedad en el siglo I a. C. dándole el nombre de “urinae nimia profusio” (flujo de orina). En el siglo I d. C, el médico romano Arateus acuñó el término diabetes (agua pasando a través de un sifón, lo que hace alusión a la poliuria). Galeno en el siglo II d. C. empleó la palabra “diapsacon”, de “diapso” que significa “sed”, es otra de las manifestaciones que caracteriza a la diabetes. En la medicina hindú fue conocida como “orina de miel”. Durante el siglo XVIII, el médico escocés William Cullen con base en sus investigaciones decidió agregarle el término “mellitus” (miel) y desde entonces este padecimiento es conocido como diabetes mellitus [3].

1.1.3. Prevalencia

La diabetes está aumentando en todo el mundo, en particular en los países en desarrollo. Las causas son complejas, pero en gran parte están relacionadas con

el rápido aumento del sobrepeso, la obesidad y la inactividad física. Sin embargo, una gran proporción de casos de diabetes y sus complicaciones se pueden prevenir con una dieta saludable, actividad física regular, mantenimiento de un peso corporal normal y evitar el tabaco [1].

La Federación Internacional de la Diabetes reporta que una de cada once personas tiene esta enfermedad. Además, se estima que 387 millones de personas padecen diabetes mellitus (DM). Ésta ha considerado que para el año 2040 existan 642 millones de personas con esta enfermedad [4]. La diabetes tipo 2 (DM2) representa aproximadamente el 90% de los casos mundiales de diabetes. Los casos de diabetes tipo 2 en niños, que antes eran raros, han aumentado en todo el mundo. En algunos países representan casi la mitad de los nuevos casos diagnosticados en niños y adolescentes [1].

La federación Internacional de la Diabetes reporta una prevalencia del 15.8% para México [4].

Mundialmente se ha descrito que la DM es la quinta causa de defunción, se estima el 5.2% de todas las muertes. Por otro lado, se calculan 5 millones, considerando la defunción de una persona cada 7 segundos. En México, en el 2011 se consideró la segunda causa de muerte. De cada 100 mil personas que mueren, 70 fallecieron por diabetes. Las tasas de mortalidad más altas se presentaron en la Ciudad de México (99.57 de cada 100 mil personas) [3].

1.1.4. Patogenia

En la figura 1 se muestra el mecanismo para mantener los niveles normales glucosa en sangre. La función normal del cuerpo humano depende de un control estricto en los niveles de glucosa en sangre. El mecanismo que se lleva a cabo es mediante una red altamente sofisticada de varias hormonas y neuropéptidos liberados principalmente por el cerebro, páncreas, el hígado, el intestino, así como el tejido adiposo y muscular. El páncreas representa una pieza clave al secretar la hormona insulina para disminuir las concentraciones de glucosa en la sangre; a su vez también secreta glucagón que favorece un efecto contrario. Sin embargo, las

alteraciones en la interacción de las hormonas y péptidos implicados pueden conducir a trastornos metabólicos como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [5].

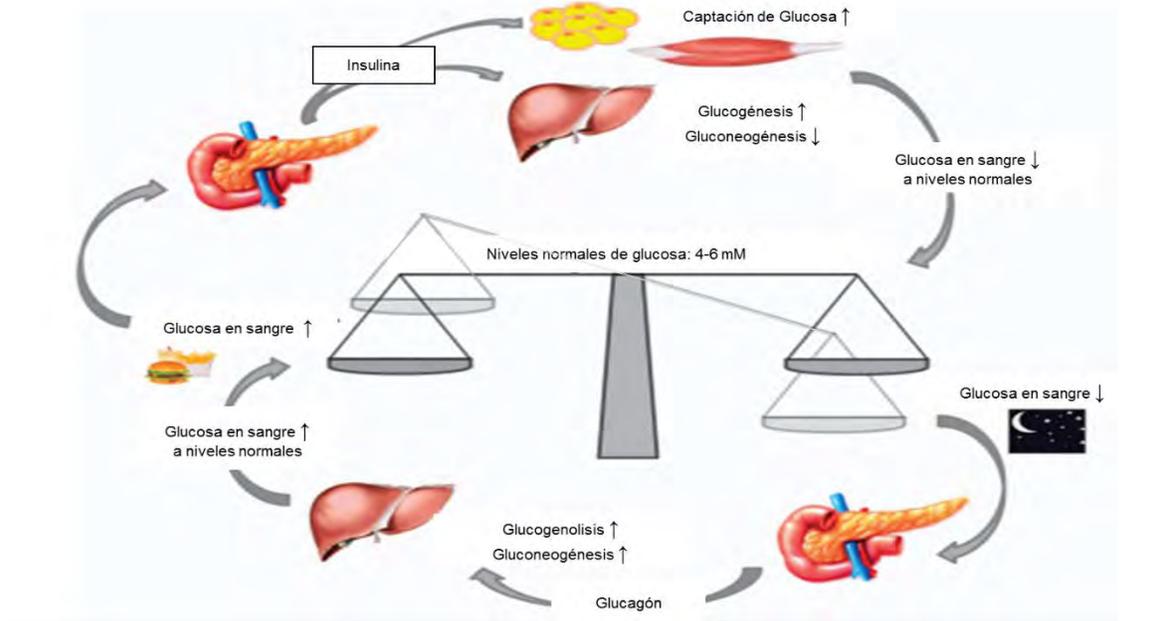


Figura 1. Mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre por el glucagón y la insulina. Tomada de Röder y cols. 2016 [5].

El páncreas secreta glucagón, cuando los niveles de glucosa en la sangre son bajos. Los niveles de glucosa en la sangre aumentan a través de la glucogenólisis endógena. Después de una comida, los niveles de glucosa exógena en sangre son altos, de tal manera, la insulina se libera para captar glucosa en los tejidos musculares y adiposos dependientes de la insulina, así como para promover la glucogénesis [5].

1.1.5. Complicaciones de la Diabetes

Las complicaciones en la DM2 se presentan por un desequilibrio en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, en la secreción de insulina o la resistencia de ésta o ambas. La presentación clínica, fisiopatología subyacente y la progresión de la enfermedad en estos pacientes puede variar considerablemente, en ocasiones los síntomas son atípicos, de tal manera que

puede dificultar el diagnóstico de la DM2 y por ende las complicaciones. En el estudio diagnóstico de la DM2, muchos pacientes con esta enfermedad son asintomáticos, mientras que otros presentan hiperglucemia grave o incluso cetoacidosis diabética [6]. La diabetes induce los cambios en los microvasos, afectando la membrana basal de los capilares y de las arteriolas en los glomérulos, la retina, el miocardio, la piel y el músculo, mediante el aumento de su espesor, lo que resulta en el desarrollo de la microangiopatía diabética. Este engrosamiento conduce a la anormalidad en función de los vasos, lo que provoca hipertensión, retraso en la cicatrización de heridas, e hipoxia en los tejidos [7].

Las complicaciones de la DM se clasifican en dos grandes grupos: A) Alteraciones vasculares y B) Alteraciones no vasculares. En el primer grupo se incluyen cambios anatómicos, estructurales y funcionales, lo que da como resultado disfunción multiorgánica. Las entidades más comunes son neuropatía, retinopatía, nefropatía, alteraciones cardiovasculares y enfermedad vascular periférica [8].

En los pacientes con DM, quienes presentan la asociación de complicaciones microvasculares aumentan el riesgo de accidente cerebro vascular y muerte prematura.

1.1.5.1. Neuropatía diabética

Neuropatía es una palabra griega que viene de “neuron”, nervio y “páthos”, enfermedad. Esta complicación es una de las principales causas de morbilidad asociada a la DM (30-70%), la cual se define como un conjunto de trastornos nerviosos, con alteraciones de la sensibilidad de predominio en las piernas y en los pies, y solo algunos de los pacientes manifestaron dolor. Una tercera parte de ellos cursan con neuropatía periférica, distal y proximal [9] [10] [11] [12].

La presentación clínica de la neuropatía diabética es muy variable y de causa heterogénea, ya que puede afectar de manera focal o difusa diferentes áreas del sistema nervioso [13]. En el cuadro 1 se describe la serie de eventos que explica el daño a la inervación sensitivo-motora y autónoma. Las primeras fibras que se afectan son las de pequeño tamaño, lo que da como resultado una pérdida en la

sensibilidad al dolor y térmica. Posteriormente la lesión en las fibras nerviosas de mayor tamaño ocasiona una pérdida de la sensibilidad vibratoria y de la superficial. En consecuencia, estas alteraciones provocan que los pacientes diabéticos no perciban las heridas en sus pies, ocasionadas por traumatismos repetidos o a cuerpos extraños [14].

Cuadro 1. Patogénesis de la neuropatía diabética por la alteración de dos eventos mayores. Tomada de Fazan y cols [10].

Etiología vascular	Etiología metabólica
Hiper glucemia	Hiper glucemia/hipoinsulinemia
↑ Resistencia vascular endoneural	Dislipidemia
↓ Flujo sanguíneo de los nervios (hipoxia endoneural)	↑ Actividad de aldolasa reductasa (↑ polioles, ↓ mio-inositol)
Disfunción endotelial (↓ prostaciclina y óxido nítrico, ↑ endotelio)	↓ Nervio, sodio-potasio ATP-asa
Glicosilación avanzada de la pared de los vasos	↓ Velocidad de síntesis y transporte de proteínas intra - axonal
Engrosamiento de la membrana	↑ Acumulación de glucógeno
Edema de las células endoteliales y degeneración del pericito	↑ Glicosilación monoenzimática de las proteínas al nervio periférico
Capilares cerrados (colapsados)	↓ Incorporación de los glicolípidos y aminoácidos a la mielina
Trombos de plaquetas oclusivas	Metabolismo anormal del inositol y los lípidos
Aterosclerosis epineural	↓ Niveles L-carnitina en el nervio
↑ Actividad de radicales libres de oxígeno	↑ Actividad protein-cinasa

La hiperglucemia crónica, es un evento crucial en el daño a los tejidos, explicado de la siguiente manera: parte del exceso de glucosa se combina con aminoácidos de las proteínas tisulares o circulantes mediante un proceso no enzimático que da lugar a formas reversibles como los productos de Amadori y bases de Schiff, los cuales sufren un reordenamiento químico para formar productos terminales de glicosilación avanzada (AGE, siglas en inglés). En los pacientes con diabetes, los niveles de AGE están aumentados, estos producen cambios estructurales de la matriz extracelular, lo que provoca alteraciones funcionales nerviosas y vasculares [13].

La alteración de la inervación autónoma ocasiona anhidrosis del pie por lesión en las fibras nerviosas post-ganglionares que inervan las glándulas sudoríparas. La anhidrosis conduce a una sequedad extrema del pie y a menudo a la aparición de grietas o fisuras en la piel que pueden representar la puerta de entrada para agentes infecciosos (colonización por hongos y/o bacterias en pliegues interdigitales de los pies) [9] [14].

En EUA se ha reportado que el 20% de los pacientes diabéticos atendidos en hospitales generales ha sido por úlceras cutáneas en los pies. En estos pacientes las amputaciones son 15 veces más probables [10]. En el reporte de Chellan y cols describieron que el 85% de las amputaciones de las piernas en los pacientes con DM2 estuvieron precedidas por infecciones polimicrobianas asociadas a biopelículas [15].

Las úlceras del pie diabético son un problema clínico común, se presentan en el 15% de los pacientes con diabetes mellitus, con una incidencia anual de 1-2%. La patogénesis de las úlceras se ha atribuido a diversos factores: neuropatía, trauma repetido y secundario a una enfermedad vascular periférica [16].

1.1.5.2. Intertrigo

Es una patología que afecta con mayor frecuencia a pacientes con obesidad, diabetes mellitus y en pacientes con diversas inmunodeficiencias. El intertrigo es un proceso inflamatorio que se presenta en cualquier pliegue de la piel

(antecubital, poplíteo, umbilical, perineal, del cuello e interdigitales) y es causado por la fricción constante entre dos superficies cutáneas. La humedad constante es retenida en los pliegues, la maceración y la irritación se explica por la acumulación de detritus celulares; estos cambios son los principales factores que predisponen a esta patología [17]. El intertrigo en los pliegues de los pies es un trastorno común (7-53%) en climas calurosos, por las condiciones de oclusión. En un estudio realizado en 125 pacientes con DM2 el intertrigo de etiología diversa se presentó en el 10% de los casos [18]. Por otro lado, en población militar reportaron intertrigo interdigital por hongos en el 2.9% de los casos estudiados [19].

Las manifestaciones clínicas del intertrigo interdigital se pueden presentar como una erupción eritematosa descamativa crónica, o como una erupción inflamatoria, exudativa y maceración [20]. Los microorganismos que causan intertrigo interdigital pueden ser de naturaleza fúngica o bacteriana. El diagnóstico clínico diferencial es difícil, ya que puede ser una infección interdigital que corresponda a diversas etiologías: intertrigo por dermatofitos, *Candida*, *Trichosporon* o una infección bacteriana [21].

1.2. Agentes etiológicos

En la siguiente sección solo se describirán algunos de los aspectos relevantes de los hongos y bacterias, comensales y/o colonizantes en los pliegues interdigitales.

1.2.1. Hongos levaduriformes y filamentosos dermatofitos

1.2.1.1. Género *Candida*

Los hongos levaduriformes son organismos unicelulares, aerobios, la mayoría carecen de pigmentos melánicos y/o carotenoides. El género *Candida* incluye cerca de 200 especies, de éstas, 4 especies son las más comunes causantes de infecciones humanas (Cuadro 3). Las especies de *Candida* son células que presentan forma variable: elíptica, globosa, cilíndrica, ovoide; su tamaño varía según la especie, en general oscila entre 2-7 x 3-8 μm , siendo *C. glabrata* la más pequeña con un tamaño de 2 x 3.5 μm [22]. Algunas especies pueden formar pseudohifas e hifas con excepción de *C. glabrata* [23] [24] [25]. La

pared celular constituye el 30% del peso seco de la célula compuesta por dos capas [26].

Cuadro 3. Frecuencia de las especies de *Candida*.

Frecuencia	Especies
Común	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>
Infrecuente	<i>C. krusei</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. rugosa</i> <i>C. orthopsilosis</i> <i>C. metapsilosis</i>
Rara	<i>C. famata</i> <i>C. inconspicua</i> <i>C. kefyr</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. norvegensis</i> <i>C. haemulonii</i>

1.2.1.1.1. Hábitat natural

En general las especies de *Candida* son comensales de la mucosa bucal, del tracto gastrointestinal y tercio inferior de las vías urinarias, del canal vaginal y de la piel [27]. *C. albicans* es la principal especie que ha sido aislada de diversas regiones anatómicas en individuos sanos: boca, 56%, vagina 40%, región ano-rectal 24% y pliegues interdigitales 3%. El porcentaje de aislamiento depende de la población estudiada, edad, del método de muestreo y de la presencia de algunos dispositivos médicos [28] [29]. Esta especie es capaz de causar infecciones localizadas, diseminadas y/o invasivas, las manifestaciones clínicas son inespecíficas, y dependerá del órgano afectado.

En las dos últimas décadas se ha observado la disminución en la frecuencia de aislamientos de *C. albicans*, hecho que se ha tratado de explicar por diversos factores, entre ellos la resistencia a fármacos, de manera que hoy en día el grupo denominado *Candida no albicans* está en aumento.

Candida albicans es la especie ejemplo que más ha sido estudiada y a la que se le han descrito el mayor número de factores de virulencia.

Las infecciones causadas por las especies de *Candida no albicans* han aumentado progresivamente, caracterizándose por provocar cuadros clínicos graves. *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. lusitaniae* son las especies de mayor relevancia clínica [30].

1.2.1.1.2. Métodos de identificación

- a) Para la identificación fenotípica macroscópica se utilizan medios de cultivo como el agar dextrosa Sabouraud, en el cual se observa colonias de crecimiento rápido (2 a 3 días a 28 o 35°C), limitadas, planas, de color blanco o crema, húmedas, lisas, en algunos casos rugosas, butirosas, brillantes y opacas. Algunos otros medios de cultivo son necesarios para el aislamiento primario, conidiación, conservación como: agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, agar sangre, agar infusión de cerebro corazón, agar extracto de levadura, caldo tripticasa soya, agar Mueller-Hinton y agar papa dextrosa (Cuadro 4)
- b) Para el estudio de la morfología microscópica (blastoconidios y pseudohifas, formación de tubo germinativo y clamidoconidios) se emplean diversos medios: agar harina de maíz con Tween 80 al 1%, agar tabaco, agar Mueller-Hinton, agar Staib, agar avena, y suero humano (Cuadro 4).
- c) Actividad fisiológica en medios cromógenos: CHROMagar candida™, CAN2, Candiselect y agar brillante Candida). La identificación presuntiva se basa en la coloración de las colonias, cuyo fundamento es la reacción entre el sustrato cromógeno y las enzimas secretadas (hexosaminidasa y fosfatasa alcalina) por la levadura. Por este medio se

identifican 3 especies (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) a las 48 horas de incubación a 37°C [31]. Otros autores sugieren que también es posible identificar a *C. dubliniensis* y a *C. glabrata* (Cuadro 4) [32] [33].

Cuadro 4. Características morfológicas y fisiológicas de algunas especies de *Candida*.

Especies	Color en CHROMagar <i>Candida</i> ™	Crecimiento en ADS-A	Filamentación en suero	Formación de clamidoconidios
<i>C. albicans</i>	Verde	+	Tubo germinativo	+
<i>C. dubliniensis</i>	Verde	+	Tubo germinativo	+
<i>C. parapsilosis</i>	Rosa pálido	-	Blastoconidios	-
<i>C. glabrata</i>	Morado, violeta, púrpura	-	Blastoconidios	-
<i>C. tropicalis</i>	Azul metálico	+	Blastoconidios y pseudohifas	-
<i>C. krusei</i>	Rosa (colonias planas y secas)	+	Blastoconidios alargados	-
<i>C. lusitanae</i>	Rosado, púrpura	-	Blastoconidios	-
<i>C. haemulonii</i>	Rosa pálido	+	Blastoconidios	-

ADS-A: agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol

- d) Perfiles bioquímicos: auxogramas y zimogramas los cuales se realizan por métodos automatizados (Vitek2, Phoenix 100) o manuales (Rapid ID, API® 20 AUX y API® C 32).
- e) Métodos moleculares: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Hibridación con sondas, enzimas de restricción (RFLP “restriction fragment length polymorphism”), “fingerprinting” del DNA con sondas Ca3 con una sensibilidad de 1 ng de DNA y una especificidad que va del 90-100% [34] [35].

1.2.1.2. Género *Trichosporon*

Las especies del género *Trichosporon* son levaduras con amplia distribución en la naturaleza, viven como saprófitos en diversos sustratos: suelo, aire, agua (ríos y lagos), madera en descomposición, vegetales, animales o sus excretas. En el humano es parte de la biota normal; se ha aislado de cavidad bucal, tracto digestivo, tracto vaginal, coloniza de manera transitoria vías respiratorias altas, y en la piel predomina en región perianal en el 11% de los individuos sanos [36].

En la actualidad se han descrito 50 especies del género *Trichosporon*, de las cuales sólo 16 son potencialmente patógenas para el humano. Las especies más relevantes son: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. dermatis*, *T. domesticum*, *T. inkin*, *T. jirovecii*, *T. loubieri*, *T. montevideense*, *T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*, *T. mycotoxinovorans* y *T. faecale* [37] [36].

1.2.1.2.1. Morfología macroscópica

Las colonias son generalmente elevadas, de apariencia membranosa, secas, húmedas, en la superficie forman surcos radiales y/o pliegues irregulares, de color blanca o crema. Para la identificación de las especies se necesitan estudios bioquímicos, mediante el uso de diversos sustratos; es fundamental la prueba de la urea (ureasa positiva), utilizan el inositol, reducen el tetrazolio; en general crecen a temperatura entre los 27 a los 37°C [35] [22].

1.2.1.2.2. Morfología microscópica

Las especies de *Trichosporon* forman artroconidios y artrobalstoconidios, los cuales se desarticulan de la hifa, el tamaño varía de 2-4 μm de diámetro, de forma ovoide, rectangular y/o redondeada en los polos, que al agruparse adoptan un patrón poliédrico [38]. La característica principal del género es la presencia de una pared multilamelar y un doliporo con o sin parentosoma. Expresan en la pared glucuronoxilomanana, este carbohidrato puede ser determinante para evadir a las células fagocíticas (neutrófilos y monocitos) del hospedero.

1.2.1.2.3. Manifestaciones clínicas

Diversas especies pueden causar infección superficial o invasiva, esta última asociada a un factor de riesgo del paciente. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas y dependerán del órgano afectado. En el cuadro 5 se describe la relación entre la infección, especie y factor de riesgo relacionado. Rodrigues y cols reportaron las levaduras de infección nosocomial, donde las especies de *Trichosporon* se aislaron en el 0.5% del total de pacientes estudiados y el 10.7% de las infecciones en mucosas [39]. El aislamiento de *Trichosporon* de los pliegues interdigitales va de 2.8 a 42%, principalmente *T. cutaneum* [36]. *Trichosporon dermatis* es comúnmente aislado de la piel o de la sangre en pacientes inmunosuprimidos [40] [41].

Cuadro 5. Infección humana causada por especies de *Trichosporon* y fuente de infección. Tomado de Colombo y cols [36].

Tipo de infección	Infección causada por <i>Trichosporon</i>	Especie causal	Factor de riesgo y/o co-morbilidad
Invasiva	Fungemia, vías urinarias, peritonitis, endocarditis, etc.	<i>T. asahii</i> , <i>T. mucoides</i> , <i>T. asteroides</i>	Cáncer, catéter venoso y urinario, trasplante de órganos, uso de antibióticos de amplio espectro
Neumonía alérgica	Neumonía por hipersensibilidad (verano)	<i>T. cutaneum</i>	Calor y humedad, contaminación ambiental
Superficial	Piedra blanca	<i>T. inkin</i> , <i>T. cutaneum</i> , <i>T. ovoides</i> , <i>T. loubieri</i> .	Mujer joven, pelo largo, humedad intensa, higiene deficiente, uso de diademas

Para la identificación de las especies de *Trichosporon*, se realiza un procesamiento similar al de las especies del género *Candida*, aunque las pruebas morfológicas y bioquímicas, generalmente no son suficientes para diferenciarlas. Otros métodos sugeridos son: biología molecular por PCR y secuenciación [42]. Desde el año 1980 se ha empleado el uso de espectrometría de masas (MALDI-TOF) [43]. Suh y cols en 2015 demostraron la separación de dos especies por este método: *T. dermatis* y *T. mucoides* con una sensibilidad del 100%, ya que por las características fenotípicas y la asimilación de diversos sustratos no es posible la diferenciación [44].

1.2.1.3. Dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo de hongos que presentan afinidad por la queratina del tejido humano y otros animales, se dividen en tres géneros por las características morfológicas de sus macroconidios: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Estos hongos tienen cierta preferencia por el hospedero que parasitan, lo cual determina el hábitat natural (artropofílicos, geofílicos y zoofílicos) [45] [30]. Los dermatofitos son los principales hongos causantes de micosis superficiales por su capacidad para utilizar la proteína (queratina) como sustrato del tejido queratinizado del humano y otros animales. La identificación de las especies se basa principalmente en las características morfológicas, tanto macroscópicas (aspecto, tamaño y color de la colonia, y producción de pigmento) como microscópicas (forma, tamaño y disposición de los conidios, presencia de clamidoconidios y modalidad de las hifas: “espiral”, en “raqueta” y peridiales) [46].

1.2.1.3.1. Género *Trichophyton*

Algunas de las especies integrantes de este género, se caracterizan por tener numerosos microconidios, globosos o piriformes, de 2 a 4 μm de diámetro y escasos macroconidios de paredes delgadas, alargados y redondeados en su polo distal, de 4-8 por 8-50 μm . *Trichophyton rubrum* es la especie antropofílica más común, se caracteriza por su gran variabilidad morfológica. Las colonias son de lento crecimiento, de aspecto algodonoso, de color blanco, con difusión de un pigmento “rojizo” al reverso; algunos aislados llegan a producir un pigmento melanoide. Microscópicamente las hifas son septadas, delgadas y con escasos microconidios dispuestos de manera alterna sobre la hifa conidiógena (Figura 2) [47] [48].

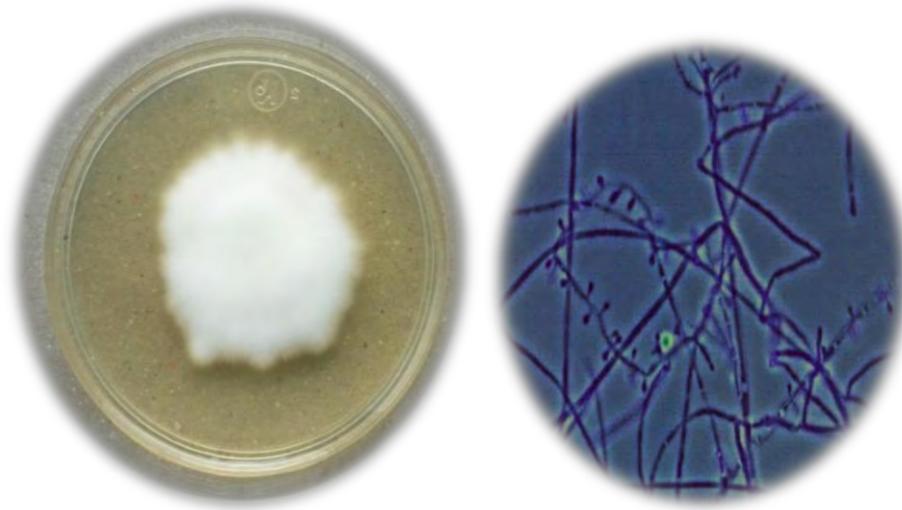


Figura 2. *Trichophyton rubrum*. Morfología Macro y microscópica.

Trichophyton interdigitale (antes *T. mentagrophytes*) es el nombre que actualmente se recomienda utilizar para denominar a esta especie, ya que es indistinguible diferenciar entre las diversas variedades morfológicas descritas de acuerdo con la afinidad por el hospedero. A excepción de *Trichophyton mentagrophytes* variedad *quinckeanum* al cual se le denominará *T. mentagrophytes* [49]. En general, por el aspecto de las colonias se han descrito dos variedades morfológicas. Las colonias de los aislados antropofílicos son de aspecto velloso o algodonoso, de color blanco cremoso y pulverulento en la periferia. Las zoofílicas son granuladas, de color blanco cremoso, pulverulentas; al reverso de la colonia se aprecia un color de matiz rojizo o marrón. Microscópicamente se observan numerosos microconidios redondos, los cuales se distribuyen en cúmulos, y otros piriformes a lo largo de las hifas conidiógenas. Los macroconidios son escasos, cilíndricos y de paredes delgadas. Las hifas en espiral son un hallazgo común (Figura 3) [47] [48].

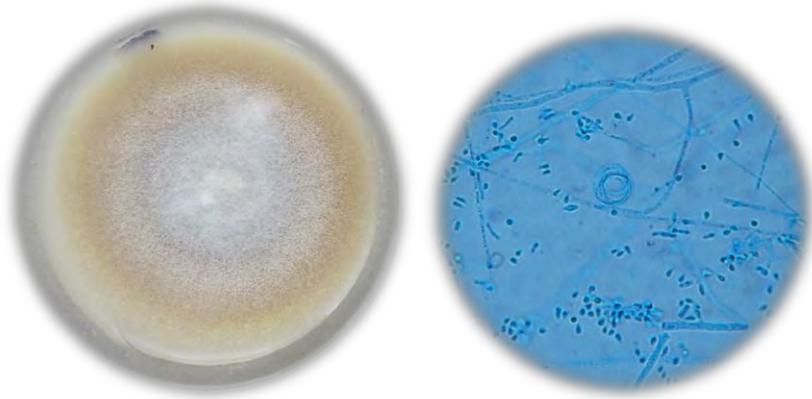


Figura 3. *Trichophyton interdigitale*. Morfología Macro y microscópica

1.2.1.3.2. Género *Epidermophyton*

Este género tiene una sola especie patógena para los humanos, *Epidermophyton floccosum* es un dermatofito antropofílico; se caracteriza por desarrollar colonias vellosas, de superficie radiada y finamente pulverulentas, de color verdoso. Las colonias conservadas por tiempo prolongado o envejecidas presentan una superficie plegada. La morfología microscópica está constituida por la producción de macroconidios en forma de “clava”, con un extremo redondeado y agrupados en racimo, de tamaño entre 7-12 por 20-40 μm de diámetro, de paredes delgadas. Esta especie carece de microconidios (Figura 4) [47] [48] [37].

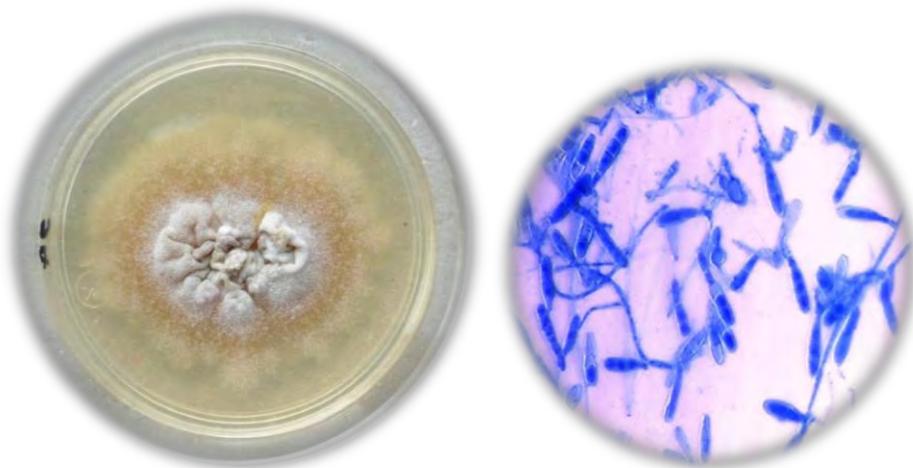


Figura 4. *Epidermophyton floccosum*. Morfología Macro y microscópica.

1.2.2. Bacterias

Mundialmente se ha descrito que las bacterias son responsables de la muerte de millones de personas. Algunas enfermedades infecciosas bacterianas, han causado grandes epidemias que han mermado la población como: la difteria, cólera, tuberculosis, sífilis, tétanos, tos ferina, y fiebre tifoidea. Sin embargo, también existen infecciones bacterianas que son un problema de salud pública en países en vías de desarrollo, las cuales están asociadas en menor frecuencia como causa de muerte como: *Campilobacter* sp., *Legionella* sp., *Helicobacter pylori*, entre otras, las cuales son consideradas emergentes [50].

Otro aspecto relevante de las bacterias, es el papel que juegan como parte de la microbiota del cuerpo humano. Las bacterias constituyen una proporción significativa con respecto al peso corporal de los diferentes hospederos, se calcula que va desde 0.5 hasta 2.5 kg [51].

La piel tiene una superficie aproximadamente de 1.5 a 2 m², apta para la colonización bacteriana, aunque la distribución de las bacterias comensales no es uniforme, debido a la gran variación en la humedad de las diferentes regiones de la superficie corporal. En general, las áreas anatómicas con mayor humedad son las que presentan una mayor carga bacteriana [52].

Las funciones de las bacterias comensales de la piel son múltiples como: a) Homeostasis, es decir, interviene en la defensa contra las infecciones por otras bacterias, por medio de interferencia bacteriana; b) Actividad sobre la degradación de lípidos en la superficie cutánea favoreciendo la función barrera de la piel; c) Degradan componentes de la secreción de las glándulas apócrinas, siendo responsables directas de la producción del olor de cada individuo [53].

La microbiota se divide en 2 grandes grupos: residente y transitoria. Los organismos que presentan capacidad de multiplicarse y sobrevivir adheridos a la superficie cutánea son los llamados residentes, los cuales se encuentran como constituyentes dominantes de la piel. La microbiota transitoria procedente del medio ambiente simplemente es depositada en la superficie de la piel y no tienen la capacidad de adherirse a ella. La microbiota comensal se divide en 2 grandes grupos bacterianos. El mayor, conformado por bacterias corineformes y por

Staphylococcus; y el grupo menor por *Micrococcus*. Por otro lado, la microbiota transitoria se encuentra representada principalmente por bacterias Gram (+) (*Streptococcus* del grupo A y *Staphylococcus aureus*) [53]. También se ha descrito el grupo de bacterias residentes temporales de la superficie de la piel, son aquellas que colonizan la superficie en grandes cantidades y por largos periodos de tiempo. Las bacterias consideradas comensales o no patógenas pueden causar infecciones cuando se presenta ruptura de la integridad de la piel, uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, cronicidad de la infección o por algún factor de inmunosupresión [54]. Estos aspectos pueden asociarse a un alto riesgo de aparición de microorganismos multirresistentes [55]. En pacientes con DM las infecciones bacterianas son la principal causa de amputación de extremidades [56].

1.3. Microorganismos comensales y colonizantes en los pliegues interdigitales.

Las bacterias y los hongos son abundantes en la naturaleza y conviven en entornos naturales. Las interacciones entre ambos microorganismos son dinámicas en cualquier ambiente, y su resultado determina las especies que van a sobrevivir y proliferar. Estas interacciones pueden ser de carácter sinérgico o antagónico [16]. Los microorganismos raramente existen como especies únicas (en forma planctónica); la mayoría se encuentran en comunidades complejas formando biopelículas [56]. Los hongos y bacterias cubren la superficie de la piel, habitan en la porción terminal y alrededor de los orificios de salida de los folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas [57]. Estos microorganismos comensales de la piel utilizan los nutrientes que están disponibles en ese sitio y en general, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones hostiles. Por ejemplo, aunque el sudor contiene sal y numerosas moléculas antibacterianas, algunas cepas de *Staphylococcus epidermidis* (microorganismo simbiótico predominante de la piel) pueden tolerar altas concentraciones de sal e incluso utilizar la urea que está presente en el sudor como fuente de nutrientes. La diversidad fúngica es dependiente de la ubicación en el cuerpo y de la fisiología; por ejemplo, las especies de *Malassezia* son hongos que predominan en las áreas seboreicas del

cuerpo, mientras que en los pies están colonizados por diversas combinaciones de hongos y bacterias. Estos organismos pueden limitar la propagación de los patógenos (Figura 5) [57].

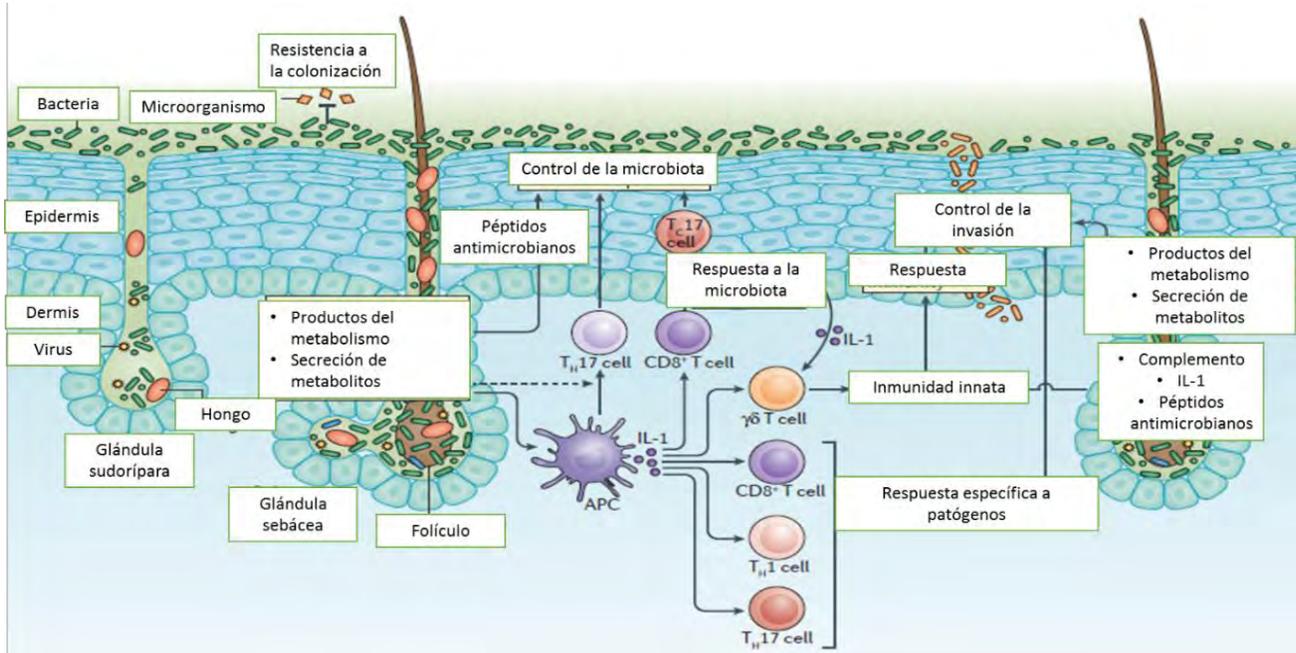


Figura 5. Estructura y componentes celulares de la piel y el control de los microorganismos comensales. Tomada de Belkaid y col [57].

Underhill y col en 2014 describieron la distribución de diferentes hongos en el cuerpo como se muestra en la figura 6. Los gráficos circulares indican las proporciones relativas de los géneros de hongos. Las poblaciones de hongos colonizantes en las superficies mucosas presentan una tendencia a ser más variada que los de la piel. Las especies de *Candida* fueron detectadas en todas las áreas anatómicas, principalmente representadas por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Otro de los hallazgos observados fue la mayor diversidad de hongos levaduriformes y filamentosos en los pies. En cambio, en otros sitios como el orificio nasal y la palma predominó una mayor diversidad de especies bacterianas [58].

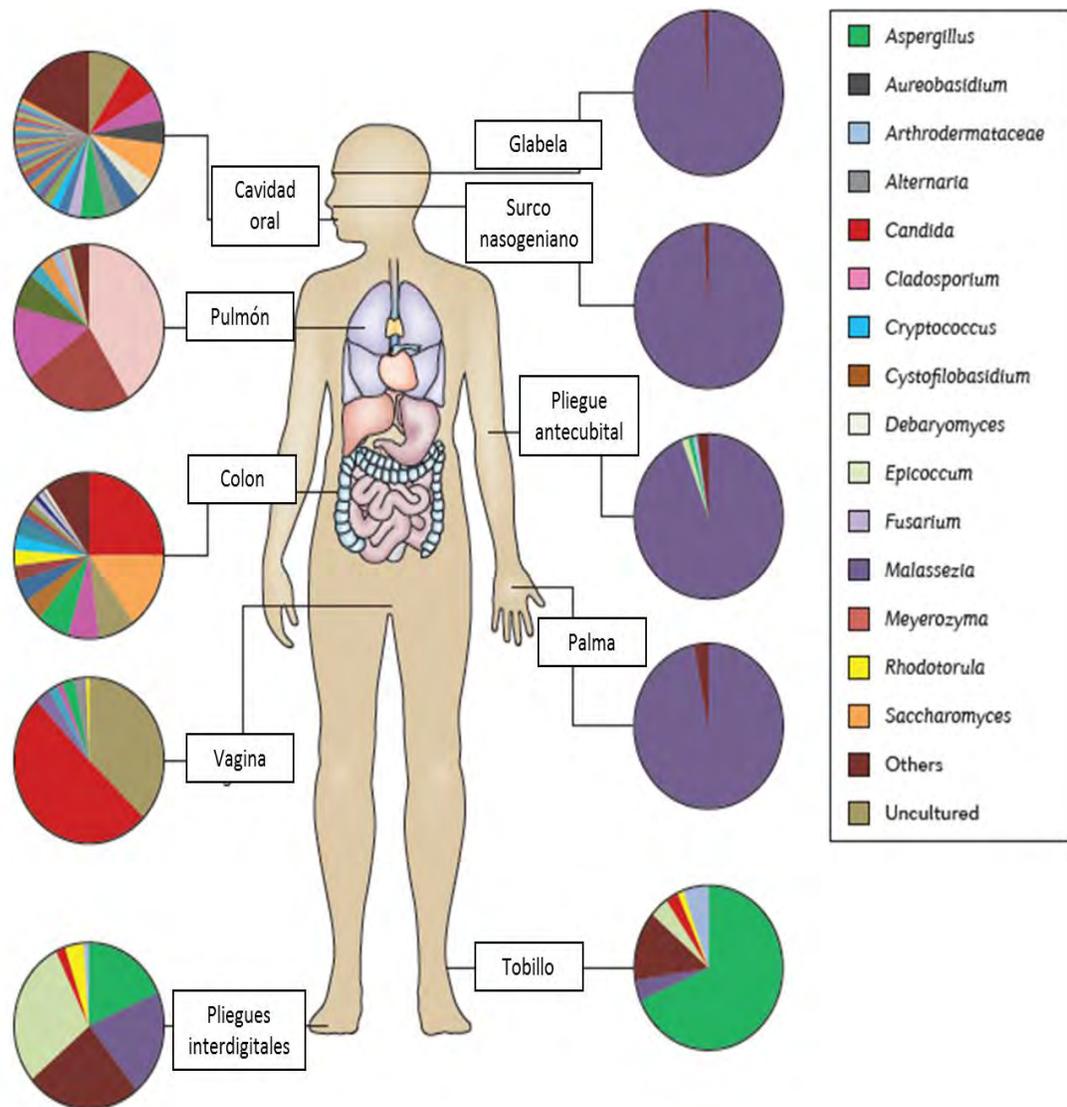


Figura 6. La microbiota en el humano. Tomada de Underhill y col [58].

Desde el punto de vista de los mecanismos de defensa del hospedero, la naturaleza y la integridad de los epitelios, la capacidad de las células para completar su ciclo celular, los factores inmunológicos y las interacciones entre los microorganismos patógenos y comensales, son importantes en el mantenimiento de la autoprotección contra los microorganismos. De las superficies de la piel normal, las áreas de los pliegues son más delgadas. Los bajos niveles de oxígeno se combinan con altos niveles de humedad y temperatura, provocando que estas áreas sean más adecuadas para la proliferación de microorganismos [54]. Las especies de *Staphylococcus*

representan el 70% del microbioma normal de la piel en el hospedero sano; la mayoría son especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos que son de baja virulencia y pueden competir con los más virulentos como *S. aureus*. La colonización por *S. aureus* puede llegar a causar fisuras y desencadenar la formación de úlceras. En cambio, en la piel de los pacientes diabéticos con úlceras unilaterales, sólo el 7% de la microbiota está representada por especies de *Staphylococcus*, es decir, se observa una disminución importante (90%) en los microorganismos de la biota comensal y es sustituida por otras especies patógenas [20] [59]. Mientras que, los hongos contribuyen al cambio en el microambiente local, causando la ruptura en la barrera cutánea. Ésto da lugar a la entrada de bacterias patógenas, causando una infección secundaria local (intertrigo y/o dermatomicosis) y a su vez, la diseminación a otros órganos [9].

Dependiendo de la interacción que se lleve a cabo entre los hongos y las bacterias, pueden mejorar o impedir el desarrollo o el efecto de factores de virulencia [16]. Los dermatofitos (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* y *Epidermophyton floccosum*) secretan compuestos parecidos a la penicilina inhibiendo el desarrollo de las bacterias comensales. Por otro lado, las bacterias secretan una variedad de enzimas proteolíticas y compuestos derivados del azufre (metanotiol y etanotiol) los cuales actúan como potentes compuestos antifúngicos [60].

Las infecciones polimicrobianas son mucho más complejas en su evolución, diagnóstico y tratamiento, en comparación a una infección causada por un solo agente microbiano [16].

En el cuadro 6 se muestra una revisión de la literatura de los últimos 15 años acerca de los microorganismos colonizantes en los pliegues interdigitales de individuos sanos y pacientes diabéticos.

Cuadro 6. Revisión de la literatura de microorganismos colonizantes en pliegues interdigitales de los pies.

Autor	Hospedero	Aportación
Egert y col. (2016) [61].	Sano	La piel es colonizada por microorganismos mesófilos, xerófilos, acidófilos, osmotolerantes, y aeróbicos facultativos.
Zarrin M. y col. (2014) [62].	Sano	100 de 470 mujeres sanas, presentaron hongos contaminantes. En 59 de las pacientes se aisló <i>C. parapsilosis</i>
Tüzün y col (2015) [54].	Sano	<i>Acinetobacter</i> spp. forman parte de la microbiota normal de la piel, en los pliegues axilares, inguinales e interdigitales, en el 20% de los individuos. Estas bacterias generalmente son patógenos oportunistas.
Mlinarić-Missoni E. y cols. (2005) [63].	Diabéticos	Colonización por hongos en 122 de 509 pacientes, de los cuales en 100 fueron levaduras
Redel H, y cols. (2013) [59].	Diabéticos	Las especies de <i>Staphylococcus</i> disminuyeron en pacientes diabéticos en comparación de hombres sanos
Underhill D, y col. (2014) [58].	Sano	Hongos presentes en la piel: <i>Malassezia</i> <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Candida</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Cladosporium</i> y <i>Mucor</i> .
Hassab-el-naby y cols. (2015) [64].	Pacientes con intertrigo interdigital	En 25 de 100 presentaron estructuras parasitarias de hongos.
Chellan G. y cols. (2010) [15].	Diabéticos	De 518 pacientes con lesiones en las extremidades inferiores. El 5.8% presentó infecciones solo por hongos; 58.3% por bacterias y en el 21.4% por ambos.
Sariguzel y cols. (2014) [65].	Pacientes con intertrigo interdigital	De 121 pacientes, <i>Trichophyton rubrum</i> se aisló en el 33.7%; <i>Corynebacterium minutissimum</i> en el 9.8%; <i>Trichophyton mentagrophytes</i> en el 2.4% y <i>Trichosporon</i> spp. en el 1.4%.

De acuerdo con diversas descripciones han hecho evidente que las manifestaciones clínicas de las infecciones por hongos son más graves en los pacientes con DM2 y la gama de agentes etiológicos es muy amplia (patógenos primarios y oportunistas) [63].

1.4. Factores de virulencia de los hongos

Los factores de virulencia son los mecanismos o las estrategias que ayudan a los hongos para adaptarse a las condiciones del tejido del hospedero, de tal manera que facilitan el crecimiento a temperaturas elevadas, la adquisición de nutrientes (degradación de proteínas como la albúmina), la adherencia, penetración, variación morfológica y difusión; por otro lado estos factores contribuyen a resistir la respuesta de la inmunidad innata (fagocitosis y complemento), la evasión de la respuesta inmune adaptativa y los factores de necrosis. La capacidad de un hongo para crecer a 37°C y a pH fisiológico son factores que poseen los hongos para invadir tejidos profundos; así como la transición a la forma parasitaria que es esencial en los hongos dimórficos [66].

Los hongos levaduriformes y los dermatofitos poseen una serie de propiedades que les otorgan virulencia. Estos factores actúan de manera secuencial otorgándoles la capacidad de adherirse al epitelio queratinizado, con la finalidad de degradar la queratina [67] [68].

En las infecciones por *Candida albicans* se han descrito cuatro etapas para explicar la patogenia:

1. Colonización. Los factores participantes son: A) La adhesión epitelial y adquisición de nutrientes por acción de adhesinas (ALS, Hwp1, Eap1, Iff4 y Ecm33 Mp65, β -glucanasa, Phr1, β -1,3 glucanosil transferasa, Ssa1); B) Enzimas hidrolíticas (Serin proteasas "Sap", lipasas, fosfolipasas); C) Formación de hifas y cambio de fenotipo [69].

2. Infección superficial. En esta etapa se inicia la degradación de proteínas de las células epiteliales del tejido del hospedero por enzimas hidrolíticas. El desarrollo de la hifa y penetración al epitelio.

3. Infección profunda. La participación de las enzimas hidrolíticas y la formación de hifas, para continuar con la invasión vascular y la evasión del sistema inmune.

4. Infección diseminada. Por la capacidad de *C. albicans* para adherirse al endotelio, la formación de hifas y cambio en su fenotipo, activación del sistema de coagulación por intervención de adhesinas, enzimas hidrolíticas. Todos son factores que favorecen la infección a los tejidos del hospedero [67].

Por otra parte, los dermatofitos poseen diversas propiedades que juegan un papel en el proceso de colonización e infección. En la revisión realizada por De la Calle y cols describieron las etapas que caracterizan a la infección por dermatofitos (adhesión, invasión y crecimiento) (Figura 7) [67].

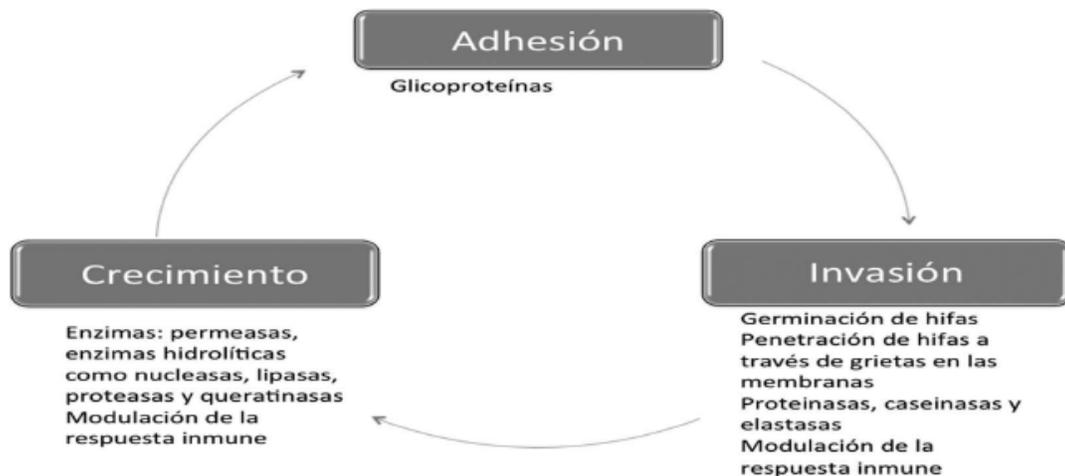


Figura 7. Factores de virulencia de los dermatofitos que están involucrados en las dermatofitosis. Tomada de De la Calle-Rodríguez y cols [67].

Aún es poco lo que se conoce acerca de los factores de virulencia implicados en las infecciones causadas por especies de *Trichosporon*. Levy Bentubo y col. en 2014 describieron la actividad de lipasas, fosfolipasas, proteasas y DNAsas, así como el efecto de la temperatura que podrían jugar un papel relevante en la patogenia de la infección [70]. Por otro lado, Iturrieta-Gonzales y cols demostraron que algunas especies (*T. inkin*, *T. asteroides*, *T. faecalis*) tienen la capacidad de adherirse y formar biopelículas [71].

1.4.1. Biopelículas

Los hongos levaduriformes (*Candida* spp. y *Trichosporon* spp.) y los dermatofitos, junto con las bacterias tienen en común la capacidad de formar biopelículas. Esta es una estructura compleja de asociaciones de microorganismos y sus productos extracelulares adheridos sobre una superficie biótica o abiótica [72]. Factor que posiblemente explique la versatilidad de algunos microorganismos para adaptarse a diferentes ambientes [73].

Diversos autores han estimado que del 60 al 80% de las infecciones humanas se deben a la formación de biopelículas. Estas infecciones representan un problema de salud pública, ya que los microorganismos unidos firmemente a la matriz extracelular son resistentes a los antimicrobianos y a la respuesta inmune del hospedero. Las biopelículas polimicrobianas se han detectado en la cavidad bucal, en las vías respiratorias, la piel, el tracto genito-urinario y en distintos dispositivos médicos aplicados a los pacientes hospitalizados [74].

En la figura 8 se muestra una imagen diseñada por Flemming y cols la cual ejemplifica las propiedades y componentes de la formación de la biopelícula en una superficie [75]. La mayor parte de la biomasa de la biopelícula está integrada por sustancias poliméricas extracelulares, componentes que van a determinar las propiedades mecánicas de la matriz y la actividad fisiológica de los microorganismos en la biopelícula. La matriz es la estructura encargada de captar recursos, como nutrientes. La adquisición de nutrientes es un proceso esencial para todos los organismos; con las biopelículas se ha desarrollado una estrategia

de captura muy eficiente. La estrategia se basa en la propiedad de absorción que presenta la matriz extracelular, similar a una esponja. Por este mecanismo se adquieren nutrientes, se realiza intercambio de gases y otras moléculas con el medio ambiente.

Las interacciones entre los microorganismos integrantes de la biopelícula pueden ser de varios tipos: a) Interacciones mutualistas, las cuales se observan en las subcomunidades durante el intercambio de aminoácidos y azúcares; b) Las interacciones sinérgicas entre las múltiples especies, favorecen la resistencia o tolerancia a los antimicrobianos. Estos términos "resistencia" y "tolerancia" se utilizan para referirse a la mayor capacidad de un organismo para sobrevivir a la exposición de diversos compuestos letales para los organismos susceptibles; c) Interacciones antagónicas en las cuales los microorganismos no pueden coexistir juntos, de tal manera que un microorganismo activará mecanismos para eliminar al otro microorganismo [76]. Estos procesos no se llevan a cabo en células planctónicas [75].

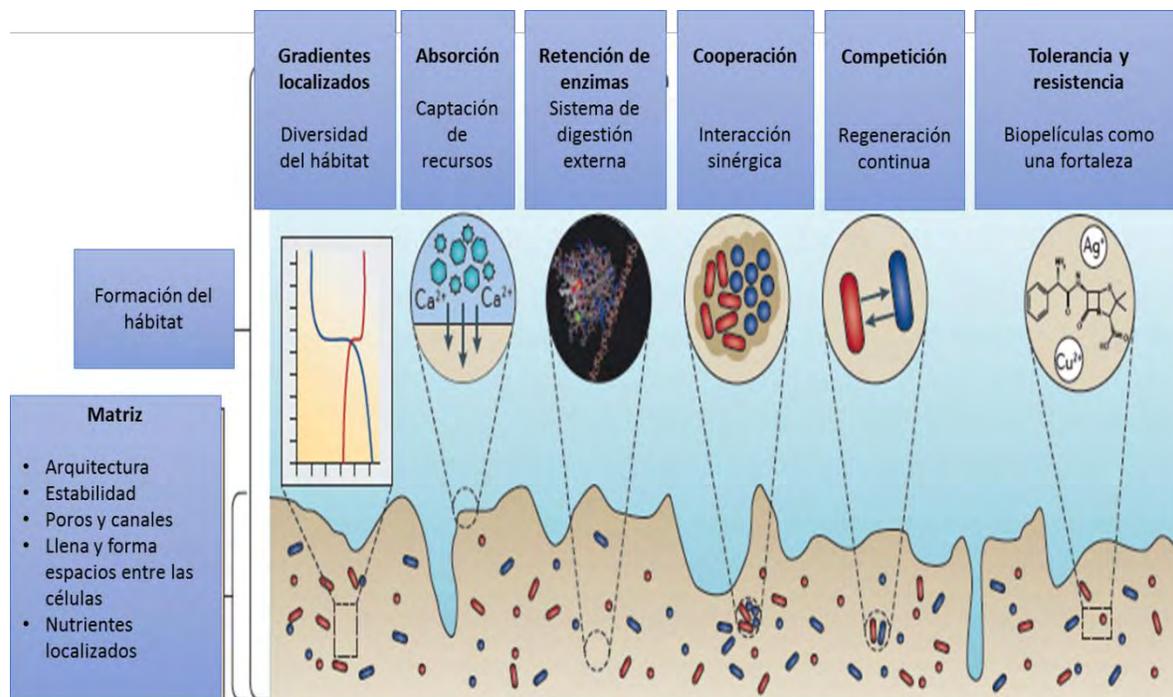


Figura 8. Propiedades de la biopelícula. Tomada de Flemming y cols [75].

En el cuadro 7 se muestran algunos estudios sobre la formación de biopelículas por *Candida* spp, *Trichosporon* spp. y dermatofitos.

Cuadro 7. Revisión en la literatura sobre las biopelículas formadas por *Candida* sp., *Trichosporon* sp. y los dermatofitos.

Autor	Hongo	Superficie	Técnica de detección	Formación biopelículas alta, baja o nula	Hallazgos
Chandra J. y col (2015) [77].	<i>Candida</i> sp.	Elastómero de silicona y polimetilmetacrilato	Microscopia de fluorescencia	-	Biopelículas formadas por hongo-hongo y hongo-bacteria
Di Bonaventura y cols (2006) [78].	<i>T. asahii</i>	Placas de poliestireno	Cuantificación de la biopelícula con XTT	Alta (adhesión de 30-120 min.	Resistente 16,000 veces más a VRZ en biopelícula en comparación con células planctónicas.
Costa-Orlandi y cols (2014) [79].	<i>T. rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i>	Placas de poliestireno de 24 pozos	Actividad metabólica con XTT, biomasa con cristal violeta y MEC por safranina	<i>T. rubrum</i> Buena	<i>T. rubrum</i> forma red de hifas, mayor resistencia.
Kumar y cols (2016) [80].	<i>Candida</i> sp.	Placas de poliestireno de 96 pozos	Actividad metabólica con XTT	<i>C. albicans</i> Buena	La biopelícula aumenta la resistencia
Ibarra-Trujillo y cols (2012) [72].	<i>C. albicans</i> y <i>S. aureus</i>	Placas de poliestireno de 96 pozos	Actividad metabólica con XTT	-	Ambos microorganismos tienen una interacción sinérgica

VRZ: voriconazol; XTT: reducción del tetrazolio; MEC: matriz extracelular

2. Planteamiento del problema

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica degenerativa que afecta aproximadamente a 11.5 millones de la población mexicana. Esta patología se caracteriza por hiperglucemia, causada por el déficit en la producción o en la acción de la insulina. En consecuencia, se van a desencadenar una serie de complicaciones, que afectarán diversos órganos y sistemas de estos pacientes. Una de las complicaciones más común es la neuropatía diabética del miembro pélvico, en la cual la hiperglucemia afectará los nervios periféricos, sensoriales y motores, causando una pérdida en la sensibilidad de los pies en estos pacientes, favoreciendo traumatismos repetidos e infecciones secundarias. Los pacientes diabéticos tienen mayores tasas de hospitalización por infecciones de la piel y tejidos blandos; el 85% pueden desarrollar infecciones fúngicas del pie. La mayoría de los estudios basados en el aislamiento de los microorganismos han demostrado que las infecciones son polimicrobianas, destacando la presencia de: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, y especies de *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus*. Otro factor que debe tomarse en cuenta es el papel de los hongos en la ruptura de la barrera cutánea favoreciendo la colonización bacteriana, siendo una puerta de entrada para la diseminación de estos microorganismos o que permanezcan como reservorios de infecciones recurrentes. En la última década ha aumentado el interés en conocer cuáles son los microorganismos patógenos que colonizan los pliegues interdigitales, los mecanismos que controlan la interacción entre ellos y las células del hospedero. Por tanto, es importante la detección oportuna y temprana de los microorganismos patógenos que colonizan estas áreas anatómicas de los pacientes con DM2, que jueguen un papel determinante en los procesos de infección más severos, deteriorando la calidad de la vida del paciente. El dar tratamientos preventivos podría ayudar a la erradicación de los microorganismos y evitar dichas complicaciones.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

- Conocer los microorganismos colonizantes en los pliegues interdigitales de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

3.2. Objetivos particulares

- Aislar e Identificar las bacterias y hongos obtenidos de los pliegues interdigitales.
- Identificar los hongos causantes de intertrigo interdigital.
- Determinar el patrón de sensibilidad a antibióticos en las bacterias patógenas.
- Determinar el patrón de sensibilidad antifúngica en los aislados fúngicos levaduriformes.
- Realizar ensayos de biopelículas en los aislados fúngicos.

4. Materiales y Métodos

Pacientes

El estudio fue de tipo descriptivo, transversal, prospectivo. Cincuenta pacientes con diabetes mellitus tipo 2, hospitalizados en el Servicio de Medicina Interna del Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”, ISSSTE fueron incluidos en este estudio. A cada uno de los pacientes se les solicitó su autorización para participar en este trabajo y se registraron los siguientes datos demográficos: género y edad; enfermedades (erisipela, celulitis, o procesos inflamatorios en las piernas) y otras enfermedades adyacentes; manifestaciones clínicas en la región de interés: descamación, maceración, fisuras, eritema y síntomas de prurito y/o tipo de dolor (disestesia: sensación ardorosa o quemante), y parestesias; tratamiento antifúngico o antimicrobiano profiláctico. Registro fotográfico de los pliegues interdigitales de todos los pacientes.

Toma de muestra

La toma de muestra se realizó con ayuda de un cepillo citológico estéril, el cual se giraba en cada pliegue para la adhesión de las escamas (figura 9). Éstos fueron transportados al Laboratorio de Microbiología para la inoculación en los medios de cultivo.



Figura 9. Toma de muestra con cepillo citológico.

Procesamiento de las escamas

Las escamas fueron inoculadas en cinco puntos de la placa con agar dextrosa Sabouraud (ADS) y placa con ADS adicionado con cloranfenicol y cicloheximida (ADS-A); posteriormente se realizó un examen microscópico directo con hidróxido

de potasio (KOH) al 20% y con KOH al 10% adicionado con dimetilsulfóxido al 40%, para la búsqueda de estructuras parásitas fúngicas (hifas, pseudohifas, blastoconidios). Las placas se incubaron durante 14 días a 28°C, con revisión diaria hasta obtener el desarrollo bacteriano y/o fúngico (levaduras, dermatofitos y hongos filamentosos diferentes a dermatofitos).

Identificación de colonias bacterianas y levaduriformes

Las placas de ADS y ADS-A con numerosas o incontables colonias desarrolladas en los cinco puntos de inoculación fueron revisadas para valorar su morfología macroscópica: aspecto cremoso, margen definido, superficie plana, acuminada o rugosa; se les realizó un frotis teñido con Gram para la diferenciación de bacterias y levaduras. Las colonias bacterianas fueron sembradas por estría de aislamiento en medios enriquecidos (gelosa sangre y gelosa chocolate) y en medios selectivos (agar McConkey y agar Manitol Sal), las cuales se incubaron a 37°C durante 24 h. De las colonias aisladas, se realizó una suspensión en 3 mL de solución salina al 0.45%, ajustando a una concentración de 0.5-0.6 de la escala de McFarlan mediante el Densichek plus™ (bioMérieux). Posteriormente, se colocaron en el cassette del equipo, se asignaron tarjetas de identificación y sensibilidad para bacterias Gram positivas o Gram negativas; las tarjetas fueron llenadas, incubadas y leídas dentro del sistema Vitek2 XL® (figura 10). Los resultados se obtuvieron en un lapso de 4 a 21 h.



Figura 10. Sistema Vitek2 XL®.

Las colonias levaduriformes fueron aisladas y purificadas en placas de CHROMagar Candida™ (CH). Se incubaron por 24 horas a 37°C. La identificación preliminar de los aislados se realizó por la morfología y el color de la

colonia, el resultado se comparó con el reporte de Odds y col [33]. También con este medio fue valorada la asociación de especies levaduriformes.

Identificación bioquímica por el sistema Vitek2. Del crecimiento obtenido en CH, se realizó una suspensión en un tubo con solución salina al 0.45%, ajustando la concentración entre 1.8 y 2.2 de la escala de McFarlan mediante el Densicheck plus™ (bioMérieux), los cuales se colocaron en el cassette del equipo, se les asignaron tarjetas de identificación y sensibilidad para levaduras; posteriormente se introdujeron en el equipo Vitek2 XL®. Los resultados se obtuvieron en un rango de 17 a 21 h.

Pruebas fenotípicas y fisiológicas en aislados levaduriformes

Todos los aislados fueron trasladados a la Unidad de Micología, Facultad de Medicina, UNAM para el estudio micológico.

La morfología microscópica se realizó en diferentes medios de cultivo: agar harina de maíz con Tween 80 al 1% para visualizar blastoconidios, pseudohifas y clamidoconidios, por la técnica de Dalmau, la cual consistió en inocular dos líneas paralelas separadas por 1 cm en la superficie del agar y posteriormente se colocó un cubreobjetos sobre el inóculo, para proporcionar un ambiente anaerobio; las placas se incubaron a 28°C durante 72 h [81]. En el medio agar Mueller-Hinton se valoró la formación de tubo germinativo siguiendo el método de Rimek y cols, el cual consistió en inocular la levadura por estría abierta en el centro de la placa y se colocó un cubreobjetos sobre el inóculo, posteriormente se incubó a 37°C por 2 h [82]. En el agar tabaco (AT) los inóculos se sembraron por puntos en la superficie de la placa sin perforar el agar, se incubaron a 28°C por 72 h [83]. Macroscópicamente se evaluó la textura de la colonia, color, presencia de halo filamentoso y las características de éste (continuo o irregular, denso o compacto). Se realizó un examen directo con azul de algodón al halo filamentoso, para visualizar el número aproximado y la disposición de clamidoconidios por campo. Además, se sembraron en medio de ADS-A para valorar la resistencia a la cicloheximida.

Para algunos aislados la identificación se llevó a cabo por prueba de asimilación de diversos sustratos mediante las galerías api 20 C aux® (bioMérieux).

Identificación molecular de los aislados levaduriformes

Extracción de ADN Kit GeneAll Exegene™ Plant SV. Todos los aislados levaduriformes fueron sembrados en agar dextrosa Sabouraud e incubados a 28°C durante 48 h; las colonias se cosecharon y se colocaron en un mortero, al cual se le agregó nitrógeno líquido para congelar la masa fúngica, se trituró para romper la pared celular. Se obtuvo aproximadamente 25 mg de polvo fino, el cual se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL. Posteriormente se siguieron las indicaciones descritas por el proveedor del kit de extracción de ADN, el cual se describirá brevemente. Se agregó 400 µL de la solución amortiguadora PL y 4 µL de RNAsa (100 µg/mL), agitar e incubar 15 min a 65°C. Posteriormente, se adicionó 140 µL de la solución amortiguadora PD, se agitaron e incubaron en hielo por 5 min. Se centrifugaron 2 min a 10,000 rpm. El sobrenadante obtenido se transfirió a la columna azul, se centrifugó por 2 min. El sobrenadante se pasó a un tubo de 1.5 mL y añadió 1.5 volúmenes de la solución amortiguadora BD. Posteriormente se colocó en la columna verde y se centrifugó 30 seg. El sobrenadante fue desechado y a la columna se le adicionó 700 µl de la solución amortiguadora CW; se centrifugó 30 seg. La columna se colocó en un nuevo tubo y se adicionó 50 µL de agua MilliQ, se dejó incubar 5 min. a temperatura ambiente. Finalmente se obtuvo la elución 1. La extracción de ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y se cuantificó en un espectrofotómetro para microplaca (Epoch™, Biotek Instruments®).

Identificación de levaduras por PCR (ITS1 e ITS4) y RFLP.

Para la identificación molecular de diversas especies de *Candida* se siguió el protocolo de Mohammadi y cols [84]. El ADN purificado de los aislados levaduriformes problema fueron sometidos a análisis molecular por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGT GAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ("internal transcribed spacer"). La PCR se realizó con un volumen final de 50 µL, los componentes se especifican en el cuadro 8; se utilizó un termociclador Perkin-Elmer® con las siguientes condiciones: A) Número de ciclos: 40; B) Temperatura de desnaturalización: 94°C; C) Temperatura de alineación: 58°C y D) Temperatura

de elongación 72°C. El producto de amplificación se valoró por electroforesis con un gel de agarosa al 2%. El producto amplificado fue purificado con el kit DNA Clean & Concentrator™.

Posteriormente se colocó en un tubo estéril 50 µL del DNA, 5 µL de solución amortiguadora y 1 µL de la enzima MspI. La mezcla se incubó a 37°C por 20 min. Se verificó los tamaños de los fragmentos obtenidos mediante un gel de agarosa al 3% [84]. En el cuadro 9 se muestran los fragmentos esperados por la digestión de la enzima.

Cuadro 8. Material para la PCR (amplificación de la región ITS1 e ITS4).

Reactivo	C inicial	Volumen (µL)
Buffer	10X	5
Mg ⁺⁺	25 mM	4
dATP	10 mM	1.25
dTTP	10 mM	1.25
dGTP	10 mM	1.25
dCTP	10 mM	1.25
ITS1	20 µM	5
ITS4	20 µM	5
Taq Pol	-	0.7
Agua	-	15.3
DNA 10ng/µL	-	10
Volumen total	-	50 µL

Cuadro 9. Especies identificadas mediante la técnica PCR-RFLP.

Especie	Tamaño Región ITS	Tamaño de los fragmentos MspI-RFLP
<i>C. albicans</i>	537	239, 298
<i>C. glabrata</i>	881	320, 561
<i>C. parapsilosis</i>	530	530
<i>C. lusitaniae</i>	382	118, 264

PCR mix

Los aislados identificados como *C. albicans* mediante la técnica de PCR-RFLP fueron sometidos a este procedimiento. Ahmad y cols describieron la técnica de la PCR mix para diferenciar a *C. albicans* de *C. dubliniensis* [85]. En el cuadro 10 se detallan los reactivos utilizados.

Cuadro 10. Material para la PCR mix.

Reactivo	C inicial	Volumen (μ L)
Buffer	10X	5
MgCl ₂	25 mM	4
dATP	5 mM	1
dTTP	5 mM	1
dGTP	5 mM	1
dCTP	5 mM	1
CALF	5 μ M	4
CALR	5 μ M	4
CDUF	5 μ M	4
CDUR	5 μ M	4
Taq Pol	-	0.5
Agua	-	18
DNA 20ng/ μ L	-	2.5
Volumen total	-	50

El termociclador Perkin-Elmer® se utilizó con las siguientes condiciones: A) Número de ciclos: 35; B) Temperatura de desnaturalización: 95°C; C) Temperatura de alineación: 55°C y D) Temperatura de elongación 72°C. Los productos obtenidos se verificaron mediante un gel de agarosa al 3%. El tamaño del amplificado esperado fue de 100 pb para *C. albicans* y de 325 pb para *C. dubliniensis*.

Identificación por secuenciación

Los aislados en los que se tuvo dificultad para identificarlos por pruebas fenotípicas, bioquímicas o PCR-RFLP, se enviaron a secuenciar los productos de PCR purificados de la región ITS1 e ITS4. Los resultados de la secuencia fueron analizados usando los datos del GenBank®, mediante el programa NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index/html>). El criterio utilizado para la identificación de las especies fue la secuencia que mostró $\geq 99\%$ de identidad comparada con las cepas tipo.

Hongos filamentosos (dermatofitos)

De las colonias filamentosas crecidas en ADS o en ADS-A, se realizó un cultivo monospórico (estría cerrada) en ADS-A, las placas se incubaron a 28°C por 7 días. De las colonias aisladas una fue resembrada por picadura en ADS-A, se incubó a 28°C por 7 días. Cada aislado purificado se resembró en diferentes medios de cultivo: agar tierra y pelos (ATP), agar avena, agar avena sales, agar avena amaranto y agar Gorodwa para la obtención de estructuras de conidiación. Las placas se incubaron a 28°C por 7 días. De cada colonia crecida, se realizó un examen directo con azul de algodón, las cuales fueron observadas en el microscopio de luz.

Pruebas fisiológicas diferenciales

- A) Prueba de ureasa. Los dermatofitos problema de 7 días de crecimiento fueron inoculados en tubos que contenían agar urea de Christensen, los cuales se incubaron a 28°C por 7 días. La prueba es positiva al observar un cambio de color, lo que demuestra que el dermatofito es capaz de hidrolizar la urea. El fundamento se basa en la hidrólisis de la urea en dos moléculas de amoníaco, una de dióxido de carbono y una de agua mediante la acción de la enzima ureasa con la resultante alcalinidad, generando un vire en el indicador de pH (rojo de fenol) [86]. *Trichophyton rubrum* es ureasa negativa, mientras que *T. interdigitale* es positivo.
- B) Prueba de perforación en pelo *in vitro* modificada. A partir del crecimiento de 7 días en ADS, se inoculó un cuadro de agar ATP en la misma placa en los cuatro lados, se colocaron tres pelos de niño sobre el cuadro de agar y se

colocó un cubreobjetos estéril sobre éstos. Se incubaron de 7 a 14 días a 28°C. Posteriormente se realizó un examen directo al pelo con azul de algodón para visualizar la formación de los cuerpos perforantes. Con esta prueba se diferenció a *T. interdigitale* (positivo) de *T. rubrum* (negativo) [46].

C) Morfología microscópica. Los dermatofitos fueron resembrados en ADS, incubados a 28°C durante 7 días, de cada uno se preparó una solución en NaCl estéril al 0.9%, se tomaron 2 mL que fueron inoculado en el centro de los cuadros de 1 cm² de ADS y ATP colocados en la superficie de la misma placa, posteriormente se colocó un cubreobjetos estéril. Todos fueron incubados a 28°C durante 7-14 días. El cubreobjetos fue retirado y se colocó sobre una gota de azul de algodón puesta en un portaobjetos. Éstos fueron observados bajo el microscopio a 40x buscando estructuras características del dermatofito (Macro y microconidios, clamidoconidios, hifas en espiral, hifas en zarcillos).

Formación de las biopelículas en *Candida* spp. y *Trichosporon* spp. de acuerdo con el método previamente descrito (Melo y cols [87] y Chandra y cols [88]).

Los aislados levaduriformes obtenidos fueron resembrados en ADS, se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente una asada del crecimiento fue inoculada en tubos de 15 mL que contenían caldo base nitrogenada de levadura (YNB) adicionado con dextrosa al 2%, se incubaron a 37°C por 24 h en agitación (100 rpm). Cada tubo se centrifugó a 10,000 rpm, a 4°C durante 5 min. El sobrenadante fue decantado y el “pellet” fue resuspendido en 10 mL de “phosphate-buffered saline” (PBS) 1x. Este último procedimiento se repitió tres veces. En los aislados de *Trichosporon* se siguió el mismo método, con excepción del uso de caldo Sabouraud en lugar de YNB.

El “pellet” fue resuspendido en 10 mL de PBS 1x, homogenizado por agitación. La suspensión obtenida se ajustó a una concentración de 1x10⁶ cél/mL, se centrifugó y decantó el sobrenadante. Finalmente se reconstituyó el volumen con caldo RPMI adicionado con glucosa al 2%. Dos mL de cada aislado fue inoculado en los pozos de la placa de 6 pozos de poliestireno (Ultra Cruz™), las cuales poseen un revestimiento exclusivo para proporcionarles una condición hidrofílica y de carga

negativa, lo que permite la adhesión y el crecimiento celular. Se utilizaron dos pozos solo con caldo RPMI-glucosa 2% (uno control de esterilidad y otro blanco). Las placas se incubaron a 37°C por 90 min. (Fase de adhesión). Cada pozo fue lavado con 2 mL de PBS 1x y se les adicionó 3 mL de caldo RPMI-glucosa 2%. Finalmente, cada placa se incubó a 37°C en agitación (100 rpm) por 72 h.

Ensayo de morfología. En cada pozo se colocó un cubreobjetos de 22 mm (Thermanox plastic®) y se adicionó 2 mL de cada inóculo. Las placas se incubaron a 37°C sin agitación por 90 min (Fase de adhesión). Cada pozo se lavó con 2 mL de PBS 1x dos veces. Finalmente se agregó 3 mL de caldo RPMI-glucosa al 2%. Las placas se incubaron a 37°C por 72 h en agitación (100 rpm).

Métodos de cuantificación de biopelículas

De cada uno de los pozos de la placa se retiró el RPMI-glucosa 2%, se lavó dos veces con PBS 1x. Las lecturas de cada placa se realizaron de acuerdo al protocolo correspondiente:

Cristal violeta (CV). La placa se dejó secar por 30 min a 37°C. A cada pozo se le adicionó 400 µL de CV (0.4%) por 45 min. Se lavó tres veces con agua MilliQ y se adicionó etanol al 95%, decolorando por 45 min. La lectura del sobrenadante de cada uno de los pozos se realizó mediante un espectrofotómetro (Genova, Jenway®) a una longitud de onda de 595 nm (figura 11).

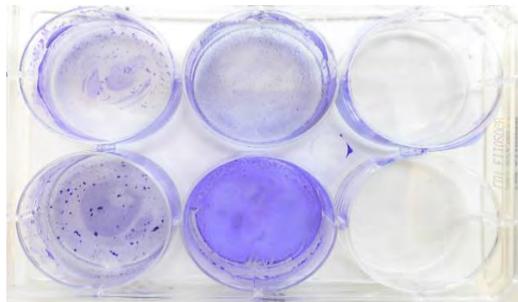


Figura 11. Placa de 6 pozos de poliestireno con CV.

Safranina. A cada pozo de la placa se le adicionó 400 µL de safranina (0.5%) por 5 min. Se realizaron tres lavados con 2 mL de agua destilada. Finalmente se

agregó un mL de agua destilada y se realizaron lecturas con el espectrofotómetro (Genova, Jenway®) a una longitud de onda de 492 nm.



Figura 12. Placa de 6 pozos de poliestireno con safranina.

Morfología. La placa se dejó secar por 30 min a 37°C. Los cubreobjetos se retiraron y se colocaron sobre un portaobjetos adicionado con una gota de azul algodón. Cada preparación se observó en el microscopio óptico invertido (Olympus IX70®) a un aumento de 40x. Se realizaron registros fotográficos de la biopelícula formada.

Biomasa. A cada pozo de la placa se le añadió 2 mL de PBS, con la ayuda de una hoja de bisturí se raspó la estructura fúngica adherida. Todo el producto fue cosechado y filtrado a través de una membrana de 45 µm previamente pesadas y colocadas en unidades filtro. La membrana se dejó secar por 48 horas a 37°C y posteriormente se pesó cada una de ellas.

Reducción de tetrazolio (XTT). Se preparó una solución de 2,3, bis (2 metoxi-4-nitro-5-sulfonil) 2-H tetrazolio 5-carboxanilida (XTT) (compuesto fotosensible) a 1 mM en PBS 1x menadiona a una concentración de 1 mg/mL. En un vaso de precipitados se colocó 24 mL de PBS 1x, se adicionó 24 µL de menadiona y 300 µL de XTT. En cada pozo de la placa con la formación de biopelícula prelavada, se adicionaron 4 mL de la mezcla anterior. La placa se incubó en total oscuridad a 37°C por 3 h en agitación (100 rpm). Las lecturas se realizaron con el espectrofotómetro (Genova, Jenway®) a una longitud de onda de 492 nm.

Ensayos de biopelículas en dermatofitos

Los ensayos de biopelículas en dermatofitos se siguieron de acuerdo a la descripción de Costa-Orlandi y cols [79] con algunas modificaciones.

Los aislados de dermatofitos obtenidos fueron resembrados en ADS-A, se incubaron a 28°C por 10 días. Posteriormente, todas las colonias crecidas se cosecharon y se inocularon en un medio ATP, se incubó a 28° C por 10 días. Posteriormente se realizó una suspensión de las colonias obtenidas en 3 mL de PBS 1x. Se tomaron 5 µL para contar los conidios con ayuda de la cámara de Neubauer. El volumen final en 10 mL de RPMI-glucosa 2% fue calculado a una concentración de 1×10^6 cél/mL.

Dos mL de cada aislado fueron inoculados en los pozos de la placa de 6 pozos de poliestireno (Ultra Cruz™). Se utilizaron dos pozos solo con caldo RPMI-glucosa 2% (uno control de esterilidad y otro blanco). Las placas se incubaron a 37°C por 3 h (fase de adhesión). Cada pozo fue lavado con 2 mL de PBS 1x y se adicionó 3 mL de caldo RPMI-glucosa 2%. Finalmente, cada placa se incubó a 37°C en agitación (100 rpm) por 72 h. Los ensayos de cuantificación fueron los mismos que se realizaron para los aislados levaduriformes.

Todos los ensayos de biopelículas se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico.

Las pruebas realizadas para el análisis estadístico fueron: obtención de porcentajes, media geométrica. Para el análisis de las biopelículas se utilizó ANOVA de una vía con el software GraphPad Prism 6. El valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

5. Resultados

De los 50 pacientes incluidos en este estudio, 25 correspondieron a hombres y 25 a mujeres. El rango de edad fue de 18 a 80 años, con un promedio de 61.1 años. El tiempo de evolución de la diabetes mellitus en cada uno de los pacientes fue variable, de una semana a 22 años. En general, las manifestaciones clínicas que presentaron en los pliegues interdigitales fueron discretas en 33 (66%) e intertrigo interdigital en 11 (22%) de los pacientes, con predominio de maceración y descamación intensa (figura 13).

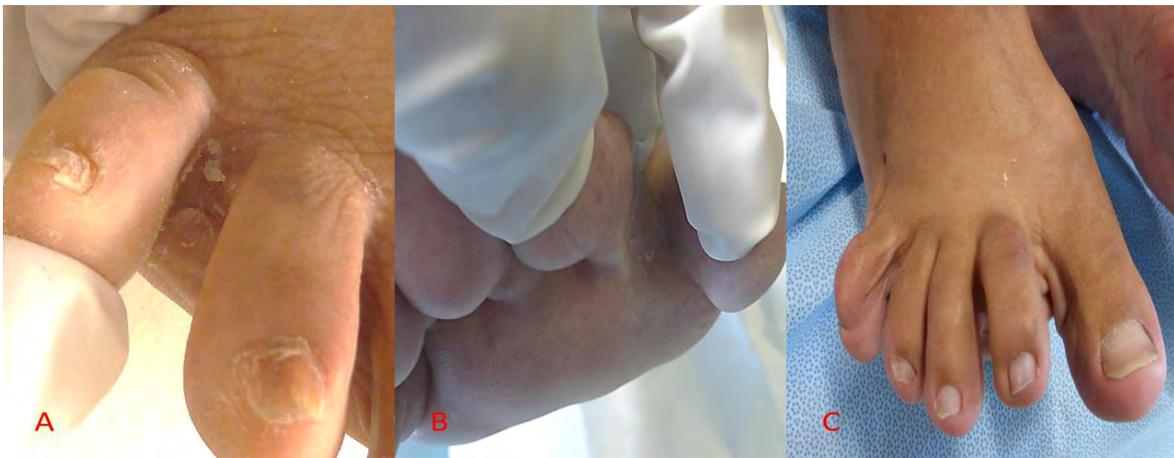


Figura 13. Manifestaciones clínicas en los pliegues interdigitales. A) Intertrigo; B) Moderada descamación y C) Sin lesiones.

En el cuadro 11 se muestra la distribución de la intensidad de las manifestaciones clínicas en los pliegues interdigitales de los pies y la asociación con otros procesos inflamatorios del miembro pélvico (18%) (Figura 14). Cuarenta y nueve de los 50 pacientes presentaron la asociación con otras enfermedades: hipertensión arterial (46%), Insuficiencia renal (26%), cardiopatías (22%), neuropatía (8%). De los 50 pacientes con DM2, solo 9 recibieron antifúngicos tópicos o sistémicos para el tratamiento de alguna micosis en los pies.



Figura 14. Paciente 4MO con diagnóstico de erisipela ampollosa en la pierna.

Cuadro 11. Relación de la intensidad de las manifestaciones clínicas y el proceso inflamatorio del miembro pélvico.

Sin lesiones	Manifestaciones discretas	Intertrigo	Enfermedad inflamatoria del miembro pélvico			
			Celulitis	Erisipela	Trombosis	Eczema
7	33	10	3	4	1	1

De los 50 exámenes directos realizados, en 18 (36%) se observaron estructuras parásitas de hongos caracterizadas por hifas delgadas y/o gruesas, irregulares y ramificadas e hifas cortas irregulares (figura 15). De éstos, solo en 11 se obtuvo desarrollo de numerosas colonias fúngicas del agente causal (figura 16). La relación entre el examen directo y el cultivo fue del 61%. Sólo en 4 el examen directo fue negativo y el cultivo positivo.

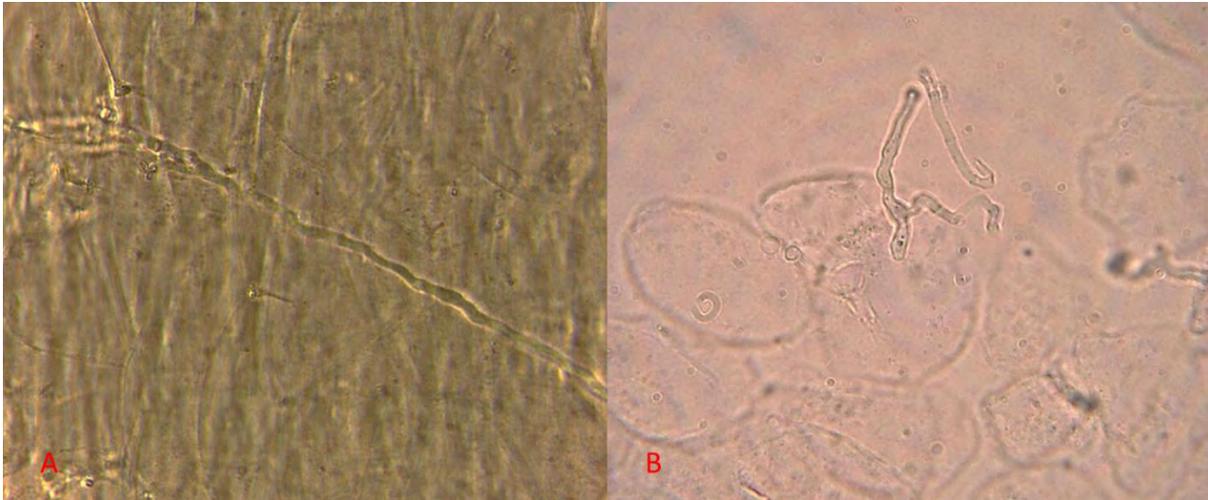


Figura 15. Examen directo de las escamas. A) hifas largas, hialinas, gruesas, irregulares y ramificadas; B) hifas cortas, hialinas, irregulares y ramificación dicotómica.

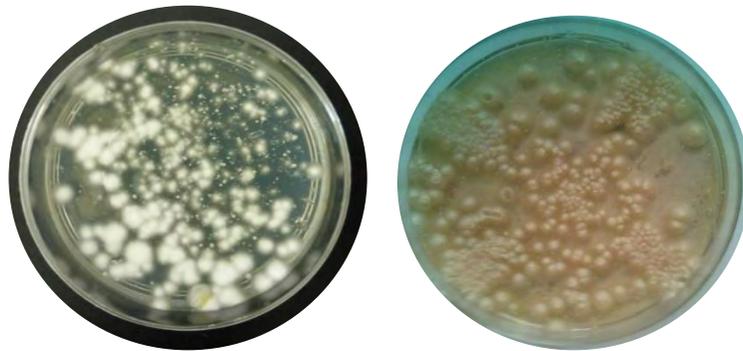


Figura 16. Cultivos de aislamientos primarios. Izq. *Trichophyton interdigitale* con *S. aureus* (3MO). Der. *Trichosporon jirovecii* (4MO).

En 48 de los 50 pacientes se aislaron numerosas colonias que correspondieron a 67 microorganismos: 50 bacterias y 17 hongos (levaduriformes 12 y dermatofitos 5). En el cuadro 12 se muestra los aislados bacterianos, de los cuales 41 correspondieron a bacterias Gram positivas y 9 a Gram negativas. De éstos, solo el 24% correspondió a bacterias patógenas comunes en la práctica clínica del hospital de estudio, de las cuales predominaron *Acinetobacter sp* y *S. aureus* (figura 17).



Figura 17. Izq. *Acinetobacter baumannii* en agar McConkey. Der. *S. aureus* en agar manitol sal.

Cuadro 12. Aislados bacterianos obtenidos en 48 pacientes con DM2.

Gram	Total	Bacteria	Aislados	Porcentaje
Positivos	41	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	22
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	12	24
		<i>Staphylococcus aureus</i>	3	6
		<i>Staphylococcus simulans</i>	2	4
		<i>Staphylococcus warneri</i>	4	8
		<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	2
		<i>Staphylococcus caprae</i>	7	14
		<i>Enterococcus faecalis</i>	1	2
Negativos	9	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2
		<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	4
		<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1	2
		<i>Enterobacter cloacae</i>	1	2
		<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	2
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2
		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	2
		<i>Escherichia coli</i>	1	2

Por otro lado, de los 17 aislados fúngicos obtenidos, en dos se presentó la combinación de dos diferentes hongos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Aislados fúngicos (levaduras y dermatofitos) obtenidos de 15 pacientes.

Hongo	Total	Género y especie	Número	Porcentaje
Levaduras	12	<i>Candida albicans</i>	4	23.5
		<i>Candida lusitaniae</i>	1	5.9
		<i>Candida duobushaemulonii</i>	1	5.9
		<i>Candida glabrata</i>	1	5.9
		<i>Candida parapsilosis</i>	2	11.8
		<i>Trichosporon jirovecii</i>	2	11.8
		<i>Trichosporon dermatis</i>	1	5.9
Dermatofitos	5	<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	5.9
		<i>Trichophyton interdigitale</i>	2	11.8
		<i>Trichophyton rubrum</i>	2	11.8

Por las pruebas fenotípicas, fisiológicas y diferenciales fueron identificados 8/12 aislados de hongos levaduriformes. De las pruebas fenotípicas realizadas el uso del medio cromógeno (CH) ayudó a la identificación presuntiva de los aislados de *C. albicans* por el color verde que mostró y en *Candida glabrata* su color morado. Sin embargo, los aislados de *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* y *C. duobushaemulonii* presentan una tonalidad rosa pálido, haciéndolas indistinguibles entre sí (figura 18).

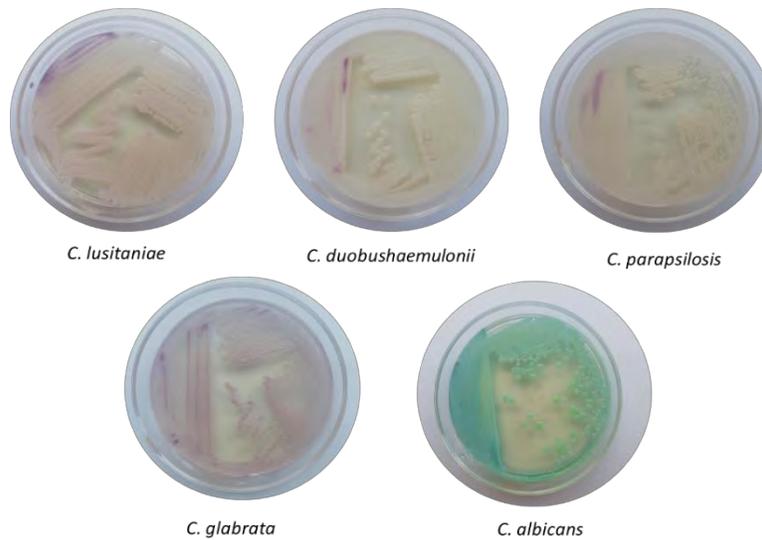


Figura 18. Diferentes especies de *Candida* en el medio CHROMagar Candida™.

Otras pruebas fenotípicas de utilidad para la identificación de *Candida* spp. fueron la formación de clamidoconidios y pseudohifas en agar harina de maíz adicionado con Tween 80 al 1%, donde los aislados de *C. lusitaniae* y *C. glabrata* solo desarrollaron blastoconidios, mientras que *C. parapsilosis* presentó formación de pseudohifas ramificadas con blastoconidios distribuidos en las constricciones; y clamidoconidios por *C. albicans* (figura 19).

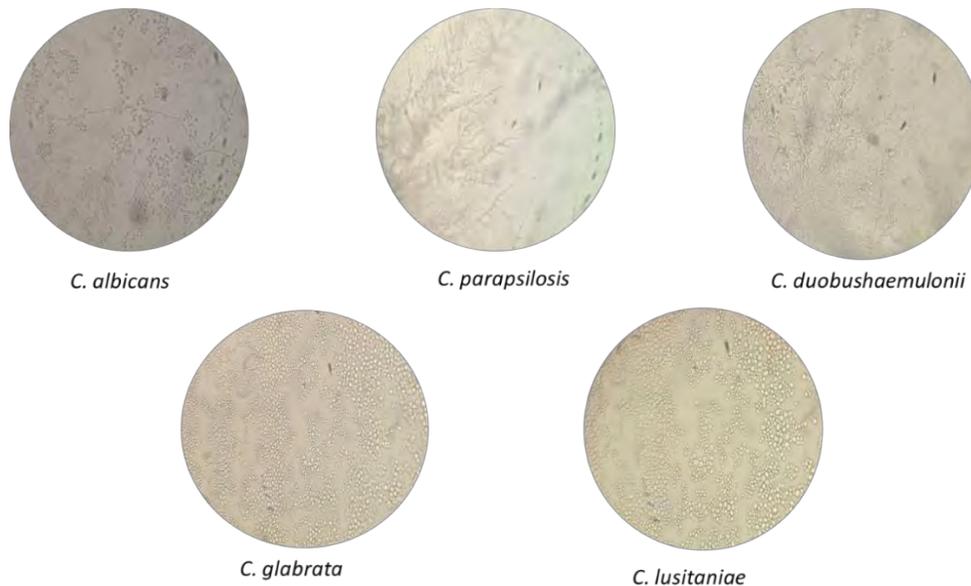


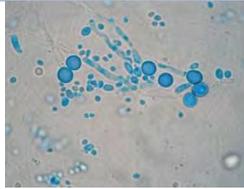
Figura 19. Visualización microscópica 40x de clamidoconidios y pseudohifas en agar harina de maíz con Tween 80 1% de las diferentes especies de *Candida*.

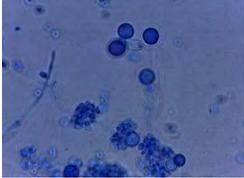
Las características morfológicas macroscópicas de *Candida albicans* en agar tabaco se muestran en la figura 20, donde se observó el color y la superficie de los aislados muy similar. La morfología macro y microscópica (presencia de clamidoconidios por campo: 0=ausencia de clamidoconidios; +=25%; ++=50%; +++=75%; ++++=100%) de los aislados de *C. albicans* se describen en el cuadro 14.



Figura 20. Aislados de *C. albicans* en agar tabaco. 10MO con halo filamentoso de distribución irregular. 22MO y 23MO margen filamentoso corto y en parches.

Cuadro 14. Características macro y microscópicas de los aislados de *C. albicans* en agar tabaco.

Clave	Características macroscópicas			Características microscópicas	
	Color	Superficie	Características del halo	Clamidoconidios	Imagen
10MO	Blanco	Lisa	Irregular, denso y continuo	++	
22MO	Blanco	Lisa	Irregular y discontinuo	+	

Clave	Características macroscópicas			Características microscópicas	
	Color	Superficie	Características del halo	Clamidoconidios	Imagen
23MO	Amarillenta	Lisa	Irregular, discontinuo y compacto	+	

Por la prueba de PCR-RFLP 7/9 especies de *Candida* fueron identificadas. Por otro lado, los aislados de *Candida albicans* fueron sometidos al PCR mix para diferenciar a *C. albicans* de *C. dubliniensis*, de manera que los fragmentos amplificados obtenidos fueron de aproximadamente 100 pb, confirmando la identificación de esta especie.

Finalmente, las especies de *C. duobushaemulonii*, *T. jirovecii* y *T. dermatis* se identificaron por secuenciación, mediante la amplificación de las regiones ITS1 e ITS4 y al comparar las secuencias con las bases de datos del GenBank con una identidad del 99-100%.

De los dermatofitos dos especies fueron las principales: *T. rubrum* y *T. interdigitale*. En la figura 21 se muestra las pruebas morfológicas y fisiológicas que diferencian a ambas especies. En *T. rubrum* se apreciaron microconidios sobre la hifa conidiógena con una disposición alterna; mientras que en *T. interdigitale* se encontraron abundantes microconidios y algunas hifas en espiral. Posteriormente, en *T. interdigitale* la prueba de la urea y la prueba de perforación en pelo fueron positivas (figura 21).

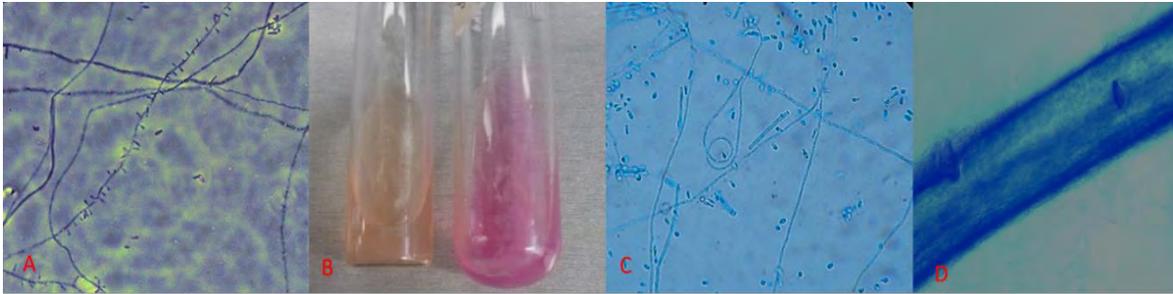


Figura 21. Características microscópicas y pruebas diferenciales entre *T. rubrum* y *T. interdigitale*. A) Examen directo 40x con azul de algodón de *T. rubrum* (hifas con conidios alternos); B) Prueba de la ureasa: *T. rubrum* (negativa) y *T. interdigitale* (positiva); C) Examen directo 40x con azul de algodón de *T. interdigitale* (hifas en espiral); D) Examen directo 40x con azul de algodón de pelo inoculado con *T. interdigitale* (cuerpos perforantes).

Finalmente, el aislado de *Epidermophyton floccosum* se identificó por las características macroscópicas: las colonias fueron de superficie plegada con un pigmento de tonalidad amarillo verdosa. Microscópicamente se observaron macroconidios en forma de clava dispuestos en racimo en la porción distal de la hifa y ausencia de microconidios (figura 22). El medio de agar avena fue en el que se obtuvo producción de numerosos macroconidios.

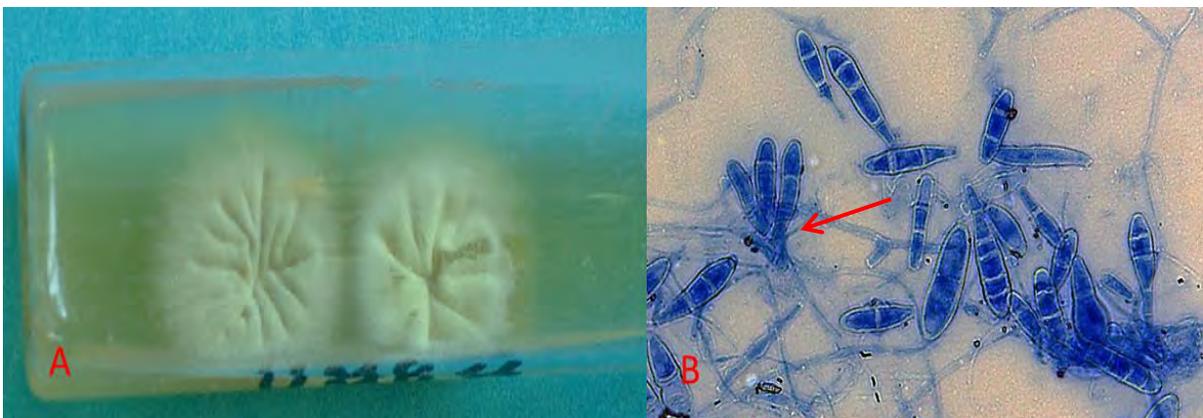


Figura 22. Características macro y microscópicas de *E. floccosum*. A) Colonias plegadas, color amarillo verdoso; B) Examen directo 40x con azul de algodón: se observan abundantes macroconidios, redondeados en su polo distal, (↑) dispuestos en racimo.

De todos los aislados se presentaron 7 combinaciones, ya sea entre hongos y bacterias; levadura-levadura (*C. albicans* y *C. duobushaemulonii*) y dermatofito-levadura (*T. rubrum* y *C. lusitaniae*) (cuadro 15).

Cuadro 15. Coexistencia entre bacterias y hongos.

Bacterias	Hongo
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>
<i>Staphylococcus wernerii</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Trichophyton rubrum</i> y <i>C. lusitaniae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida albicans</i> y <i>Candida duobushaemulonii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Trichosporon jirovecii</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>C. parapsilosis</i>

Las pruebas de sensibilidad a los aislados bacterianos y levaduriformes, se determinó mediante el sistema Vitek2. En el cuadro 16 se muestran los aislados de las bacterias Gram positivas resistentes a por lo menos cinco antibióticos de uso común en la práctica clínica y en el cuadro 17 las bacterias Gram negativas. Los factores de virulencia detectados y considerados en el software del equipo fueron: detección de cefoxitina para Gram positivos y detección de Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) para Gram negativos. De los aislados Gram positivos, en todos se detectó cefoxitina y fueron resistentes a clindamicina y a ciprofloxacino; además, 4 aislados de *S. haemolyticus* mostraron resistencia a 7 antibióticos de los 8 en estudio. Por otro lado, para los aislados Gram negativos, solo se detectó la presencia de BLEE en *E. coli* y *K. oxytoca*. Sin embargo, todos presentaron multirresistencia a: ampicilina, cefazolina, ceftriaxona, tobramicina y trimetoprim-sulfametoxazol.

Acinetobacter baumannii fue resistente a 8 antibióticos, seguido de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* que mostraron resistencia a 7.

En el cuadro 18 se muestra el patrón de sensibilidad antifúngica en las diversas especies de *Candida*. *Candida glabrata* y *C. duobushaemulonii* fueron resistentes a fluconazol, además, esta segunda presentó resistencia a anfotericina B. En los aislados de *Trichosporon* spp. no fue posible determinar la sensibilidad por el sistema Vitek2, ya que el equipo no tiene la base de datos.

Cuadro16. Patrón de sensibilidad antibacteriana en los aislados bacterianos Gram positivos.

Clave	Bacteria	Detección de cefoxitina	Gentamicina	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Moxifloxacino	Eritromicina	Clindamicina	Vancomicina	TPM-SMX
			≥16	≥8	≥8	4	≥8	≥8	≥1	≥80
14MO	<i>S. haemolyticus</i>	+	R	R	R	R	R	R	S	R
17MO	<i>S. haemolyticus</i>	+	R	R	S	S	R	R	S	R
18MO	<i>S. haemolyticus</i>	+	S	R	R	R	R	R	S	S
31MO	<i>S. haemolyticus</i>	+	R	R	R	R	R	R	S	R
34MO	<i>S. aureus</i>	+	S	R	R	R	R	R	S	S
35MO	<i>S. epidermidis</i>	+	S	R	R	R	R	R	S	R
37MO	<i>S. epidermidis</i>	+	R	R	R	R	R	R	S	S
49MO	<i>S. haemolyticus</i>	+	R	R	R	R	R	R	S	R
50MO	<i>S. haemolyticus</i>	+	R	R	R	R	R	R	S	R

TPM-SMX: Trimetoprim-sulfametoxazol S: sensible R: resistente

Cuadro 17. Patrón de sensibilidad antibacteriana en los aislados bacterianos Gram negativos.

Clave	Bacteria	Detección de BLEE	Ampicilina	Cefazolina	Ceftriaxona	Amikacina	Gentamicina	Tobramicina	Ciprofloxacino	TMP-SMX
			≥32	≥64	≥64	≥4	≥16	≥8	≥4	≥80
4MO	<i>K. oxytoca</i>	+	R	R	R	S	R	R	S	R
7MO	<i>A. baumannii</i>	NA	R	R	R	R	R	R	R	R
8MO	<i>E. amnigenus</i>	NA	R	R	R	S	S	R	R	R
13MO	<i>P. aeruginosa</i>	NA	R	R	R	R	S	R	R	R
45MO	<i>E. coli</i>	+	R	R	R	S	R	R	R	R

TPM-SMX: Trimetoprim-sulfametoxazol S: sensible R: resistente BLEE: Beta lactamasa de espectro extendido

Cuadro 18. Patrón de sensibilidad antifúngica en los aislados levaduriformes.

Clave	Levadura	Flucitosina	Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina	Micafungina
		<1	<1	<0.12	0.5	1	0.25
4MO	<i>T. jirovecii</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10MO	<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S
11MO	<i>C. lusitaniae</i>	S	S	S	S	S	S
20MO	<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S
21MO	<i>T. dermatis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22MO	<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S
23MO	<i>C. duobushaemulonii</i>	S	R	S	R	S	S
23MO	<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S
32MO	<i>C. glabrata</i>	S	R	S	S	S	S
34MO	<i>T. jirovecii</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
42MO	<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S
45MO	<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S

S: sensible R: resistente NA: No analizado

Los resultados de los ensayos de biopelículas, se determinaron por la cuantificación con CV (número de células totales y matriz extracelular); mientras que con safranina se cuantificó la matriz extracelular (componente esencial de la biopelícula); con XTT la actividad metabólica; y la biomasa fue la cantidad de producto biológico obtenido. Para clasificar a los aislados en altos formadores de biopelículas o bajos formadores, se estableció un valor aleatorio, el cual fue obtenido por la media (\bar{x}) de los valores de absorbancia (DO) de cada uno de los aislados de *Candida* spp. y *Trichosporon* spp. De acuerdo a este parámetro, todos los valores obtenidos por arriba de la \bar{x} se consideraron como buenos formadores y por debajo de la \bar{x} bajos formadores. Con base en este criterio, dos aislados de *C. albicans* y el de *C. duobushaemulonii* fueron buenos formadores de biopelículas (DO 0.750-0.950 dilución 1:100). Por otro lado, sólo dos aislados de *Candida albicans* presentaron valores altos de DO en la cuantificación con safranina (0.891-1.182); sin embargo, al comparar los valores bajos de DO obtenidos, no hubo diferencia significativa entre los aislados. Con XTT el resultado de la cuantificación fue similar en todos los aislados, por lo que se concluyó que el comportamiento metabólico fue similar.

Finalmente, al determinar la biomasa, en tres de los aislados (2 *C. albicans* y el de *C. duobushaemulonii*) los valores obtenidos por la cuantificación de la masa fueron altos (6 mg y 4 mg, respectivamente) en comparación con los demás aislados (figura 23).

En la figura 24 se muestra la cuantificación de biopelícula formada por *Trichosporon* spp., solo uno de los aislados mostró ser buen formador de biopelícula (*T. jirovecii* 34 MO). Al comparar los valores de DO obtenidos en los ensayos de CV y safranina entre los aislados, fueron estadísticamente significativos $p < 0.0001$. En cambio, con el análisis estadístico de los resultados por la cuantificación de la actividad metabólica y de biomasa, no hubo diferencia significativa entre ellos (figura 24).

En los ensayos realizados en dermatofitos, los aislados de *T. rubrum* fueron buenos formadores de biopelículas. Los valores de cuantificación con CV, safranina y biomasa fueron similares entre los aislados. En cambio, los aislados de *T. interdigitale* y *E. floccosum* fueron muy bajos (DO 0.1-0.2 dilución 1:100). En todos los aislados, la cuantificación por XTT fue muy baja $DO < 0.1$ (figura 25).

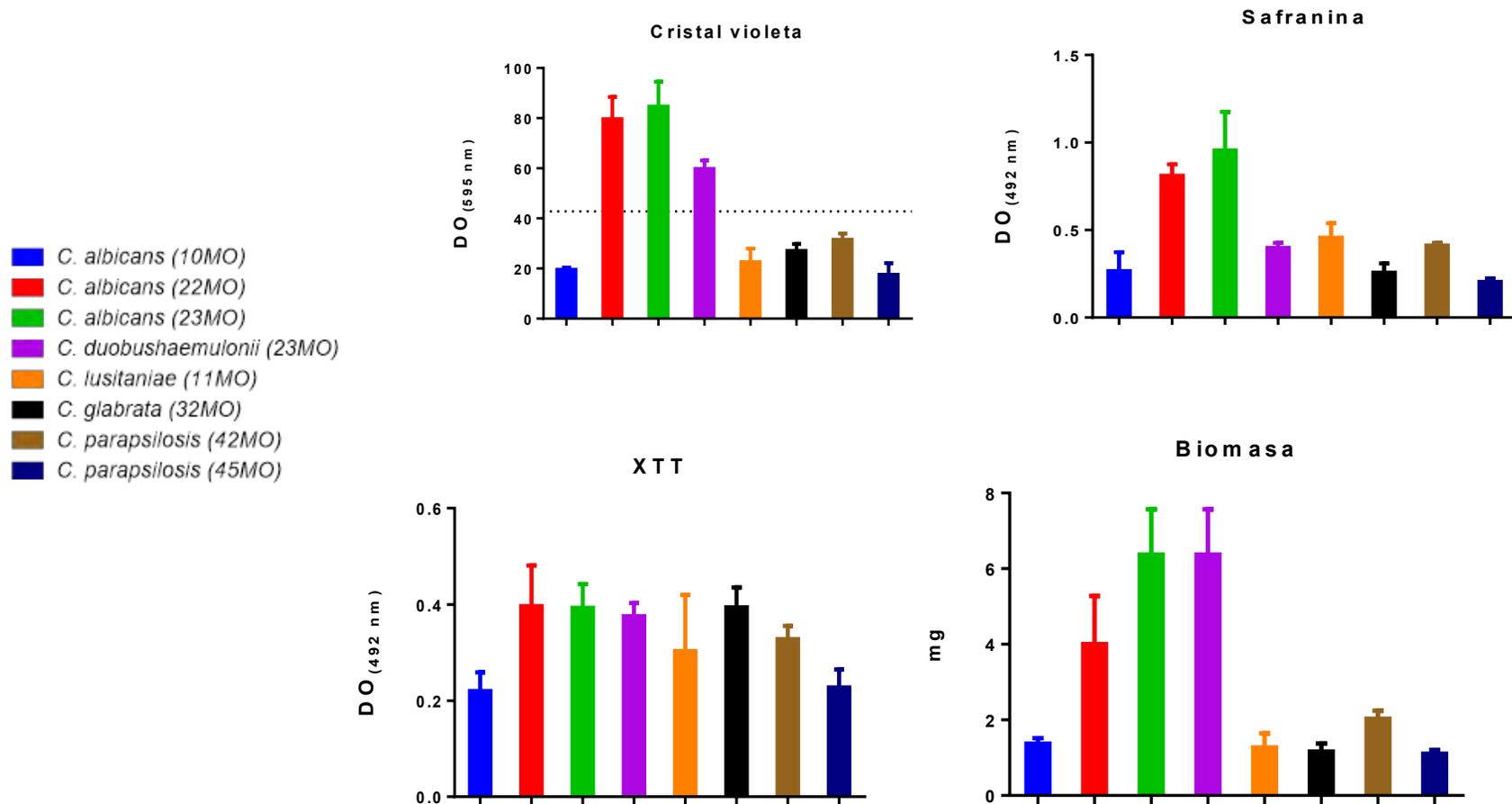


Figura 23. Cuantificación de las biopelículas en los aislados de *Candida* spp. por CV, safranina, XTT y biomasa.

a

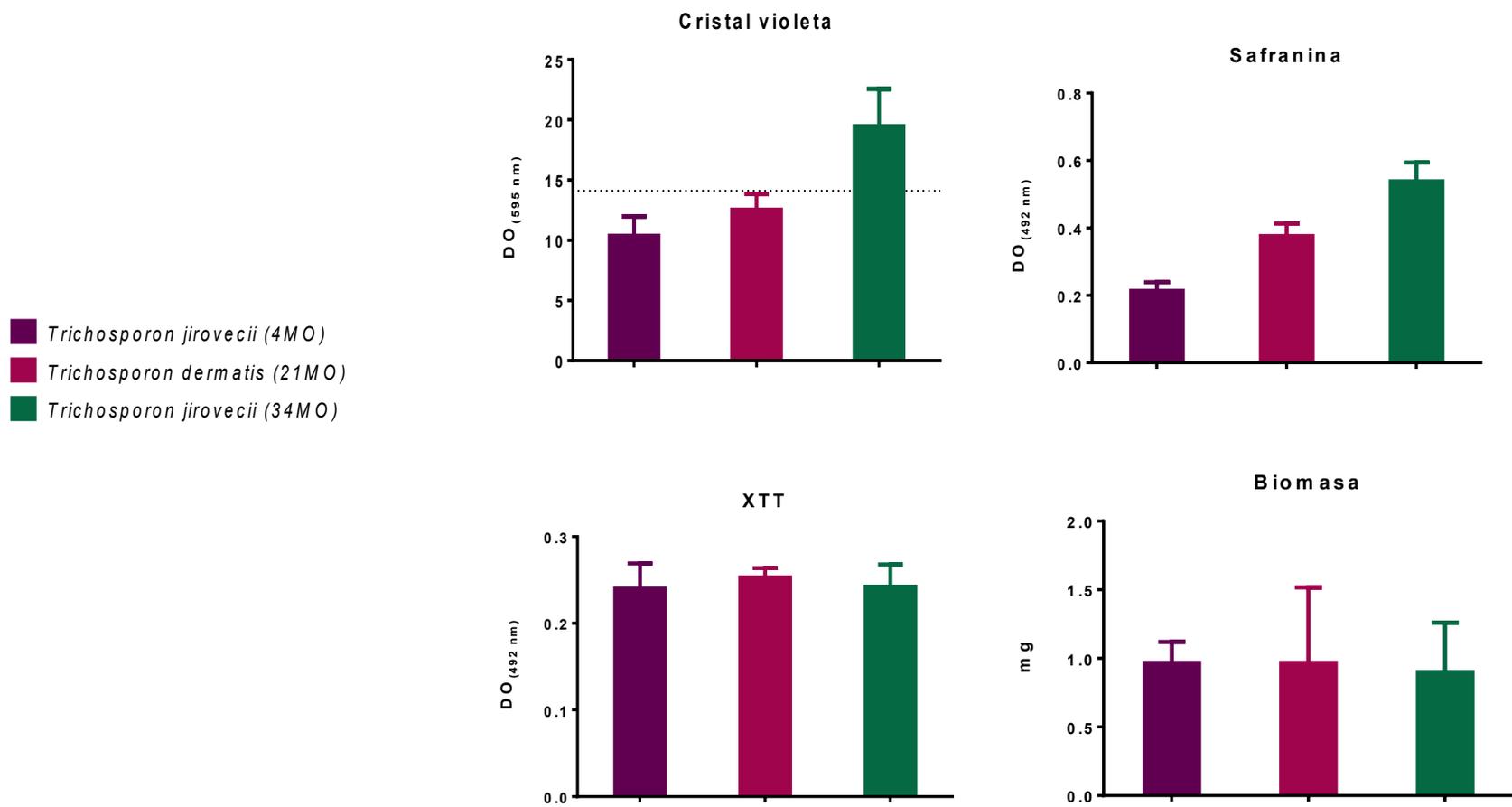


Figura 24. Cuantificación de las biopelículas en los aislados de *Trichosporon* spp. por CV, safranina, XTT y biomasa.

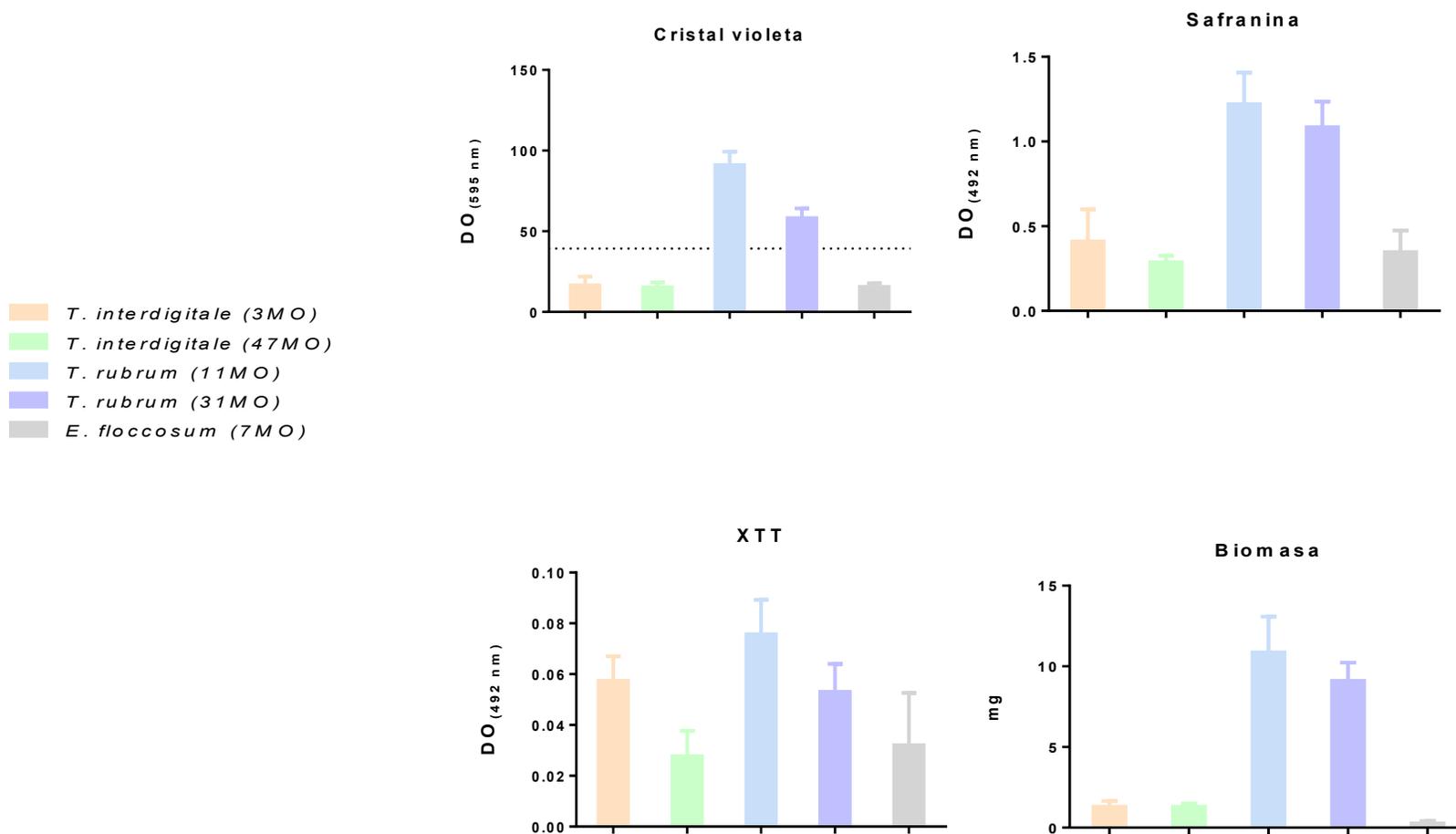


Figura 25. Cuantificación de las biopelículas en los aislados de dermatofitos por CV, safranina, XTT y biomasa.

En los ensayos de morfología se observó el desarrollo de las biopelículas en las que destaca la formación de hifas y blastoconidios para los aislados levaduriformes e hifas entrelazadas que semejan a una red para los dermatofitos. En la figura 26 se visualizan el crecimiento de la biopelícula en algunos de los aislados.

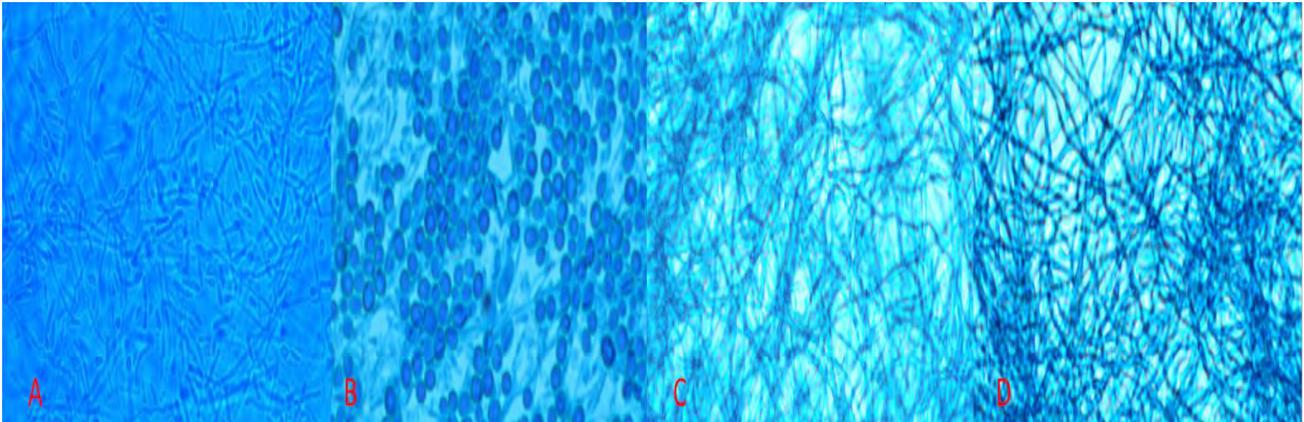


Figura 26. Ensayo de morfología. A) *Candida parapsilosis* (42 MO). Abundantes levaduras e hifas. B) *Trichosporon jirovecii* (34 MO). Abundantes levaduras e hifas. C) *Trichophyton rubrum* (31 MO) red de hifas. D) *T. interdigitale* (3 MO) red de hifas, solo en el centro de la biopelícula.

6. Discusión

La diabetes se caracteriza por hiperglucemia, la cual puede favorecer las complicaciones vasculares comunes en estos pacientes, por el aumento en la glicosilación de las proteínas, induciendo la formación de especies reactivas del oxígeno, incrementando el estrés oxidativo [89]. Por otro lado, aproximadamente el 25% de los individuos con DM2 cursan con un daño en los nervios periféricos en grado variable, pero no todos presentan síntomas. Diferentes factores de riesgo como la duración y la magnitud de la hiperglucemia, el tabaquismo, la hipertensión arterial y las dislipidemias facilitan la aparición de otras complicaciones como la nefropatía, la retinopatía y la enfermedad cardiovascular [90]. En el presente trabajo, los pacientes con DM2 tuvieron diferentes tiempos de evolución, desde una semana hasta 22 años de diagnóstico. La asociación de otras patologías que fueron consecuencia o favorecieron las complicaciones de la diabetes, principalmente hipertensión arterial (46%) insuficiencia renal (26%), cardiopatía (22%) y neuropatía (8%).

De acuerdo a diversas descripciones en la literatura, se reporta que las complicaciones en la DM2 se llegan a presentar de los 0-25 años de evolución [10]. En el presente estudio observamos que el paciente con la evolución de una semana con DM mostró mayor número de complicaciones con respecto al paciente con 22 años de evolución. Esto refleja que las complicaciones en los pacientes con DM2 dependerán del control de la hiperglucemia y de las medidas preventivas que se tomen, ya que la mayoría de los pacientes con DM2 no son diagnosticados a tiempo.

Los pacientes con DM2 deben seguir protocolos de prevención a diferentes aparatos y sistemas para evitar las diversas complicaciones. En general le dan poca importancia al cuidado de los pies, los cuales son afectados en el 15-80% [91] [14]. Tomando en cuenta que las alteraciones en los pies se producen cuando hay daño en los nervios periféricos, lo que resulta en la pérdida de la sensibilidad aunado a la insuficiencia vascular periférica y a los cambios en la piel; estos eventos pueden llegar a causar fisuras o úlceras en diferentes áreas de los pies, incluyendo los pliegues interdigitales donde se presenta mayor humedad e incremento en la temperatura. Estas condiciones favorecen la proliferación de microorganismos comensales y el establecimiento de los

patógenos [54]. En este estudio, 48 de los 50 pacientes presentaron colonización en los pliegues interdigitales; se aislaron 67 microorganismos: 50 bacterias (41 Gram positivos y 9 Gram negativos) y 17 hongos (12 levaduriformes y 5 dermatofitos). Las bacterias del género *Staphylococcus* fueron las que predominaron con 50 aislados, de los cuales 3 correspondieron a *S. aureus*. Redel y cols reportaron que las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativo son las que destacan en la piel, además son de baja virulencia y solo *S. aureus* es un potencial patógeno [59]. Sin embargo, en el presente trabajo se observó que no todos los aislados de *Staphylococcus* coagulasa negativa fueron de baja virulencia, ya que 8 de ellos mostraron resistencia por lo menos a 5 antibióticos; de los cuales 6 correspondieron a *Staphylococcus haemolyticus* y 2 a *S. epidermidis*. Existen descripciones en la literatura sobre la relación benéfica entre los *Staphylococcus* coagulasa negativa y el humano; sin embargo, Castro y cols mencionan que las infecciones nosocomiales producidas por estas bacterias son la causa principal de morbilidad y mortalidad; la especie más aislada ha sido *S. epidermidis*. Por otro lado, *S. haemolyticus* ha emergido como una especie clínicamente importante con alta resistencia a los antibióticos [92]. Estos microorganismos pueden llegar a presentar resistencia a la meticilina, y otros antibióticos incluyendo: rifamicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y sulfonamidas [93], similar a la resistencia observada en los aislados clínicos del presente estudio.

Por otra parte, Cag y cols reportaron que *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas aeruginosa* son los patógenos causantes de sepsis y choque séptico. Es común en estos aislados que presenten resistencia múltiple a fármacos de uso común en la práctica hospitalaria [94]. Los hallazgos observados en los aislados del presente trabajo fueron similares, lo que dificulta la erradicación de estos patógenos.

Otro grupo de microorganismos que es importante tomar en cuenta en los pacientes con DM2 son los hongos. Algunos reportes afirman que causan un mayor número de infecciones en estos pacientes en comparación con la población sana. Los agentes etiológicos pueden ser patógenos primarios o especies oportunistas que afectan diferentes órganos. Los factores que aumentan la frecuencia de las infecciones

fúngicas superficiales son: las condiciones del clima tropical, falta de higiene, condiciones socioeconómicas bajas y enfermedades que inmunosupriman al paciente. En general, estas infecciones no se autolimitan y la falta de tratamiento o manejo inadecuado puede acelerar su propagación [63] [95].

En el presente estudio se aislaron 17 hongos que correspondieron a 12 levaduras y 5 dermatofitos. Las levaduras tienen la capacidad para colonizar los pliegues interdigitales y causar infección en los pacientes con algún factor de oportunismo, ya que la mayoría son comensales en esa área anatómica. De éstas, 9 pertenecen a *Candida* spp. de los cuales *C. albicans* fue la especie que más se aisló. Otro hallazgo relevante fue el aislamiento de *C. glabrata* y *C. duobushaemulonii* los cuales presentaron resistencia a dos antifúngicos (fluconazol y anfotericina B). *Candida duobushaemulonii* es una especie que forma parte del complejo *C. haemulonii*. Esta especie no es común en los humanos, pero se sugiere que los pacientes con DM son más susceptibles a desarrollar patologías por esta levadura [96].

Las especies de *Trichosporon* causan infecciones superficiales y se ha demostrado que podrían ser reservorio para desencadenar una infección invasiva en los pacientes inmunosuprimidos [97]. De los aislados obtenidos en este estudio 2/3 se relacionaron con intertrigo interdigital. Vanhooiteghem y cols reportaron que las infecciones por hongos (intertrigo interdigital, *tinea pedis* y onicomicosis) son problemas de salud pública que podrían desencadenar otras infecciones secundarias graves, asociados a las bacterias [98]. También debe tomarse en cuenta la amplia gama de microorganismos (hongos y bacterias) que pueden colonizar los pliegues interdigitales por el desequilibrio entre las bacterias y hongos comensales por consecuencia del cambio en el microambiente en los pacientes con DM. En el presente estudio se observó que diversas especies de hongos y bacterias colonizaron los pliegues interdigitales. Además, los hongos fueron causantes de intertrigo en 5 pacientes.

Los microorganismos han desarrollado mecanismos complejos para promover su supervivencia, defenderse no sólo contra las condiciones ambientales o nutricionales adversas, sino también contra organismos competidores [76]. Estas interacciones entre los diferentes microorganismos pueden explicarse por el desarrollo de

biopelículas [72]. Este fenómeno se considera que es un nicho protegido para los microorganismos que están embebidos, para evitar la acción de los fármacos y ser una fuente de infección [77]. En este estudio, se aislaron diversos microorganismos que mostraron resistencia a diferentes antibióticos (bacterias) y antifúngicos (hongos). Si bien estos microorganismos ya presentan estas características, estar asociados a una biopelícula puede aumentar la resistencia o bien garantizar la permanencia de estos patógenos. Cabe mencionar que otro de los hallazgos, en dos aislados de *C. albicans*; y uno de cada uno de *C. duobushaemulonii*, *T. jirovecii* y 2 de *T. rubrum* fueron buenos formadores de biopelículas. En general, los dermatofitos formaron una red de hifas; esta estructura también puede garantizar la permanencia en los hospederos. En el ensayo de cuantificación de la actividad metabólica con XTT se observó que la DO estuvo por debajo de 0.1. Costa-Orlandi y cols [79] reportaron que la cuantificación de la actividad metabólica en los dermatofitos, debe ser medida de las 24 hasta las 120 h; en el presente estudio la lectura se efectuó a las 3 h, razón por la cual posiblemente el valor de DO fue muy bajo. El ensayo de biopelículas no ha sido descrito para *E. floccosum*, pero se observó que su comportamiento fue muy similar al de *T. interdigitale*.

El estudio *in vitro* de la formación de biopelículas demostró que estos microorganismos pueden ser capaces de persistir en el hospedero. Por ejemplo, el aislado de *T. jirovecii* (4MO) causante de intertrigo interdigital y relacionado con erisipela de repetición, resistió al tratamiento con ciclopiroxolamina administrado al paciente, ya que el hongo fue aislado a los 4 y 8 meses después.

En este estudio se demostró la presencia de microorganismos patógenos en los pliegues interdigitales, zonas de poco cuidado y de fácil colonización por los microorganismos. La coexistencia de hongos y bacterias en una estructura tan organizada como las biopelículas, garantiza la permanencia de éstos, proporcionando nutrientes y protección contra los fármacos; por otro lado, los pacientes con DM2 son una población susceptible a múltiples complicaciones, entre ellas las infecciones, causando cuadros más severos y complicados en su tratamiento. Es importante que cada paciente con DM2 tome las medidas necesarias respecto al cuidado de sus pies

y al control de la hiperglucemia para evitar todas las complicaciones de esta enfermedad.

7. Conclusiones

- El 96% de los pacientes con diabetes mellitus presentaron colonización por bacterias.
- En el 30% de los pacientes con diabetes mellitus se observó una colonización por hongos
- El 14% de los pacientes mostraron una coexistencia de hongos y bacterias en los pliegues interdigitales.
- En 5/11 pacientes con intertrigo interdigital se demostró la etiología fúngica
- Catorce de los aislados bacterianos mostraron multirresistencia a por lo menos 5 antibióticos.
- *Candida glabrata* y *C. duobushaemulonii* presentaron resistencia a fluconazol y anfotericina B.
- *Candida albicans*, *C. duobushaemulonii*, *Trichosporon jirovecii* y *Trichophyton rubrum* fueron buenos formadores de biopelículas.
- El uso del cepillo citológico fue una herramienta no invasiva y de fácil manejo para la toma de escamas.

8. Abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADS	Agar dextrosa Sabouraud
ADS-A	Agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida
AGE	“Advance glycosilation end-products” productos de glicosilación avanzada
AT	Agar tabaco
ATP	Agar tierra-pelos
col	colaborador
cols	colaboradores
CV	Cristal violeta
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DO	Densidad óptica
h	Horas
min	minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
seg	segundos
XTT	bis (2 metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) 2-H tetrazolio 5-carboxanilida

9. Anexos

Medios de cultivo

Agar dextrosa Sabouraud (ADS)

Componentes:

- Dextrosa 40 g
- Peptona de carne 5 g
- Peptona de caseína 5 g
- Agar 15 g
- Agua 1000 mL

Preparación:

- a) Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- b) Calentar hasta ebullición.
- c) Ajustar el pH a 5.6
- d) Esterilizar a 121°C por 15 min.
- e) Distribuir en placas de Petri.

Agar dextrosa Sabouraud con antibióticos (ADS-A)

Componentes:

- Peptona de harina de soya 10 g
- Dextrosa 10 g
- Agar 15.5 g
- Cicloheximida 0.4 g
- Cloranfenicol 0.05 g
- Agua 1000 mL

Preparación:

- a) Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- b) Calentar hasta ebullición.

- c) Ajustar el pH a 5.6
- d) Esterilizar a 121°C por 15 min.
- e) Distribuir en placas de Petri.

Agar CHROMagar Candida™

Componentes:

- Agar CHROMagar Candida™ 47.7 g
- Agua 1000 mL

Preparación:

- a) Adicionar el Agar CHROMagar Candida™ en un litro de agua destilada.
- b) Agitar hasta disolver.
- c) Calentar hasta ebullición.
- d) Esterilizar por ebullición dos min.
- e) Distribuir en placas de Petri.

Agar avena

Componentes:

- Agua 1000 mL
- Harina de avena SILK 150 g
- Agar 15 g

Preparación:

- a) Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- b) Calentar hasta ebullición.
- c) Esterilizar a 121°C por 15 min.
- d) Distribuir en placas de Petri.

Agar avena-amaranto

Componentes:

- Avena de amaranto 150 g
- Agar 15 g

- Agua 1000 mL

Preparación:

- Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- Calentar hasta ebullición.
- Esterilizar a 121°C por 15 min.
- Distribuir en placas de Petri.

Agar avena-sales

Componentes:

- MgSO₄ 1 g
- K₂HPO₄ 1.5 g
- NaNO₃ 1 g
- Avena 10 g
- Agar 18 g
- Agua 1000 mL

Preparación:

- Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- Calentar hasta ebullición.
- Esterilizar a 121°C por 15 min.
- Distribuir en placas de Petri.

Agar Harina de Maíz con Tween al 1%

Componentes:

- Agar Corn Meal 17 g
- Tween 80 10 mL
- Agua 1000 mL

Preparación:

- Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- Calentar hasta ebullición.

- c) Esterilizar a 121°C por 15 min.
- d) Distribuir en placas de Petri.

Agar Gorodwa

Componentes:

- Glucosa 1 g
- Peptona micológica 10 g
- NaCl 10 g
- Agar 20 g
- Agua 1000 mL

Preparación:

- a) Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- b) Calentar hasta ebullición.
- c) Esterilizar a 121°C por 15 min.
- d) Distribuir en placas de Petri.

Agar Mueller-Hinton

Componentes:

- Medio Mueller-Hinton 37 g
- Agar 15 g
- Agua 1000 mL

Preparación:

- e) Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- f) Calentar hasta ebullición.
- g) Esterilizar a 121°C por 15 min.
- h) Distribuir en placas de Petri.

Agar tierra pelos (ATP)

Componentes:

- Tierra (esterilizar 4 veces) 20 g

- Extracto de levadura 1 g
- Agar 15 g
- Dextrosa 5 g
- Agua 1000 mL
- 5 pelos

Preparación:

- a) Adicionar todos los componentes en un litro de agua destilada.
- b) Calentar hasta ebullición.
- c) Esterilizar a 121°C por 15 min.
- d) Distribuir en placas de Petri.
- e) Adicionar 5 pelos aproximadamente cuando este solidificando el agar.

Agar Tabaco

Componentes:

- Tabaco 50 g
- Agar 15 g
- Agua 1000 mL

Preparación:

- a) En 200 mL de agua destilada adicionar el tabaco.
- b) Dejar en ebullición por 20 min.
- c) Filtrar con gasas.
- d) Adicionar agua c.b.p. 1000 mL.
- e) Adicionar el agar
- f) Calentar hasta ebullición con agitación.
- g) Esterilizar por autoclave a 121°C 15 min.
- h) Distribuir en placas.

Caldo RPMI-Glucosa 2%

Componentes:

- RPMI 1640 10.4 g

- Amortiguador MOPS 34.5 g
- Glucosa 20 g
- Agua 1000 mL

Preparación:

- a) En un litro de agua destilada adicionar el RPMI, la glucosa y el MOPS.
- b) Agitar y ajustar el pH a 7.1 con NaOH 1M.
- c) Esterilizar por filtración (unidades filtro de 0.2 μ m).
- d) Conservar a 4°C.

Caldo YNB-Glucosa 2%

Componentes:

- Medio YNB 0.67 g
- Glucosa 2 g
- Agua 100 mL

Preparación:

- a) En un litro de agua destilada adicionar el medio YNB y la glucosa.
- b) Agitar 20 min.
- c) Esterilizar por filtración (unidades filtro de 0.2 μ m).
- d) Conservar a 4°C.

10. Bibliografía

- [1] Diabetes [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2016 [citado 28 agosto 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- [2] NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. [Internet]. 2010 [citado 28 agosto 2016]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010
- [3] Estadísticas Diabetes INEGI 2013 - Federación Mexicana de Diabetes A.C. [Internet]. Federación Mexicana de Diabetes A.C. 2014 [citado 28 agosto 2016]. Disponible en: <http://fmdiabetes.org/estadisticas-diabetes-inegi-2013/>
- [4] International Diabetes Federation [Internet]. Annual Report 2014. 2015 [citado 29 septiembre 2016]. Disponible en: <http://www.idf.org>
- [5] Röder P, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*. 2016;48(3):1-19.
- [6] DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst J, *et al*. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:1-22.
- [7] Chawla R, Chawla A, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab*. 2016;20(4):546-551.
- [8] Todd C. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther*. 2008;88(1):1322-1335.

- [9] Lazzarini L, Conti E, Tositti G, Lalla F. Erysipelas and cellulitis: clinical and microbiological spectrum in an Italian tertiary care hospital. *J Infect.* 2005;51(5):383-389.
- [10] Fazan V, Vasconcelos C, Valença M, Nessler R, Moore K. Diabetic peripheral neuropathies: a morphometric overview. *Int J Morphol.* 2010;28(1):51-64.
- [11] Halawa M, Karawagh A, Zeidan A, Mahmoud A, Sakr M, Hegazy A. Prevalence of painful diabetic peripheral neuropathy among patients suffering from diabetes mellitus in Saudi Arabia. *Curr Med Res Opin.* 2009;26(2):337-343.
- [12] Salvotelli L, Stoico V, Perrone F, Cacciatori V, Negri C, Brangani C, *et al.* Prevalence of neuropathy in type 2 diabetic patients and its association with other diabetes complications: The Verona Diabetic Foot Screening Program. *J Diabetes Complications.* 2015;29(8):1066-1070.
- [13] Pinés-Corrales P, Lomas-Meneses A. Neuropatías diabéticas. *Medicine.* 2012;11(17):1021-1031.
- [14] Boada A. Lesiones cutáneas en el pie diabético. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;113(5):348-356.
- [15] Chellan G, Shivaprakash S, Karimassery Ramaiyar S, Varma A, Varma N, Thekkeparambil Sukumaran M, *et al.* Spectrum and prevalence of fungi infecting deep tissues of lower-limb wounds in patients with type 2 diabetes. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2097-2102.
- [16] Arvanitis Mylonakis E. Fungal-bacterial interactions and their relevance in health. *Cell Microbiol.* 2015;17(10):1442-1446.

- [17] Wolf R, Oumeish O, Parish L. Intertriginous eruption. Clin Dermatol. 2011;29(2):173-179.
- [18] Galdeano F, Zaccaria S, Parra V, Giannini M, Salomon S. Manifestaciones cutáneas de la diabetes mellitus y su importancia clínica. Dermatología Argentina. 2010;16(2):117-121.
- [19] Ingordo V, Naldi L, Fracchiolla S, Colecchia B. Prevalence and risk factors for superficial fungal infections among italian navy cadets. Dermatology. 2004;209(3):190-196.
- [20] Kalra M, Higgins K, Kinney B. Intertrigo and secondary skin infections. Am Fam Physician. 2014;89(7):569-573.
- [21] Karaca S. Etiology of foot intertrigo in the district of Afyonkarahisar, Turkey. J Am Podiatr Med Assoc. 2008;98(1):42-44.
- [22] Ellis D, Davis S, Alexiou H, Handke R, Bartley R. Descriptions of medical fungi. Adelaide, Australia: Nexus Print; 2007.
- [23] Bonifaz A. Micología Médica Básica. 4ª ed. México: McGrawHill; 2012.
- [24] Spellberg B, Marr K, Filler S. *Candida*: What should clinicians and scientists be talking about? En: Calderone R, Clancy CJ. Candida and candidiasis. Washington DC: Hardcover; 2012, pp. 1-8.
- [25] Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004;12(7):317-324.
- [26] Klis F. Review: Cell wall assembly in yeast. Yeast. 1994;10(7):851-869.

- [27] Leite Jr DP, Yamamoto ACA, Martins ER, Teixeira AFR, Hahn RC. Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):675-80.
- [28] Kwon-Chung KG, Bennett J. Candidiasis. En: Kwon-Chung KG, Bennett J. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992, pp. 280-296.
- [29] Kleinegger C, Lockhart S, Vargas K, Soll D. Frequency, Intensity, Species, and Strains of Oral *Candida* Vary as a Function of Host Age. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2246–2254.
- [30] López Martínez R, Méndez-Tovar L, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F. *Principios de micología médica*. México: Méndez; 2009.
- [31] Hospenthal D, Beckius M, Floyd K, Horvath L, Murray C. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5(1):1-5.
- [32] Kirkpatrick W, Revankar S, McAtee R, Lopez-Ribot J, Fothergill A, McCarthy I, *et al*. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in north America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):3007–3012.
- [33] Odds F, Davidson A. “Room temperature” use of CHROMagar *Candida*™. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;38(3):147-150.
- [34] Glen M, Tommerup I, Bougher N, O'Brien P. Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability

to identification of ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus forests and plantations. *Mycol Res.* 2001;105(2):138-149.

[35] Martínez- Rivera MA. El género *Candida*. En: Méndez-Tovar L, López-Martínez R, Hernández-Hernández F. Actualidades en Micología Médica. México: Sefirot; 2012, pp: 174-180.

[36] Colombo A, Padovan A, Chaves G. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):682-700.

[37] Arenas Guzmán R. Micología médica ilustrada. 5a. ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2014.

[38] Romero-Navarrete M. Piedras y tiña negra. En: Méndez-Tovar L, López-Martínez R, Hernández-Hernández F. Actualidades en Micología Médica. México: Sefirot; 2012, pp 97-105.

[39] da Silva Rodrigues G, de Faria R, Guazzelli L, de Mattos Oliveira F, Severo L. Infección nosocomial por *Trichosporon asahii*: revisión clínica de 22 casos. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23(2):85-89.

[40] Fan Y, Huang W, Yang Y, Li W, Li S. Primary cutaneous trichosporonosis caused by *Trichosporon dermatis* in an immunocompetent man. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(2):434-436.

[41] Sugita T, Ichikawa T, Matsukura M, Sueda M, Takashima M, Ikeda R, *et al.* Genetic diversity and biochemical characteristics of *Trichosporon asahii* isolated from clinical specimens, houses of patients with summer-type-hypersensitivity pneumonitis, and environmental materials. *J Clin Microbiol.* 2001;39(7):2405-2411.

- [42] Ahmad S. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. J Med Microbiol. 2005;54(7):639-646.
- [43] Constans A. Maldi The Scientist Magazine® [Internet]. The Scientist. 2005 [citado 19 septiembre 2016]. Disponible en:
<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/16661/title/Maldi/>
- [44] Suh S, Carrion M, Grosso K, Houseknecht J. Characterization of the medically important yeast *Trichosporon mucoides* and its close sister *Trichosporon dermatis* by traditional and advanced technologies. J Med Microbiol. 2015;64(10):1135-1143.
- [45] Ainsworth G. Introduction to the history of medical and veterinary mycology. Cambridge: Cambridge University Press; 1986.
- [46] Manzano-Gayosso P, Zabicky-López J, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar L, Bazán-Mora E, Córdova-Martínez E et al. Reactivación morfológica de algunas especies de dermatofitos y su sensibilidad a antifúngicos. Rev Mex Micol. 2015; 41:47-53.
- [47] Rebell G, Taplin D, Blank H. Dermatophytes their recognition and identification. Miami: Library of Congress Catalog; 1964.
- [48] Kane J, Summerbell R, Sigler L, Kraiden S, Land G. Laboratory handbook of dermatophytes. Korea: Star Publishing Company; 1997.
- [49] Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. *Trichophyton mentagrophytes* sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. JDDG. 2007;5(3):198-202.

- [50] Kershenobich D. Facultad de Medicina UNAM [Internet]. Facmed.unam.mx. 2016 [citado el 3 Octubre 2016]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2007/oct_01_ponencia.html
- [51] Molina López J, Uribarren Berrueta T. Generalidades de bacterias - Recursos en Bacteriología - UNAM [Internet]. Facmed.unam.mx. 2016 [citado el 3 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
- [52] Xaus J. Papel fisiológico de las bacterias comensales. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al día*. 2004;3(3):82-89.
- [53] Santamaría-González V, Alvarado-Delgadillo A. Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2002;11(1):18-21.
- [54] Tüzün Y, Wolf R, Engin B, Keçici A, Kutlubay Z. Bacterial infections of the folds (intertriginous areas). *Clin Dermatol*. 2015;33(4):420-428.
- [55] Martínez-Gómez D, Ramírez-Almagro C, Campillo-Soto Á, Morales-Cuenca G, Pagán-Ortiz J, Aguayo-Albasini J. Infecciones del pie diabético. Prevalencia de los distintos microorganismos y sensibilidad a los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(6):317-321.
- [56] Peters B, Jabra-Rizk M, O'May G, Costerton J, Shirtliff M. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(1):193-213.
- [57] Belkaid Y, Tamoutounour S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):353-366.

- [58] Underhill D, Iliev I. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):405-416.
- [59] Redel H, Gao Z, Li H, Alekseyenko A, Zhou Y, Perez-Perez G, *et al*. Quantitation and composition of cutaneous microbiota in diabetic and nondiabetic Men. *J Infect Dis*. 2013;207(7):1105-1114.
- [60] Leyden J. *Tinea pedis* pathophysiology and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31(3):S31-S33.
- [61] M. Egert y R. Simmering. En: Schwiertz A. *Microbiota of the human body.*, Suiza: Springer; 2016, pp 61-71.
- [62] Zarrin M, Babadi N. Mycoflora of the interdigital spaces among girl students in Ahvaz, Iran. *JJM*. 1970;7(8):1-3.
- [63] Mlinarić-Missoni E, Kalenić S, Važić-Babić V. Species, Distribution and frequency of isolation of yeasts and dermatophytes from toe webs of diabetic patients. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2005;13(2):85-92.
- [64] Hassab-El-Naby H, Mohamed Y, Abdo H, Kamel M, Hablas W, Mohamed O. Study of the etiological causes of toe web space lesions in Cairo, Egypt. *Dermatol. Res. Prat*. 2015; 2015:1-7.
- [65] Sariguzel F, Nedret Koc A, Yagmur G, Berk E. Interdigital foot infections: *Corynebacterium minutissimum* and agents of superficial mycoses. *Braz J Microbiol*. 2014;45(3):781-784.
- [66] Khan M, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarrat J. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. En:

Ahmad I, Owais M, Shahid M, Aqil F. Combating Fungal Infections Problems and remedy. Germany. Springer; 2010. pp: 21-45.

[67] De la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. Rev CES Med. 2012;26(1):43-55.

[68] Duarte T, Oliveira S, Macrae A, Cedrola S, Mazotto A, Souza E, *et al.* Increased expression of keratinase and other peptidases by *Candida parapsilosis* mutants. Braz J Med Biol Res. 2011;44(3):212-216.

[69] Mayer F, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-128.

[70] Bentubo H, Gompertz O. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. SpringerPlus. 2014;3(1):377.

[71] Iturrieta-González I, Padovan A, Bizerra F, Hahn R, Colombo A. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. PLoS ONE. 2014;9(10): 1-10.

[72] Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda L, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas L. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Rev Iberoam Micol. 2012;29(4):214-222.

[73] Potera C. Microbiology: Forging a link between biofilms and disease. Science. 1999;283(5409):1837-1839.

- [74] Sztajer H, Szafranski S, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, *et al.* Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. ISME J. 2014;8(11):2256-2271.
- [75] Flemming H, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Rev Microbiol. 2016;14(9):563-575.
- [76] Peleg A, Hogan D, Mylonakis E. Medically important bacterial–fungal interactions. Nature Rev Microbiol. 2010;8(5):340-349.
- [77] Chandra J, Mukherjee P. *Candida* Biofilms: development, architecture, and resistance. Microbiol Spectr. 2015;3(4):1-24.
- [78] Di Bonaventura G, Pompilio A, Picciani C, Iezzi M, D'Antonio D, Piccolomini R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(10):3269-3276.
- [79] Costa-Orlandi C, Sardi J, Santos C, Fusco-Almeida A, Mendes-Giannini M. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. Biofouling. 2014;30(6):719-727.
- [80] Dilak R, Kumar D, Banerjee T, Chakravarty J, Singh S, Dwivedi A. Identification, antifungal resistance profile, *in vitro* biofilm formation and ultrastructural characteristics of *Candida* species isolated from diabetic foot patients in Northern India. Indian J Med Microbiol. 2016;34(3):308-314.
- [81] McGinnis R. Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York: Academic Press; 1980.

- [82] Rimek D, Fehse B, Göpel P. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 2008;51(3):205-208.
- [83] Khan Z, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco Agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4796-4798.
- [84] Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar M, Jalalizand N, *et al*. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol*. 2013;51(6):657-663.
- [85] Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyyathel A, Chandy R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Infect Dis*. 2012; 12:230. doi: 10.1186/1471-2334-12-230.
- [86] MacFaddin J. Prueba de la ureasa. En: MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Argentina: Panamericana; 2000, pp. 397-410.
- [87] Melo A, Bizerra F, Freymüller E, Arthington-Skaggs B, Colombo A. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol*. 2011;49(3):253-262.
- [88] Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum M. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*. 2008;3(12):1909-1924.

- [89] Orasanu G, Plutzky J. The Continuum of Diabetic Vascular Disease: From Macro- to Micro-. *J Am Coll Cardiol.* 2009;5(53):1-15.
- [90] López-Alburquerque T, Pascual Gómez J. Neuropatías diabéticas. Factores de riesgo. Valoraciones pronósticas. Planificación de seguimiento. Medidas terapéuticas. 2008;10(17):1130-1137.
- [91] López Jiménez L, Lomas Meneses A, Quílez Toboso R, Huguet Moreno I. El pie diabético. *Medicine.* 2012;11(17):1032-1039.
- [92] Castro N, Loaiza-Loeza M, Calderón-Navarro A, Sánchez A, Silva-Sánchez J. Estudio molecular de *Staphylococcus haemolyticus* resistente a meticilina en un hospital de México. *Rev Invest Clin.* 2006;58(6):580-585.
- [93] Otto M. *Staphylococcus epidermidis* the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(8):555-567.
- [94] Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. Resistance mechanisms. *Ann Transl Med.* 2016;4(17):326-326.
- [95] Metin A, Dilek N, Demirseven D. Fungal infections of the folds (intertriginous areas). *Clin Dermatol.* 2015;33(4):437-447.
- [96] Boatto H, Cavalcanti S, Del Negro G, Girão M, Francisco E, Ishida K, *et al.* *Candida duobushaemulonii*: an emerging rare pathogenic yeast isolated from recurrent vulvovaginal candidiasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(6):407-410.
- [97] Chagas-Neto T, Chaves G, Colombo A. Update on the Genus *Trichosporon*. *Mycopathologia.* 2008;166(3):121-132.

[98] Vanhooiteghem O, Szepetiuk G, Paurobally D, Heureux F. Chronic interdigital dermatophytic infection: A common lesion associated with potentially severe consequences. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;91(1):23-25.