



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de química

Tesis

**“Candidosis oral mixta en pacientes con
Diabetes Mellitus tipo 2; identificación y espectro
de sensibilidad”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Química Farmacéutica Bióloga**

PRESENTA

Ana Karen Carrillo Jiménez

ASESOR DE TESIS

QFB José Alejandro Bonifaz Trujillo

Ciudad Universitaria, CDMX

2019



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: Profesor: Abel Gutiérrez Ramos

VOCAL: Profesor: José Alexandro Bonifaz Trujillo

SECRETARIO: Profesor: Misael González Ibarra

1er. SUPLENTE: Profesor: Francisco Javier Díaz García

2do. SUPLENTE: Profesor: Javier Araiza Santibáñez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. José Alexandro Bonifaz Trujillo _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. Javier Araiza Santibáñez _____

SUSTENTANTE:

Ana Karen Carrillo Jiménez _____

ÍNDICE	pág(s).
I. RESUMEN ESTRUCTURADO	5
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
III. JUSTIFICACIÓN	7
IV. HIPÓTESIS	7
V. OBJETIVO GENERAL	8
5.1 Objetivos específicos	8
VI. ABREVIATURAS	9
VII. ANTECEDENTES	
7.1 Candidosis Oral (CO)	
7.1.1 Definición de CO	10
7.1.2 Agentes etiológicos	10
7.1.3 Agentes etiológicos en CO mixtas	13
7.1.4 Patogenia	13
7.1.5 Epidemiología	17
7.1.6 Factores predisponentes	18
7.1.7 Aspectos clínicos	20
7.1.8 Tratamiento	22
7.2 Diabetes Mellitus (DM)	
7.2.1 Definición	23
7.2.2 Tipos de DM	24
7.2.3 Estado inmune del paciente con DM2	28
7.2.4 Control metabólico	29
7.2.5 Complicaciones orales	31
7.2.6 Tratamientos control de DM2	32
7.2.7 Expectativas de la DM2 en nuestro país	33
7.3 Métodos de identificación	
7.3.1 Medios de cultivo	34
7.3.1.1 Cromogénicos	35
7.3.2 Pruebas morfológicas	
7.3.2.1 Agar <i>Corn- Meal</i> + Tween 80	36

7.3.3 Pruebas bioquímicas	37
7.3.3.1 Zimogramas y auxonogramas	37
7.4 Resistencia a antifúngicos	
7.4.1 Clasificación de resistencia	39
7.4.2 Agentes antifúngicos	40
7.4.3 Determinación de CIMs y pruebas comerciales	40
7.5 Relevancia y expectativas	42
7.6 Alerta hospitalaria mundial por <i>Candida auris</i>	43
VIII. METODOLOGÍA	
8.1 Tipo y diseño del estudio	44
8.2 Población y tamaño de la muestra	44
8.3 Criterios de inclusión y exclusión	45
8.4 Definición de las variables a evaluar	46
IX. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
9.1 Cronograma de actividades	48
9.2 Toma y procesamiento de la muestra	48
X. RESULTADOS	53
XI. DISCUSIÓN	70
XII. CONCLUSIONES	76
XIII. ANEXOS	
13.1 Consentimiento informado	77
13.2 Hoja de recolección de datos	81
XIV. REFERENCIAS	83

I.- RESUMEN ESTRUCTURADO

CANDIDOSIS ORAL MIXTA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2; IDENTIFICACIÓN Y ESPECTRO DE SENSIBILIDAD

PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA: Los pacientes con Diabetes Mellitus (DM) cuentan con cierta predisposición a contraer infecciones de tipo oportunista causadas por hongos levaduriformes, en especial del género *Candida*. Una infección de este tipo puede ser causada por varias especies de dicho género creando sinergismo invasivo impidiendo que los tratamientos sean efectivos y favoreciendo la aparición de cuadros clínicos más agresivos; por ello es importante identificar los agentes etiológicos responsables de las infecciones causadas por el género *Candida* en cavidad oral de pacientes con DM tipo 2, así como la determinación de susceptibilidad antifúngica específica.

OBJETIVOS: Determinar la frecuencia de candidosis mixtas y tipificar las especies involucradas en la cavidad bucal de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con niveles elevados de glucosa en sangre ($\geq 7\%$ de hemoglobina glucosilada); así como la susceptibilidad antimicótica mínima inhibitoria para las especies identificadas en las candidosis mixtas.

HIPÓTESIS: El hallazgo de candidosis oral mixta en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 con niveles elevados de glucosa en sangre ($\geq 7\%$ de hemoglobina glucosilada) será similar al de otros grupos con predisposición al desarrollo de esta entidad clínico-etiológica.

METODOLOGÍA: Se incluyeron pacientes hospitalizados y ambulatorios, con diagnóstico de DM2 y descompensación glucémica tomándose como referencia niveles $\geq 7\%$ de hemoglobina glucosilada, de la Unidad de Endocrinología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", con la previa autorización de los mismos mediante su firma en el formato de consentimiento informado, se llevó a cabo una exploración visual de la cavidad bucal con el fin de hallar lesiones clínicas compatibles con candidosis oral y en el caso de los que cumplieron con los

criterios de inclusión, se les tomó una muestra mediante raspado suave de la mucosa oral, para análisis microscópico (examen directo con KOH al 10%) y cultivos, con el desarrollo obtenido en los cultivos se identificó la presencia de más de una especie, a éstas se les realizaron pruebas de identificación (fisiológicas y bioquímicas), así como análisis de susceptibilidad para antimicóticos mediante pruebas comerciales disponibles.

RESULTADOS: Se incorporaron al estudio 72 pacientes con DM2 descontrolada, 89% se encontraban hospitalizados y 11% fueron de consulta externa; de tales muestras, 63(87.5%) resultaron positivas ante el diagnóstico de CO, 38 (60.3%) de estos pacientes fueron mujeres y 25(39.7%) hombres. La variedad clínica más frecuente fue la aguda pseudomembranosa, seguida de la aguda atrófica, la crónica hiperplásica y la menos frecuente la queilitis angular. Se aislaron 72 cepas: *C. albicans* (74%), *C. tropicalis* (11%), *C. glabrata* (5.5%), *C. dubliniensis* (4.16%), *C. krusei* y *C. kefyr*, ambas con (2.77%). El 1.3% correspondió a *Kloeckera apiculata*. El porcentaje de candidosis mixtas constituye el 13%. La especie proveniente de aislados de CO mixta en pacientes descompensados con DM2 que resultó ser más sensible a los tres antimicóticos evaluados: Fluconazol, Itraconazol y Ketoconazol fue *C. kefyr* (83.3%), *C. krusei* (66.7%) en la mayoría de los aislados fue SDD y la especie con más resistencia fue *C. glabrata* (55.6%), con una relación estadísticamente significativa ($p=0.015$). Ketoconazol fue el único antimicótico que presentó asociación entre presencia de resistencia a una especie (66.7% de *C. glabrata* vs. 0% las demás especies) con un valor de $p=0.018$.

PALABRAS CLAVE: Candidosis oral, Diabetes Mellitus tipo 2, *Candida* spp., *Candida albicans*

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que los pacientes con DM cuentan con cierta predisposición a contraer infecciones de tipo oportunista, en especial por hongos levaduriformes del género *Candida*. La importancia de una infección localizada o superficial como la Candidosis Oral (CO) es que se puede diseminar a diferentes órganos y sistemas sometiendo a riesgo la vida del paciente. Dicha infección puede ser causada por varias especies de este género creando sinergismo invasivo, haciendo que los tratamientos terapéuticos no sean específicos contra las especies causantes; por esta razón y debido a que no existe suficiente información sobre el tema en nuestro país, se realizará mediante estudios micológicos el diagnóstico oportuno de las infecciones causadas por el género *Candida* en cavidad oral de pacientes con DM2, la identificación de las diferentes especies causantes, además de la determinación de susceptibilidad antifúngica específica en aquellas que causen CO mixta.

III.- JUSTIFICACIÓN

Existe poco conocimiento de candidosis orales mixtas en pacientes con diabetes en nuestro país y considerando que actualmente la diabetes mellitus, en especial tipo 2, es una enfermedad en constante aumento, es necesario determinar la frecuencia de CO mixta, identificar las especies del género *Candida* responsables de dicha afección, así como su espectro de susceptibilidad antifúngica.

IV.- HIPÓTESIS

El diagnóstico de candidosis oral mixta será más frecuente en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 con niveles elevados de glucosa en sangre (mayor a 7% de hemoglobina glucosilada) en comparación con otros grupos de pacientes, debido a que los pacientes con diabetes tienen una disminución en la adherencia, quimiotaxis, fagocitosis, etc. de células del sistema inmune, mal control metabólico como hiperglucemia (HbA1c $\geq 7\%$) entre otros; que, propician las condiciones nutrimentales necesarias para el desarrollo de *Candida*.

Debido al uso profiláctico (en casos de trasplantes, SIDA, enfermedades autoinmunes tratadas con corticosteroides) y tratamientos repetidos por micosis

recidivantes de diversos antimicóticos; se encontrará una mayor cantidad de especies resistentes a los antimicóticos de uso común.

V.- OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de candidosis mixtas y tipificar las especies involucradas en la cavidad oral de pacientes con DM2 con niveles elevados de glucosa en sangre ($\geq 7\%$ de hemoglobina glucosilada); así como la concentración antimicótica mínima inhibitoria para las especies causantes de CO mixta.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar la incidencia de CO mixta en pacientes ambulatorios y en pacientes hospitalizados con DM2 descompensados (nivel de HbA1c mayor o igual a 7%), del servicio de endocrinología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"
- Determinar la frecuencia de las diferentes variedades clínicas que se presentan en candidosis de la cavidad oral de los pacientes objeto del presente estudio.
- Identificar las diferentes especies de *Candida* spp. causantes de la infección en cada paciente.
- Comparar la frecuencia de CO mixta en los principales sectores etarios: jóvenes-adultos, adultos, ancianos.
- Comparar la frecuencia de CO mixta tanto en mujeres como hombres.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria a los principales antimicóticos comerciales: fluconazol, itraconazol y ketoconazol; de las especies involucradas en CO mixtas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.
- Determinar el riesgo de CO mixta en base al grado de descontrol glucémico en los pacientes con diabetes mellitus 2 (análisis por estratos de HbA1c)
- Determinar la incidencia de CO mixta en base al tiempo de diagnóstico de diabetes mellitus 2
- Comparar la incidencia de CO mixta en base al tratamiento antidiabético empleado (Metformina, inhibidores de SGLT-2, inhibidores de DPP IV, insulina, etc).

VI.- ABREVIATURAS

DM2= Diabetes Mellitus tipo 2

KOH= Hidróxido de Potasio

Hb= Hemoglobina

HbA1c= Hemoglobina glucosilada

CO= Candidosis Oral

inhibidores de SGLT-2= Inhibidores del transportador de sodio-glucosa tipo 2

inhibidores de DPP IV= Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4

MDR= MultiDrogo Resistente

Insulina NPH= Insulina humana de acción intermedia

TDZ= Tiazolidinedionas (glitazonas)

PCR= (sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) Reacción en Cadena de la Polimerasa

CIMs= Concentraciones Inhibitorias Mínimas

SDD=Susceptible a Dosis Dependiente

FLZ=Fluconazol

ITZ=Itraconazol

KTZ=Ketoconazol

NCA= no *C. albicans*

VII.- ANTECEDENTES

7.1 Candidosis Oral (CO)

7.1.1 DEFINICIÓN DE CO

El término candidosis oral (llamada también algodoncillo, *trush* o muguet)¹ hace referencia a la micosis localizada en el área bucal; afectando ya sea de manera aguda o crónica, uno o varios sitios tales como la superficie de la lengua, paladar, carrillos, o bien comisuras labiales; causada por diversas especies de hongos levaduriformes oportunistas que pertenecen al género *Candida*, siendo la más aislada *C. albicans* seguida de un grupo denominado no-*C. albicans* (NCA); que, en condiciones normales no generan enfermedad, ya que forman parte integral de la microbiota habitual de la mucosa oral.

Como tal no es una enfermedad mortal, aunque provoca molestias de diferente grado y altera el gusto, haciendo desagradable y dolorosa la ingesta, lo que lleva a una disminución del apetito, que puede resultar fatal en enfermos que precisen una ingesta hipercalórica como es el caso de los VIH (+), pacientes hospitalizados o ancianos. Junto a ello, puede ser la puerta de entrada de otras formas de candidosis más graves, como la esofágica o la sistémica.²

7.1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS

Los organismos que habitan en la cavidad oral son componentes críticos que marcan diferencia entre la enfermedad y la salud, es por ello que se han revelado perfiles del microbioma oral "basal" de individuos sanos, mostrando que, en todas las muestras estudiadas, las especies de *Candida* fueron las más frecuentes (aisladas del 75% de los participantes)³, seguidas de *Saccharomycetales* (50%), *Cryptococcus sp.* (20%) y otros hongos levaduriformes como *Geotrichum sp.* y *Trichosporon sp.* Por lo que no es de extrañar que la CO sea la principal patología fúngica en dicha cavidad.

En cuanto a los aislados en boca, la incidencia de *C. albicans* sigue siendo la más frecuente, con porcentajes mayores al 50% en pacientes con leucemias, quimioterapia (90%), con VIH (71%)⁴, personas que usan dentaduras removibles

(65%)⁵ y en pacientes con DM (55%); sin embargo, en varias partes del mundo reportan aislados de especies englobadas en un grupo denominado no-*C. albicans* que causan las mismas manifestaciones que *C. albicans*, pero difieren respecto a los factores de virulencia y lo más importante para la terapia; el patrón de susceptibilidad a antifúngicos. En este grupo están implicadas aproximadamente 15 especies aisladas en infección oral⁶. *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, son las más comúnmente reportadas, seguidas de *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*⁶, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. zeylanoides*⁷, *C. famata*⁸, *C. intermedia*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica*⁹, agregándose también el aislamiento de *C. pulcherrima* en esta cavidad¹⁰.

Es de importancia mencionar que una célula de *Candida* está compuesta por núcleo, mitocondrias, vacuolas, ribosomas, retículo endoplásmico, una membrana celular formada por ergosterol y pared celular (la cual está constituida por β -(1,3)-D-glucano en porcentaje de 50-70%, manano 20%, quitina de 10 a 20% y en menores porcentajes aprox. 6% por proteínas y lípidos¹¹) a dicha forma unicelular se le conoce como blastoconidio que pueden tener diferentes formas, ya sea ovoide, elongado, esférico con tamaños desde 2 y hasta 10 μm de diámetro¹; que a partir de la reproducción asexual por fisión binaria forma gemas de la mitad de su tamaño y que en situaciones adversas como por ejemplo medios pobres, viejos o situaciones difíciles al parasitar, algunos grupos de blastoconidios permanecen unidos a su célula madre hasta que se forman cadenas largas llamadas pseudohifas (forma pluricelular), demostrándose así su dimorfismo, cabe recordar que la excepción a la producción de pseudomicelio es *Candida glabrata*.

Además de presentar reproducción asexual en la mayoría de las especies de importancia médica (estados anamorfos), existen reportes del estado teleomorfo por reproducción sexual de especies de *Candida* (tabla 1) que se lleva a cabo por meiosis mediante la formación de ascas que en su interior tienen ascosporas principalmente en números pares, con más frecuencia 2,4 y 6.^{1,11}

En los últimos años, estudios multigénicos^{1,12} han permitido demostrar que muchas especies que tradicionalmente se consideraban como simples morfoespecies, constituyen en realidad complejos de especies (tabla 1).

Tabla 1. Nombres anamorfos y teleomorfos así como complejos de las principales especies de *Candida* con importancia médica.

Nombre anamorfo	Nombre teleomorfo	Sexualidad	Denominación de Complejo	Especies que lo comprenden
Especies más frecuentes			<i>Candida albicans</i> Complex	<i>C. albicans</i> (ss) <i>C. dubliniensis</i> <i>C. africana</i>
<i>Candida albicans</i>	-	a/p		
<i>C. parapsilosis</i>	-	a		
<i>C. tropicalis</i>	-	a/p	<i>Candida parapsilosis</i> Complex	<i>C. parapsilosis</i> (ss) <i>C. metapsilosis</i> <i>C. orthopsilosis</i>
<i>C. dubliniensis</i>	-	a/p		
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>	a/s		
<i>C. auris</i>	-	a		
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	a/s		
<i>C. famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	a/s	<i>Candida glabrata</i> Complex	<i>C. glabrata</i> (ss) <i>C. bracarensis</i> <i>C. nivariensis</i>
Especies en aumento				
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	a/s	<i>C. haemulonii</i> Complex	<i>C. haemulonii</i> (ss) <i>C. duobushaemulonii</i> <i>C. haemulonii</i> var. <i>vulvera</i>
<i>C. glabrata</i>	-	a		
<i>C. kefyri</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	a/s		
<i>C. norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>	a/s		
<i>C. pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i>	a/s		
<i>C. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	a/ s		
a= asexual; p= parasexual; s= sexual				

Una consecuencia importante desde un punto de vista clínico radica en el hecho de que muchas de estas nuevas especies que forman parte de un agregado/complejo o que son “gemelas” de otras especies, pueden diferir en su sensibilidad a los antifúngicos utilizados comúnmente en la terapéutica clínica.

Estas levaduras crecen de 2 a 3 días a temperatura entre 25-28°C, su rango óptimo de pH es 4.5 y 6.5¹. Se alimentan de carbohidratos simples como glucosa y fructosa, pero también de disacáridos: maltosa, sacarosa, lactosa (especies que cuentan con el complejo zimasa) lo cual es aprovechado en las pruebas bioquímicas para la tipificación de especies^{1,11}. Son ureasa negativa y no son formadoras de cápsula. En 2005, Morris-Jones y col.¹³ aislaron partículas de melanina provenientes de

varias cepas de *C. albicans*, al igual que de riñón murino infectado y tejido de la piel humana.

7.1.3 AGENTES ETIOLÓGICOS EN CO MIXTAS

En un estudio realizado en Latinoamérica por Suárez y colaboradores en 2013 sobre CO en pacientes con DM2, encontraron que la especie predominante es *C. albicans* con un 30%, respecto a candidosis mixtas reportan un porcentaje de 4.9% siendo las especies asociadas más frecuentes: *C. krusei* y *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. albicans*.¹⁴

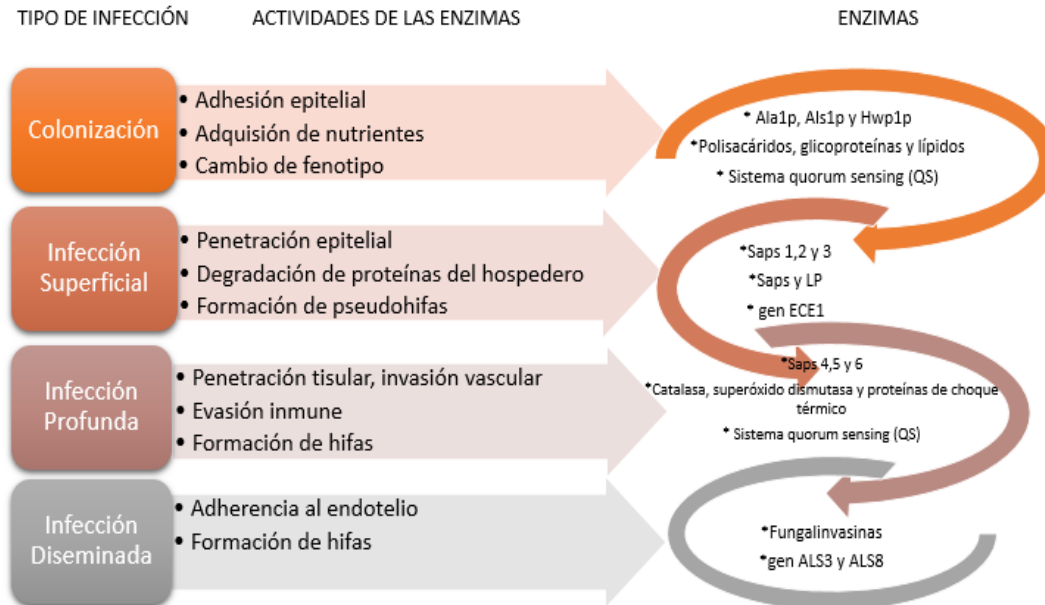
Por otra parte, Mohammadi ¹⁵ y colabores reportaron que de 58 pacientes diabéticos tipo 2, el 55% fue positivo con CO por especies del género *Candida*. Los porcentajes de dichas especies fueron: 36.2% *C. albicans*, 5.2% *C. krusei*, 3.4% *C. glabrata*, 3.4% *C. tropicalis*, es importante señalar que también identificaron pares de especies en las muestras.

7.1.4 PATOGENIA

Un principio central en la patogenia de la candidosis oral es la inmunosupresión ya sea defectos en el número o función de leucocitos polimorfonucleares (PMN), linfocitos T y B; así como otras condiciones que comprometen la barrera de la mucosa que puede ser un requisito previo para la infección. Adicionalmente, se encuentran factores de virulencia expresados por parte de *Candida* que, influyen de manera coordinada en el desarrollo de esta entidad clínica; y que varían según el tipo, sitio y la naturaleza de las defensas del hospedero.¹⁶

Lo anterior toma sentido, ya que dependiendo de la etapa de infección; que se divide en 4 (colonización, infección superficial, infección profunda e infección diseminada); se van a secretar enzimas correspondientes en cada una de ellas, las que también ayudan a sobrevivir como comensal, la adherencia a células del hospedero, la secreción de enzimas degradativas y el cambio de morfología respectivamente. En el diagrama 1 se muestra la relación de cada enzima, su función y la etapa a la que pertenece.

Diagrama 1. Los 4 tipos de infección con sus respectivas actividades de patogenicidad y las enzimas encargadas de llevarlas a cabo.^{17,18}



-MORFOGÉNESIS.

Es la transición entre el blastoconidio (levadura unicelular) y la forma de crecimiento filamentosa (pluricelular) del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a blastoconidio.

Se tienen reportes que el crecimiento de pseudohifa tiene ventajas sobre el blastoconidio en la penetración de la célula o tejido, debido principalmente a dos razones: 1) gracias a que su extremo de crecimiento es el sitio de secreción de enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, se facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos¹⁷, 2) la detección particular de hifas de *C. albicans*, estimula la producción de péptidos antimicrobianos, patrones moleculares asociados al peligro y citocinas que funcionan para reducir la carga de hongos, lo que nos habla de que a la forma de pseudohifa de la levadura, sí la reconoce el sistema inmune como infección.^{18,19}

-ENZIMAS EXTRACELULARES.

La producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como las fosfolipasas (PL) lisan los fosfolípidos de la membrana celular causando daño en el tejido del hospedero, por su parte las aspartil proteinasas (Saps) ayudan a la evasión del

sistema inmunitario del hospedero a través de la degradación de la albúmina, la α -macroglobulina y otras proteínas humanas.²⁰

La hemolisina es otro factor de virulencia que facilita la infección diseminada ya que, al lisarse el eritrocito, permite que *Candida* spp adquiera hierro (Fe^{2+}), que es esencial para la supervivencia de la levadura²². Otras enzimas con que cuenta este patógeno son catalasas, superóxido dismutasa y proteínas de choque térmico ante especies reactivas de oxígeno producidas por el sistema inmune del hospedero.

-EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN REACCIÓN AL MEDIO AMBIENTE.

Durante los diferentes estados y tipos de infección las células del hongo necesitan amplia flexibilidad, ya que cada sitio anatómico tiene sus propias presiones ambientales. Por ejemplo, *C. albicans* tiene el gen PHR1 que codifica para una glucoproteína de superficie anclada en su membrana por el glucosil-fosfatidilinositol y se expresa fuertemente cuando el pH del medio de crecimiento es mayor a 5.5, pero es indetectable por valores menores a este pH.¹

-ADHESINAS.

Un atributo del género *Candida* y en especial de *Candida albicans* es que correlaciona de forma positiva su patogenicidad con la capacidad adherente a las células del hospedero. Una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia del hongo a las células del hospedero o a sus ligandos específicos. Las principales son: manoproteínas y mananas. Se han descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV.^{17, 22}

Existen otros diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p que sirve como sustrato de las transglutaminasas y, por lo tanto, favorecen la unión estable y covalente de la hifa de *C. albicans* a las células epiteliales de la boca.

-DAÑO EPITELIAL.

Una vez adheridas a la superficie epitelial, las hifas de *C. albicans* invaden y penetran las barreras de la mucosa al iniciar un proceso dinámico y complejo

impulsado por el hospedero llamado endocitosis inducida por el receptor (RIE), el cual se desencadena por el reconocimiento epitelial de invasinas fúngicas expresadas en la pared celular de la hifa y se produce dentro de las 4 h de contacto inicial con las células epiteliales.¹⁸

Asimismo, otra de las características de la infección es el daño al epitelio superficial, mediado por candidalísina, una toxina peptídica anfipática de doble función secretada por la extensión del gen de alargamiento celular (ECE1).²³ Esta toxina, adopta una conformación helicoidal que se intercala en la membrana plasmática de las células epiteliales, y forma lesiones heterogéneas y transitorias que desestabilizan la estructura de la membrana, causan la entrada de calcio y la liberación de contenidos intracelulares.¹⁸

-FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos unidos irreversiblemente a una superficie mediante una matriz y que muestra propiedades fenotípicas distintivas. La formación de biopelículas de *C. albicans* está regulada por el factor de transcripción Bcr1p, contribuyendo también la adhesina Hwp1; se distingue por la adhesión inicial de blastoconidios, seguida por la gemación y formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración²⁴; así como de la liberación de DNA extracelular (eDNA) por parte de la levadura, el cual es un elemento de la matriz en dichas biopelículas maduras, ya que juega un papel predominante en su integridad estructural y su mantenimiento.

Se ha comprobado que, en condiciones inflamatorias o inmunocomprometidas del hospedero, es posible que los recursos ecológicos, como el espacio y los nutrientes, favorezcan a las especies bacterianas que establecen una relación sinérgica con *C. albicans*, como un ejemplo de disbiosis fúngico-bacteriana, amplificando el daño en la mucosa oral²⁵. Recientemente se ha demostrado crecimiento filamentoso de *C. albicans* en presencia de ciertas bacterias comensales; tales como especies estreptocócicas del grupo *mitis*.^{26, 27}

Así como hay sinergismo, también se ha demostrado antagonismo ya que, al reducirse de forma significativa el pH ambiental, gracias a los ácidos lácticos

producidos por bacterias como estreptococos, enterococos, lactobacilos se ve influida negativamente la filamentación de *C. albicans*.²⁸ Inclusive existe una cierta respuesta reciproca de *Candida* la cual favorece el crecimiento de bacterias, existiendo reportes de experimentos *in vitro* que demuestran que dichas biopelículas crean micro-nichos hipóxicos o anóxicos que permiten el crecimiento de bacterias anaerobias obligadas bajo tensión de oxígeno ambiental.²⁹

7.1.5 EPIDEMIOLOGÍA

Los estudios epidemiológicos de la mucosa oral son escasos; sin embargo, dentro de los encontrados la mayoría son enfocados a inmunodeficiencias primarias o adquiridas, mencionándose VIH/SIDA, leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin, etc, y son aún menos los reportes en el estudio de enfermedades en aumento como la DM2. Este último hecho debe cambiar puesto que las infecciones bucales no solo aumentan el riesgo de esta enfermedad crónica, sino también son la cuarta causa de morbilidad más costosa de tratar.³⁰

La CO es la patología infecciosa de la boca más común reportada en los centros hospitalarios mexicanos con porcentajes desde 30 a 50%,³⁰ y en pacientes con DM2 hasta en un porcentaje de 80%, dentro de estos hay un predominio en aquellos con larga evolución o con altos niveles de glucosa en sangre (en promedio mayores a 7% de HbA1c).^{31, 32} Su importancia radica en que pueden constituir un síntoma o signo inicial de diabetes en pacientes de cierta evolución no diagnosticados o ser indicadores de descompensación metabólica en enfermos conocidos y tratados.³³

Esta infección se considera de vía de entrada endógena, debido a que *Candida* forma parte de la microbiota habitual de la boca, por ello mismo, el periodo de incubación no es conocido con exactitud; ya que se informa que el porcentaje de portadores asintomáticos³⁴ en la población general va de 17 a 75%; a excepción de aquellos pacientes que presentan síntomas como ardor, sangrado,³⁵ pérdida del gusto, sensación algodonosa en la boca,³⁶ dolor y sensación de boca seca desde los comienzos de la enfermedad.

En lo que refiere a la edad, existen reportes principalmente desde recién nacidos en los que las causas son falta de regulación de pH y adquisición por gran inóculo al momento del parto; hasta personas de la tercera edad en los que el uso de prótesis

dentales, disminución de saliva o pérdida de la línea media por envejecimiento son los factores más comunes. Se considera que es más frecuente en personas que tienen entre 40 y 50 años,³⁵ con un ligero predominio en mujeres.³⁴

Se ha postulado que en la población con DM existe una mayor frecuencia en varones adultos en comparación con las mujeres, en pacientes que usan prótesis dentarias, así como aquellos con hábitos de fumar o que han padecido pequeños traumatismos.³³ Su mayor prevalencia es debida al aumento de glucosa en saliva³⁴ ya que es un sustrato adecuado para incrementar la capacidad de adhesión de la levadura a la superficie oral y así poder invadirla. La CO también se ve favorecida por el compromiso de su sistema inmunológico y por la posible presencia de hiposialia, que al disminuir la acción limpiadora salival favorece la adhesión de los hongos.

7.1.6 FACTORES DE PREDISPOSICIÓN

Los factores locales ambientales, la virulencia microbiana y ciertas características del hospedero actúan como determinantes de la susceptibilidad a la enfermedad. Además, los factores del hospedero no sólo condicionan la colonización, sino también la forma de infección candidósica que se establecerá.³²

Se ha reportado que en la población en general los factores que influyen en el estado de portador son los mostrados en la tabla 2:

Tabla 2. Factores generales y locales de predisposición a Candidosis Oral

Factores generales que predisponen a CO			
Fisiológicos *Edad (infancia, senectud) *Embarazo *Sexo Endócrinos *Diabetes Mellitus *Hipoparatiroidismo	Iatrogénicos *Anticonceptivos orales *Corticoterapia *Antibioticoterapia *Fármacos xerostomizantes	Nutricionales *Avitaminosis *Deficiencia de hierro *Malabsorción Neoplasias y enfermedades hematopoyéticas	Inmunológicos *VIH/SIDA *Inmunodeficiencias primarias *Transplantes Grupos sanguíneos y estado secretor
Factores locales que predisponen a CO			
a) Alteración de la barrera mucosa *cambios epiteliales exógenos: trauma, oclusión local, maceración	*cambios epiteliales endógenos: atrofia, hiperplasia, displasia	b) Alteración salival *Disminución flujo *pH bajo c) Microbiota comensal	d) Tabaquismo f) Otros *Mala higiene

Se conoce que los antígenos de los grupos sanguíneos ABO se encuentran presentes en las células epiteliales de mucosas y en secreciones corporales, por

mencionar: saliva y secreciones gástricas y; en ausencia de estos parece existir una mayor susceptibilidad a infecciones orales por *C. albicans*.³²

Personas con grupo sanguíneo O, han mostrado mayor colonización y posterior infección de CO debido a que poseen gran cantidad de antígeno H en sus superficies celulares que actúan como receptor de dicho patógeno.³⁷

Las deficiencias nutricionales (hierro, folato, vitaminas A, B1, B2, B12 y C) también intervienen como cofactores en la génesis de la CO. En contraste, el aumento en la ingesta de hidratos de carbono aporta grandes cantidades de nutrientes para el crecimiento de *Candida*.²

En el paciente con diabetes, es frecuente la presencia de infecciones bacterianas, virales y fúngicas; con una evolución más tórpida y de peor pronóstico.³⁸ La ocurrencia de CO en estos individuos se asocia a pequeños traumatismos,³³ al igual que la edad, el sexo, la nutrición, la higiene bucal¹⁵, tabaquismo (ya que se aumenta la queratinización epitelial, reduce la concentración de IgA en la saliva y deprime la función de los leucocitos polimorfonucleares),² la presencia de xerostomía (disminución de cantidad y pH de saliva) que también se encuentra relacionada con la diuresis o poliuria propia del padecimiento.³⁹

En la saliva se encuentran presentes los anticuerpos IgA y en ausencia de estos en diabetes mellitus, parece existir una mayor susceptibilidad a infecciones orales por *Candida*, lo cual implica la existencia de cambios cualitativos intrínsecos en los receptores celulares de superficie que regulan la adhesión de levaduras.³⁷

El factor predisponente mencionado por la mayoría de los autores es la asociación estadísticamente significativa entre altos niveles de glucosa en sangre, indicio de descontrol glucémico y el hallazgo de CO en este tipo de pacientes.^{40,41} Por su parte, Carda y col.⁴² en 2006 mencionan que los pacientes diabéticos con glucemias por encima de 7% de HbA1c además tenían una glucosa salival aumentada predisponiendo a CO.

Factores añadidos como el tabaco y la presencia de prótesis interaccionan con la DM2 y favorecen la colonización, tal como lo demostró Javed et al.⁴³ en su proyecto; ya que se registró una alta prevalencia de formación de biopelículas de *Candida* sp.

asociadas con el uso de dentaduras postizas en varones (74%) en comparación con las mujeres (23%).

A todo lo anterior habría que sumar la intervención de un mecanismo sistémico favorecedor; la supresión de la actividad de los neutrófilos y disminución de los eosinófilos en la DM.³⁹

7.1.7 ASPECTOS CLÍNICOS

La CO muestra una gran variedad de cuadros clínicos, algunos pacientes presentan un cuadro único, aunque la gran mayoría de ellos muestran más de uno, denominándose a esa variable candidosis oral multifocal.² A continuación, se presenta una explicación detallada de las variedades clínicas:

Candidosis pseudomembranosa (trush): Es la forma mejor reconocida y se caracteriza por la presencia de placas blancas adherentes que semejan queso cottage sobre la mucosa bucal, esas placas están compuestas por masas de pseudohifas, blastoconidios, células epiteliales descamadas, tejido necrosante, células inflamatorias⁴⁴ y fibrina⁵ que al raspado con espátula o gasa pueden removerse, la mucosa subyacente puede parecer normal, estar eritematosa o sangrar⁴⁵. Se distribuye sobre todo en paladar², mucosa yugal y dorso de la lengua; incluso puede extenderse hacia faringe y esófago.^{46,47}

Presenta forma aguda y crónica, siendo la primera la más frecuente en neonatos por falta de regulación de pH y un sistema inmune aun no desarrollado completamente^{2,5}. En adultos, puede ser iniciada por la exposición a antibióticos de amplio espectro; así como en pacientes con DM2 con un continuo descontrol glucémico, provocando la forma crónica de esta variedad clínica. Por lo general es asintomática.⁴⁶⁻⁴⁸ En especial los pacientes con DM presentan áreas erosivas extensas y, pueden quejarse de ardor, sensibilidad o disfagia.⁴⁹

Candidosis eritematosa: Clínicamente aparece como una placa de color rojo brillante sin bordes limitados⁴⁴ a menudo en el dorso medio posterior de la lengua, el paladar o la mucosa yugal.^{1,49} Las lesiones del dorso de la lengua se presentan como áreas depapiladas.^{47,50} Los factores predisponentes son el uso de

corticoesteroides inhalados, diabetes mellitus descontrolada, uso de dentaduras postizas⁵. Esta variedad puede manifestarse como:

1.- Candidosis atrófica aguda, secundaria a antibioticoterapia que presenta un edema oral generalizado, los pacientes se quejan de una sensación de quemadura, acompañada de pérdida difusa de las papilas filiformes del dorso de la lengua produciendo una apariencia atrófica.

Los pacientes que sufren de xerostomia por alguna razón, farmacológica en la gran mayoría de los casos, tienen una aumentada prevalencia de candidiasis eritematosa muy sintomática⁵⁰.

2.- Candidosis atrófica crónica o estomatitis por dentadura se caracteriza por varios grados de eritema y edema localizados en la mucosa cubierta por dentaduras removibles³⁵, a veces se acompaña por hemorragia petequiral⁵⁰.

Algunas lesiones ocurren en el paladar y mandíbula superior, pero también puede afectar el tejido mandibular⁴⁵. La mayoría de los pacientes no refieren síntomas, pero un pequeño grupo señala dolor o sensación de ardor en la boca⁴⁹. A menudo, esta condición se presenta con queilitis angular.

3.- Glositis romboidea media es crónica y asintomática, se presenta solo en aproximadamente 1% de la población¹, aparece como una zona eritematosa bien demarcada que afecta la línea media y parte posterior del dorso de la lengua, debido a la pérdida de papilas filiformes en esta área, la lesión es simétrica y su superficie puede ser lisa o lobulada⁵⁰. Tiende a estar asociado con fumar y el uso de esteroides inhalados³⁵.

Queilitis angular: no está exclusivamente atribuida a candidosis^{46,47}, sin embargo, cuando se presenta por esta causa las comisuras de los labios están constituidos por lo regular con placas eritemato-escamosas, erosionadas y fisuras, en pacientes que tienen la costumbre de pasarse la lengua por los labios^{1,49,50}. Sin embargo, también se ha reportado en individuos con infección por VIH, deficiencias de ácido

fólico, hierro, tiamina y vitamina B12. Es común verla cursar concomitantemente con otros tipos de candidosis.^{46,47}

Candidosis crónica hiperplásica: cuando el cuadro clínico se hace crónico es posible ver parasitación completa de la lengua como una placa blanca homogénea⁵ que no se desprende al raspado y levemente elevadas, de apariencia nodular o moteada^{47,49}, sobre todo en los bordes laterales de la lengua y de la mucosa yugal⁵⁰, dando el aspecto de una leucoplaca.

La **candidosis mucocutánea crónica** se ha observado como componente de un grupo muy poco frecuente de alteraciones inmunitarias y endocrinas, su severidad se relaciona con la severidad de la alteración⁵⁰. Las lesiones aparecen como placas grandes, gruesas (candidosis hiperplásica crónica) aunque otras formas de candidosis también son vistas.

En algunos pacientes con candidosis mucocutánea crónica se han visto mutaciones en el gen regulador autoinmune con la formación de autoanticuerpos dirigidos, la mayoría de las veces contra las glándulas endocrinas. Las alteraciones endocrinas incluyen hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, enfermedad de Addison y diabetes mellitus.⁵⁰

7.1.8 TRATAMIENTO

Tanto la OMS⁵¹ como la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA por sus siglas en inglés)⁵² recomiendan que el tratamiento de la candidosis orofaríngea en casos leves; por lo general presente en pacientes inmunocompetentes o con ligera inmunosupresión; sean antifúngicos tópicos por 7 a 14 días², aunado siempre a la corrección del proceso favorecedor. Dentro de los antimicóticos tópicos se incluyen tabletas (10 mg) de clotrimazol, geles y comprimidos mucoadhesivos bucales (50 mg) de miconazol, al igual que suspensiones orales (4-6 mL) de nistatina.³⁶

No obstante, en los estados de inmunosupresión más severos, se plantea el problema de la alta tasa de recurrencias o recidivas, requiriendo la combinación de una terapia intensiva sistémica²; en cuyo caso el tratamiento es fluconazol (100-200

mg por día) por 14 días, u otro tipo de medicamento antimicótico administrado por vía oral son suspensiones de itraconazol o posaconazol por 28 días, voriconazol o Anfotericina B desoxicolato; también la administración vía intravenosa de equinocandinas como caspofungina, micafungina y anidulafungina para aquellos pacientes que no mejoran después de terapia con fluconazol.³⁶

Como profilaxis, existen reportes acerca de la utilidad de colutorios de clorhexidina al 4%.³⁶

Recientemente, Darteville y col.⁵³ demostraron que el péptido natural D-catelicina (D-Ctl) derivado de la Cromogranina A, tiene actividad antimicrobiana, resultando ser un potente antifúngico en células levaduriformes de *C. albicans*; que además puede ser fabricado sintéticamente a bajos costos. También encontraron que este péptido no es degradado por las proteasas secretadas por el patógeno y es estable en saliva, otorgándole expectativas favorecedoras para su uso oral. Aunque faltarían investigaciones basadas en geles o suspensiones (aplicación tópica) para el tratamiento de la CO; así como evaluar su toxicidad en las células epiteliales de la mucosa oral; la D-Ctl promete un futuro exitoso en el tratamiento de la CO.

La disponibilidad creciente de todos estos agentes antifúngicos causa a menudo un aumento en su aplicación clínica con el fin de prevenir el desarrollo de infecciones por *Candida*, incluso si los signos de la enfermedad no están presentes. Con frecuencia, dicha terapia suele recaer en pacientes con un control metabólico deficiente (con DM descontrolada) que, además cuentan con otros factores predisponentes como edad avanzada y uso de prótesis dentales⁵⁴; desencadenando que el uso indiscriminado de estos antimicóticos en México resulte en una mayor resistencia antifúngica y, que en el caso de candidosis mixtas representa un problema mayor en cuanto a la elección del tratamiento y la eficacia de este.⁵⁵

7.2 Diabetes Mellitus (DM)

7.2.1 DEFINICIÓN

La Diabetes Mellitus es el desorden endocrino-metabólico más común (el término *diabetes* proviene de la palabra griega que significa “sifón” y adule a la micción

frecuente relacionada con esta enfermedad, mientras que *mellitus* deriva del latín que significa “melosa” o “dulce”; así el término en general, se refiere al hecho de que la glucosa “se derrama” hacia la orina cuando las concentraciones de glucosa en sangre están demasiado elevadas)⁵⁶ que se define como una afección crónica producida cuando hay niveles elevados de glucosa en sangre debido a que el organismo deja de producir o no produce suficiente cantidad de la hormona denominada insulina, o no logra utilizarla de manera eficaz. De tal manera que la enfermedad tiene orígenes por secreción insuficiente a nula (Diabetes tipo 1) o deficiencia de insulina relativa (Diabetes tipo 2); siendo estos dos tipos los más frecuentes de la enfermedad.⁵⁷

La insulina es una hormona esencial, que se produce en el páncreas, transporta la glucosa desde la corriente sanguínea hacia las células del organismo, ahí, se lleva a cabo la conversión de glucosa a energía. La falta de insulina o la incapacidad de las células de responder ante la misma provoca un alto nivel de glucosa en sangre, también llamada hiperglucemia, que es la principal característica en DM.⁵⁵

De no controlarse la hiperglucemia, puede dar origen a complicaciones crónicas sanitarias discapacitantes y peligrosas en vasos sanguíneos de tamaño pequeño (microangiopatía) y gran grosor (macroangiopatía), dentro de las primeras encontramos: retinopatía, nefropatía y neuropatía, de alta morbi-mortalidad; por su parte las macroangiopatías constituyen daño de las arterias coronarias, cerebrales y de las extremidades inferiores, que mayoritariamente son la causa de muerte de los pacientes³⁸. En el caso de las alteraciones más frecuentes a nivel oral, se incluyen la enfermedad periodontal, caries, candidosis y queilitis comisural.

7.2.2 TIPOS DE DM

Hoy en día la mayoría de las organizaciones a nivel mundial aceptan la clasificación de la DM dentro de las siguientes categorías generales por frecuencia: **Diabetes tipo 1, tipo 2 y gestacional**, existen otros tipos específicos como son la **diabetes monogénica** que es el resultado de una única mutación genética en el gen autosómico dominante y no la suma de varios factores como la tipo 1 y 2, incluye la diabetes neonatal y la diabetes en inicio de la madurez (MODY por sus siglas en

inglés); por último, la **diabetes secundaria** que surge a raíz de las complicaciones de otras enfermedades, como trastornos hormonales: enfermedad de Cushing y acromegalia, enfermedades del páncreas o como resultado del uso de ciertos medicamentos (corticosteroides, etc). Se desarrollarán a continuación sólo las más frecuentes:

DIABETES TIPO 1

Antes llamada “insulino-dependiente” o “diabetes juvenil”, está presente entre el 5 y 10% de todos los pacientes con diabetes. Se debe a la destrucción progresiva (influenciada tanto por factores genéticos como ambientales) de las células β pancreáticas, las cuales son las encargadas de la producción de insulina. Los marcadores autoinmunes incluyen autoanticuerpos de células de los islotes y autoanticuerpos contra GAD (GAD65), insulina, las tirosinas fosfatasa IA-2 y IA-2b, y ZnT8. Por lo que este tipo de diabetes se va a definir por la presencia de uno o más de estos marcadores autoinmunes, además del ya mencionado criterio principal (alto nivel de glucemia).

La tasa de destrucción de células β es bastante variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente bebés y niños) y lento en otros (principalmente adultos); en los niños y adolescentes puede presentarse con cetoacidosis diabética, como la primera manifestación de la enfermedad; con lo cual se demuestra que, aunque la DM1 se presenta con mayor frecuencia en niños-adolescentes, no es exclusiva de estas edades tal como se creía hace unos años.

DIABETES TIPO 2

Es la forma más frecuente de diabetes, anteriormente era conocida como diabetes “no insulino-dependiente” y representa aproximadamente el 90% de los casos. En esta variedad, la hiperglucemia es el producto de una inadecuada secreción de insulina y de la incapacidad del organismo de responder plenamente a esta hormona; y no ocurre la destrucción autoinmune de células β pancreáticas; lo que se conoce como resistencia a la insulina. Dicha resistencia ha sido relacionada ampliamente no sólo con factores genéticos y ambientales, sino también con las

que se consideran otras de las etiologías de la DM2, el sobrepeso y la obesidad, detectándose en ambas un estado inflamatorio crónico.

En la obesidad, la acumulación excesiva de triglicéridos conduce a una hipertrofia de los adipocitos y a una desregulación en la secreción de adipocinas, por mencionar algunas: adiponectina, leptina, interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), etc. Esto conduce a una infiltración de numerosas células del sistema inmune al tejido adiposo, así como un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias.

La presencia de cetoacidosis diabética rara vez ocurre espontáneamente en la DM2, cuando se observa, es en minorías étnicas o bien en asociación con el estrés de otra enfermedad como infección o con el uso de ciertos medicamentos (por ejemplo, corticosteroides, antipsicóticos atípicos, e inhibidores del SGLT-2).

El desarrollo de la hiperglucemia es gradual, por lo que resulta difícil determinar el momento exacto de su aparición, y el diagnóstico con frecuencia se realiza después de varios años, pues el paciente no nota los síntomas clásicos de la DM. Sin embargo, estos pacientes están en mayor riesgo de desarrollar complicaciones macro y microvasculares.

Entre los síntomas característicos de la DM2 encontramos: sed anormal y sensación de boca seca, micción frecuente y abundante, falta de energía (fatiga), hormigueo o entumecimientos de manos y pies, infecciones fúngicas en la piel y mucosa frecuentes, lentitud en la curación de heridas y visión borrosa.

La DM2 se observa con mayor frecuencia en adultos mayores, aunque el desarrollo de factores de riesgo, la mayoría modificables como obesidad, falta de actividad física y deficiencias de la dieta hacen que este tipo de diabetes vaya en aumento en niños, adolescentes y jóvenes adultos. Otros factores de riesgo modificables son: alteración de la tolerancia a la glucosa y tabaquismo.

Además de la hiperglucemia hay una alteración en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, como resultado del defecto de la secreción de insulina, acción

de insulina o ambas. Y, por ende, su control es indispensable para que las personas con DM2 puedan tener una vida larga y saludable.

DIABETES MELLITUS GESTACIONAL (DMG).

Hoy en día, se define a la DMG como aquella que se diagnostica por primera vez en el segundo o tercer trimestre del embarazo, y que, no es claramente una diabetes tipo 1 o tipo 2 preexistente. A su vez, aquellas mujeres diagnosticadas según los criterios de diagnóstico estándar en el primer trimestre con diabetes, a diferencia de antes, deben clasificarse con diabetes pregestacional preexistente, en el que la gran mayoría de las ocasiones se trata de diabetes tipo 2 o, muy rara vez, diabetes tipo 1 o diabetes monogénica.

Ya que los síntomas de la hiperglucemia y los propios del embarazo resultan indistinguibles, se recomienda realizar una prueba oral de tolerancia a la glucosa a fin de detectar una posible DMG entre las semanas 24 y 28.

La DMG suele presentarse como un trastorno transitorio durante el embarazo y suele desaparecer al finalizar el mismo, esto no excluye que se le confiera a la mujer un mayor riesgo de desarrollar DM2 de 3 a 5 años después del parto.

En la tabla 3 se exponen los tipos de diabetes existentes de clasificación aceptada, así como su etiología relacionada.

Una vez que se produce la hiperglucemia, los pacientes con todas las formas de diabetes están en riesgo de desarrollar las mismas complicaciones crónicas, aunque las tasas de progresión pueden diferir de acuerdo con el buen control que se maneje.

Tabla 3. Tipos de diabetes con sus respectivas etiologías

Principales tipos de Diabetes		
<u>Diabetes tipo 1</u>		Reacción autoinmune de destrucción de células pancreáticas, de origen en factores genéticos frecuentemente, así como ambientales, que provoca poca o nula producción de insulina.
<u>Diabetes tipo 2</u>		Producción inadecuada de insulina y resistencia a la misma (incapacidad del organismo de responder plenamente a dicha hormona), mediada por factores ambientales y algunos genéticos.
<u>Diabetes Mellitus Gestacional (GDM)</u>		Disminución en la acción de la insulina debido a la producción de hormonas en la placenta.
Tipos de Diabetes (específicos) menos frecuentes		
<u>Diabetes monogénica</u>	Diabetes Neonatal	Se diagnostica antes de los 6 meses de edad, puede ser transitoria o permanente. La primera es más a menudo debido a la sobreexpresión de genes en el cromosoma 6q24, puede ser tratable con otros medicamentos que no sean insulina; la segunda, es más comúnmente debida a mutaciones autosómicas dominantes en los genes que codifican la subunidad Kir6.2 (KCNJ11) y subunidad SUR1 (ABCC8) del canal KATP de células β.
	Diabetes de inicio en la madurez (MODY)	Se caracteriza por un deterioro de la secreción de insulina con defectos mínimos o nulos en la acción de la insulina (en ausencia de obesidad coexistente). Se hereda en un patrón autosómico dominante con anomalías en al menos 13 genes en diferentes cromosomas identificados hasta hoy.
<u>Diabetes secundaria</u>	Enfermedades (pulmones, páncreas)	Padecimiento de fibrosis quística, ya que la diabetes se asocia con un mal estado nutricional y la insuficiencia de insulina es el defecto primario en enfermedad.
		Padecimiento de pancreatitis
	Diabetes inducida por sustancias químicas	Debida al uso de corticoides
		Por tratamiento del VIH/SIDA
		Después de tratamiento por trasplante de órganos

7.2.3 ESTADO INMUNE DEL PACIENTE CON DM2

Al ser una enfermedad sistémica, la DM2 también cuenta con repercusiones a nivel del sistema hematopoyético. Se tiene información de una disminución de niveles de hemoglobina (Hb) en este tipo de pacientes, que de acuerdo con la OMS⁵¹ se define como anemia, siempre y cuando los niveles por debajo de 13 g/dL de Hb estén presentes en el caso de hombres y menor a 12 g/dL en mujeres⁵¹.

En cuanto a las alteraciones del eritrocito en sí, se describe que hay una reducción de vida media, aumento de la agregación eritrocitaria; que a nivel de la retina y conjuntiva favorece el enlentecimiento del flujo y aumento de la presión sanguínea intraocular; anomalía en el sistema de transporte del oxígeno y aumento de capacidad oxidativa.

Por su parte, la serie blanca de los pacientes con DM2 presenta dos puntos de estudio³⁸: 1) la relación entre el recuento leucocitario elevado que se considera un marcador de inflamación crónica endotelial que desencadena la serie de complicaciones macro y microvasculares; y 2) la relación con anomalías funcionales del sistema inmune.

La hiperglucemia crónica provoca:

- En los PMN una serie de alteraciones caracterizadas por disminución de la adherencia y quimiotaxis al endotelio vascular, de la fagocitosis, de la actividad bactericida intracelular, de la opsonización y de la inmunidad mediada por células aumentando la predisposición a infecciones.³³
- Disminución del número total de células dendríticas, que afecta a las plasmocitoides y mieloides.^{58, 59}
- Sobre los neutrófilos una mayor capacidad de inducción del estallido respiratorio y producción de especies reactivas de oxígeno además de su función efectora (no sólo en estado de hiperglucemia), que podría ser causa de la alta prevalencia de infecciones en pacientes con diabetes.⁶⁰
- Disminución en eosinófilos.
- Que a nivel linfocitario exista una menor respuesta de las células T, lo que se traduce en una síntesis reducida tanto de CD4 como de CD8.⁶¹
- Disminución de las células NK en sangre periférica.⁶⁰

La proporción de neutrófilos/linfocitos ha demostrado ser importante en la predicción de factores adversos con diferentes grados de intolerancia a la glucosa e insulino-resistencia, que puede ser utilizado como un marcador pronóstico coadyuvante de las complicaciones micro y macrovasculares en pacientes con intolerancia a la glucosa.³⁸

7.2.4 CONTROL METABÓLICO

La DM2 representa un serio problema de salud pública⁶², debido a que la enfermedad es compleja, requiere de un enfoque intensivo, personalizado y un manejo multidisciplinario, que no sólo atienda el padecimiento, sino realmente

influya en la buena calidad de vida de los pacientes, permitiendo disminuir la frecuencia de factores de riesgo.

En nuestro país, a través de tratamientos intensivos muy dirigidos, se ha demostrado que se puede cumplir con la meta de un buen control metabólico (que incluye las variables de presión arterial, IMC, niveles de glucosa sérica, HbA1c y perfil lipídico) que disminuye las complicaciones de la enfermedad.⁶³

A continuación, se definirán brevemente las variables metabólicas:

Glucosa en sangre, tiene valores de referencia entre 74 a 99 mg/dL que se pueden considerar normales, mientras que valores entre 100 y 125 mg/dL son indicios de intolerancia a la glucosa o prediabetes, y resultados iguales o mayores a 126 mg/dL indican Diabetes.

La hemoglobina glucosilada fracción A1c (HbA1c), representa la unión covalente específica entre el amino terminal de la hemoglobina y la glucosa. Se genera por una reacción no enzimática e irreversible, que depende de los niveles de glucosa plasmática y del tiempo que dure la hiperglicemia. Los valores de referencia aceptados como un buen índice de control metabólico son niveles $<7\%$ ⁵⁷. Se recomienda que su medición sea cada tres meses, debido a la sobrevida normal del glóbulo rojo; pero a la luz de conocimientos actuales que en pacientes con DM2 la sobrevida disminuye, se aconseja efectuar la determinación de HbA1c cada dos meses.³⁸

La creatinina es una molécula que se deriva de la creatina, su producción es constante y está relacionada a la masa muscular del individuo. Por lo que existen tablas de valores de referencia de acuerdo con edad, género, etc.; se considera aceptable un valor máximo en adultos del 1.5%. Los riñones son los encargados de filtrar este compuesto orgánico, para luego expulsarla por la orina, por lo que su medición es importante para evaluar la función excretora renal, y en el caso de pacientes con DM2 es necesaria para el diagnóstico de insuficiencia renal crónica.⁶³

El colesterol se desplaza a través de la sangre unido a una proteína. Este conjunto de colesterol y proteína se denomina lipoproteína. El análisis de lipoproteínas (perfil

lipídico) mide en la sangre los niveles de: a) colesterol total (niveles mayores a 200 mg/dL puede causar formación de placas dentro de arterias lo que aumenta las probabilidades de infarto), b) colesterol de baja densidad o “malo” (LDL, por sus siglas en inglés; transporta colesterol a los tejidos que sólo en valores menores a 100 mg/dL resulta beneficioso), c) colesterol de alta densidad o “bueno”(HDL por su acrónimo en inglés; lleva colesterol de tejidos al hígado para ser desechado siempre y cuando sus niveles sean mayores a 40 mg/dL en hombres y >50 en mujeres) y d) triglicéridos (que al haber valores mayores a 150 mg/dL en sangre, se considera un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiacas).⁶³

7.2.5 COMPLICACIONES ORALES EN DM2

Si bien no existen manifestaciones orales específicas, diversas de ellas se han asociado contundentemente a DM2, ya que pueden ser el o los primer(os) signo(s) o síntoma(s) de una hiperglucemia no diagnosticada o diabetes no controlada ³³, de ahí que se tome conciencia acerca de las complicaciones a largo plazo.

Estas complicaciones incluyen en su mayoría enfermedades periodontales como periodontitis y gingivitis, xerostomía; disfunción salival que conduce a una reducción del flujo y cambios en la composición (disminución de los productos salivales antifúngicos como la lisozima y lactoperoxidasa); así como la disfunción del gusto. Dentro de las infecciones se han notificado fúngicas y bacterianas. Hay informes de lesiones en la mucosa oral en forma de lengua fisurada, úlcera traumática, liquen plano, reacción liquenoide y queilitis angular.⁶⁴ Es de suma importancia mencionar que varias de estas patologías forman parte de un diagnóstico diferencial con CO, lo que precisa la necesidad de realizarlo de manera correcta.

Por otro lado, hay algunas otras patologías que contribuyen al desarrollo de la CO, a modo de ejemplo se puede mencionar la disfunción salival, las grietas que almacenan saliva rica en carbohidratos de la lengua fisurada, la pérdida de dientes que conlleva al uso de prótesis favorecedoras del crecimiento de *Candida*. Por ello se torna de importancia el cuidado y buen diagnóstico de cualquier dato clínico o síntoma que se presente.

7.2.6 TRATAMIENTOS CONTROL DE DM2

Desde el primer día que se diagnostica a un paciente con DM2 se debe iniciar tratamiento, en busca de proporcionarle un adecuado estilo de vida, con control especial sobre diferentes áreas, tales como: niveles de glucosa, perfiles lipídicos, presión arterial, alimentación, función renal, higiene bucal, exámenes de pies y ojos, tabaquismo; que disminuyen la probabilidad de complicaciones indeseables.

Como ya se mencionó, la mayoría de la población con DM2 tiene sobrepeso u obesidad, lo que obliga como medida inicial a la pérdida de peso con el cumplimiento de una dieta hipocalórica y actividad física, que logran en su gran mayoría la estabilidad metabólica requerida⁵⁷. Sin embargo, el tratamiento farmacológico se precisa necesario con la evolución del padecimiento.

La OMS⁵¹ publicó el Paquete de Intervenciones Esenciales de Enfermedades No Transmisibles, la cual sugiere que el tratamiento hipoglucemiante favorito de primera elección es la metformina, una biguanida que además de mejorar la captación de glucosa periférica y su utilización, se ha demostrado que tiene actividad supresora de glucagón post-pandrial excesivo. La administración de sulfonilureas como glibenclamida o recientemente más utilizada la glicazida, se sugiere de segunda elección, para pacientes que no logren el control glucémico con metformina sola o tengan contraindicaciones a ella.

Es importante de tomar en cuenta que, si el uso de estos medicamentos tiene efectos sobre el peso del paciente, provocando que haya una respuesta de <5% de pérdida de peso en 3 meses, se debe suspender dicho tratamiento.

El tratamiento con insulina humana se debe introducir en aquellos pacientes (DM2) en que no les funciona ninguno de los dos tratamientos anteriores; la recomendación por parte de la OMS⁵¹ es tanto uso de insulina de acción corta (insulina humana regular RHI) como de insulina de acción intermedia (insulina NPH); la falta o evidencia de muy baja calidad de cualquiera de los resultados en los análogos de insulina los hace no recomendables.

Por último, si el tratamiento con insulina no es adecuado, es decir, en personas que viven solas o dependen de alguien para la inyección de la misma, se sugiere el uso de nuevos anti hiperglucemiantes orales como: inhibidores de la DPP-4 (saxagliptina,alogliptina, linagliptina, etc.), inhibidores de SGLT-2 (dapagliflozina, ertugliflozina, etc) o TZD (rosiglitazona, etc) aunque cabe recalcar que su costo elevado los posiciona en la última elección o sólo una opción alternativa para el aumento del tratamiento.⁵¹

7.2.7 EXPECTATIVAS DE LA DM2 EN NUESTRO PAIS

La Federación Internacional de Diabetes (FID), en su más reciente edición de Atlas (2017)⁵⁵, ha seleccionado estudios de entre muchos, que sí cumplen rigurosos criterios a lo largo de todo el mundo, incluido nuestro país; y ha calculado la prevalencia específica de diabetes según edad y género, la mortalidad relacionada a la enfermedad, el gasto sanitario, así como la prevalencia de diabetes no diagnosticada, entre otras.

La diabetes es una de las mayores emergencias sanitarias mundiales del siglo XXI. Se encuentra entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y, junto con las otras 3 enfermedades no transmisibles (ENT) como enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades respiratorias; representa más del 80% de todas las muertes prematuras por ENT.

Uno de los principales potenciadores del problema es que entre un 30 y 80% de las personas con diabetes no están diagnosticadas. Por lo que se deben redoblar esfuerzos para producir cambios en el estilo de vida de la población, fomentar la detección, el diagnóstico y el tratamiento que evite complicaciones.

En 2017 México ocupó el quinto lugar a nivel mundial con personas con DM2 (12 millones), y se estima que para 2045 ocupemos el cuarto lugar con aproximadamente 21.8 millones entre 20 y 79 años; si bien estas cifras son preocupantes, lo es aún más, el hecho que se calcula que en 2017 4.5 millones de personas estaban sin diagnosticar ⁵⁵.

Aproximadamente la mitad de las muertes atribuibles a la hiperglucemia tienen lugar antes de los 60 años y, en la región de América del Norte y el Caribe, dicha muerte es más atribuible en varones que en mujeres. Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030⁵¹.

No todos los países tienen estimaciones nacionales de la prevalencia de diabetes, por tanto, la IDF alienta a la realización de más investigaciones sobre su epidemiología.

7.3 Métodos de identificación

En las últimas dos décadas la colonización de *Candida* en las mucosas orales o en otras partes del organismo se ha determinado como un factor importante para desarrollar infecciones profundas, sistémicas o diseminadas cuando las condiciones favorecen dicha diseminación. Debido a lo anterior, se precisa un diagnóstico y tratamiento adecuado, al igual que el desarrollo de nuevos enfoques alternativos para la detección e identificación de las especies causantes, sobre todo de las menos comunes que como se ha descrito antes, son las que presentan resistencia a los principales antifúngicos.

En la actualidad, se utilizan muchos métodos para la identificación de los aislados clínicos, desde utilización de medios diferenciales, pruebas fisio-morfológicas, pruebas bioquímicas (asimilación o fermentación de carbohidratos) hasta métodos más complejos como los basados en biología molecular, que tienen una gran sensibilidad y especificidad como PCR⁶⁵, los inmunológicos y espectrometría de masas mediante MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*).

7.3.1 MEDIOS DE CULTIVO

La gran mayoría de las especies de *Candida* se pueden aislar en los medios de cultivo habituales, como son: Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) que es el más ampliamente utilizado para el aislamiento primario, SDA más antibióticos, Extracto de levadura Agar, Gelosa Sangre, Papa Dextrosa Agar, Peptona de Malta Agar y Agar Biggy/Nickerson (también considerado selectivo)¹ que contiene gran cantidad

de citratos que eliminan la microbiota bacteriana, así como sulfitos que son reducidos a sulfuros, lo cual confiere a las colonias un color café claro u oscuro; puede que haya pequeñas diferencias entre la morfología colonial de las especies, pero la gran mayoría de las veces es similar.

Dicho crecimiento se lleva a cabo en un tiempo promedio de 48 a 72 horas a temperatura entre 25 a 28°C, produciendo colonias limitadas, planas, cremosas, opacas, por lo general lisas o bien, rugosas, de color blanco o blanco-amarillento. En algunas especies es posible ver formaciones de pseudomicelio y micelio que se entremete en el agar.

7.3.1.1 CROMOGÉNICOS

La dificultad de detectar cultivos mixtos en el medio tradicional de Sabouraud propició que a mediados de la década de los noventa se introdujera un medio diferencial (que de igual manera se usa de primo aislamiento), el cual ayuda a la identificación de diferentes especies según sea el color de las colonias desarrolladas en el mismo, así se puede observar a *Candida albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul metálico), *C. krusei* (rosa, rizada) y *C. kefyr*, *C. glabrata* (de malva a marrón); su nombre, CHROMagar Candida®.

Dicho medio contiene agar, peptona, cloranfenicol y una mezcla cromogénica que consta de la inclusión de sustratos cromogénicos que, ante la presencia de actividad enzimática específica de las levaduras, producen un color determinado. Los sustratos son 5-bromo-4-cloro-3-indol N-acetil βD-glucosaminidasa⁶⁶ que detecta la actividad de la enzima hexosaminidasa que está presente en *C. tropicalis*, *C. albicans* y *C. dubliniensis*, y 5-bromo-6-cloro-3-indol fosfatasa p-toluidina⁶⁷ que detecta la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, que presenta *C. krusei*; otras especies también pueden presentar discreta actividad de esta última enzima y la variación en la tonalidad depende del sustrato cromógeno y la pigmentación natural de la levadura. Algunos reportes sugieren que este medio discrimina a *C. dubliniensis* de *C. albicans* (colonia verde claro de verde oscuro)⁶⁵, sin embargo, esto es controversial dado que son factores que varían con cada observador.

Se ha determinado que la sensibilidad para CHROMagar Candida® excede un 97% y la especificidad es mayor al 92%.⁶⁷ De igual manera Odds et. al.⁶⁸ determinan que es una potente herramienta que muestra una especificidad y sensibilidad superior al 99% en las cuatro principales especies de *Candida* al mismo tiempo.

Algunos autores consideran también como medios cromogénicos al medio antes mencionado de primo-aislamiento, Biggy/Nickerson y; al medio Pagano-Levine que está formulado para ayudar en la diferenciación de *Candida albicans* de otras especies del género en base al desarrollo de color en el crecimiento de levaduras en un medio que contiene cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio. Sin embargo, hoy en día, CHROMagar Candida® sigue siendo el medio de preferencia para la determinación de especies mixtas.

7.3.2 AGAR CORN- MEAL + TWEEN 80

La identificación de las principales especies del género *Candida* también se lleva a cabo mediante pruebas morfológicas, gracias a la producción de patrones específicos de micelio (seudohifas, hifas, blastoconidios) para cada especie y, si es el caso, clamidoconidios los cuales son estructuras refractarias resistentes.

Dicha relación de estructuras fúngicas se puede observar al microscopio después de inocular aislados de un cultivo primario en medios nutricionalmente deficientes y tensos incubados a 28°C, como pueden ser: Agar con extracto de arroz, Agar de caseína⁶, Agar leche diluida, Agar de semilla de girasol, Agar de tabaco, Agar tomate, Agar papa-zanahoria y Agar Staib, aunque el más utilizado es Agar Harina de Maíz. La adición de un tenso-activo como tween 80 mejora la formación de clamidoconidios y favorece el desarrollo de seudohifas y blastoconidios.

Todas las especies de *Candida* presentan seudohifas largas, ramificadas, con cúmulos de blastoconidios, a excepción de *C. glabrata*, pero en patrones específicos. En el caso de *C. albicans* y *C. dubliniensis* producen clamidoconidios, la primera al final de las seudohifas y la segunda en racimos.¹ Sin embargo, el patrón puede variar, por lo que se requieren de pruebas adicionales para diferenciar estas dos especies.

7.3.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

De las pruebas fisiológicas y bioquímicas se han derivado los ensayos de asimilación (auxonograma-degradación aerobia) y fermentación (zimograma-degradación anaerobia)⁶⁹ de carbohidratos que permiten; debido a la existencia de un perfil bioquímico específico; la identificación de cada una de las especies de *Candida*.

Las características morfológicas de las especies más importantes de *Candida* se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Características morfológicas de las principales especies de *Candida* en medio Agar Harina de Maíz+ Tween 80 al 1%. Tomado y modificado de Deorukhkar et. al.⁶

<i>Candida spp.</i>	Característica morfológica en Agar Harina de Maíz más Tween 80
<i>C. albicans</i>	Seudohifas alargadas con cúmulos de blastoconidios en los septos. Los clamidoconidios están presentes al final de las hifas o cerca de sus ramas laterales cortas.
<i>C. tropicalis</i>	Abundantes pseudohifas ramificadas y delgadas. Los blastoconidios se observan solos o en pequeños grupos a lo largo del micelio y muestran el "arreglo del bosque de pino" característico. Se producen clamidoconidios en una que otra cepa.
<i>C. parapsilosis</i>	El rasgo característico es la producción de colonias, en forma de "araña enorme", satélites a la estría. Las pseudohifas son largas, gruesas y ramificadas.
<i>C. glabrata</i>	La presencia de blastoconidios pequeños muy compactos con ausencia de pseudohifas o hifas, es la principal característica.
<i>C. krusei</i>	Seudohifas rectas, delgadas y largas, que muestran una ramificación parecida a un árbol, las cadenas de blastoconidios surgen desde el punto entre las células que se asemejan a "fósforos cruzados".
<i>C. guilliermondii</i>	Abundantes o escasas pseudohifas muy finas y cortas. Los blastoconidios son pequeños y en cúmulos pequeños.
<i>C. kefyr</i>	Abundante producción de pseudohifas. Las células son alargadas y se deshacen quedando paralelas, como "registros en una secuencia".
<i>C. dubliniensis</i>	Producción de clamidoconidios que se disponen en racimos habitualmente en los ápices de las pseudohifas; así como de blastoconidios en forma de densos racimos.

7.3.3.1 ZIMOGRAMAS Y AUXONOGRAMAS

Los patrones de asimilación y fermentación de muchos géneros y especies se encuentran en la literatura, sin embargo, en comparación con las pruebas de asimilación, las de fermentación son más difíciles de realizar y se consideran menos sensibles, por lo tanto, no se realizan de forma rutinaria.⁶⁹

Auxonograma: La asimilación se define como el proceso del metabolismo de la glucosa en condiciones aeróbicas.⁶⁸ Se basa en el uso de agar con base nitrogenada, en el que se siembra la cepa a identificar, sin carbohidratos (éstos se adicionan en forma de sensi-discos) y después de un período de incubación de 5 a 15 días a 25°C se puede leer la prueba.¹ Una prueba positiva se indica por la presencia de crecimiento de la levadura alrededor de los sensi-discos.

Zimograma: Se realiza en medios líquidos y se basa en la demostración de la producción de ácido y/o CO₂. La fermentación positiva está indicada por la turbidez y la acumulación de gas.⁶⁸ Estas pruebas complementan los resultados de la prueba de asimilación.

La mayoría de las pruebas comerciales no utilizan ensayos de fermentación, pero se basan en pruebas de asimilación, los más utilizados son: API-yeast®, Auxacolor® (20 carbohidratos), Microscan®, Vytec®.

La prueba comercial Auxacolor 2®⁷⁰ es un sistema de identificación basado en el principio de asimilación de 13 azúcares que se deshidratan en presencia de un medio básico y de un indicador de pH: el púrpura de bromocresol. El crecimiento de la cepa y, por lo tanto, asimilación de cada carbohidrato, se traduce por el viraje del indicador de pH, del azul al amarillo y por la aparición de turbidez en el pocillo a las 48 horas de inoculación de la microplaca incubada a 30°C (±2°C). El equipo de reactivos también incluye 3 pruebas enzimáticas: detección de la actividad N-acetilgalactosaminidasa (hexosaminidasa: HEX), fenoloxidasa (POX) que permite identificar a *Cryptococcus neoformans* y detección de actividad prolina-arilamidasa (PRO).

7.4 Resistencia a antifúngicos

En nuestro país durante los últimos años, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos; en algunos casos se ha demostrado que es debido a deficiencias inmunitarias. En otros, el comportamiento clínico hace sospechar de resistencia a los antifúngicos, principalmente en aquellos pacientes que han recibido profilaxis (en casos de trasplantes, SIDA, enfermedades autoinmunes tratadas con

corticosteroides) o concentraciones mínimas inhibitorias elevadas (en tratamientos repetidos por micosis recidivantes).

Se define como resistencia al cambio de sensibilidad o susceptibilidad al antimicótico que puede medirse *in vitro*.⁷¹ Cabe señalar que existen varios mecanismos que pueden conducir a la resistencia adquirida de las especies de *Candida* a los principales fármacos (azoles), siendo la más común la alteración en el sistema de bombeo activo mediado por ATP, el cual se localiza en la membrana citoplasmática y actúa expulsando el fármaco hacia el exterior de la célula ⁷²; y por mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngico, como la alteración de las enzimas relacionadas en la síntesis del ergosterol.⁷³

7.4.1 CLASIFICACIÓN DE RESISTENCIA

La resistencia se puede dividir en dos principalmente: **1) intrínseca**; aquella que presenta la levadura aun sin haber estado en contacto con el antimicótico; es decir, con la que ya “nace” la levadura y **2) adquirida**, la que desarrolla la cepa al estar en contacto con el antifúngico.⁷¹

Algunos artículos desarrollan el tema de la llamada **resistencia heterogénea**, que se presenta en una sola cepa, la cual puede tener colonias sensibles y colonias resistente a un mismo antimicótico. Se ha observado que colonias sensibles tienen la capacidad de desarrollar este tipo de resistencia, ya que después de sembrarlas y de haber crecimiento, se realizaron pruebas de susceptibilidad a las colonias obtenidas y, sorprendentemente ya había presencia de los dos tipos de colonias.⁷¹

Estos tipos de investigaciones se tornan de interés, ya que ayudan al entendimiento del desarrollo repentino de resistencia que se presenta a los principales azoles, conllevando así a fallas terapéuticas.

Por consiguiente, también se habla del término **resistencia homogénea** cuando todas las colonias de la cepa son totalmente resistentes o sensibles a un antifúngico.⁷²

Vanden y col.⁷⁴ menciona un tipo de resistencia a más de un antifúngico que se ve implicada por factores genéticos, llamada **resistencia cruzada positiva**, cabe

señalar que este fenómeno hace que no se pueda tratar a la cepa con ningún azol ya que cada uno de estos tiene una CIM diferente. A su vez, la **resistencia cruzada negativa** se presenta cuando un factor genético específico del hongo regula la resistencia a un antimicótico y al mismo tiempo incrementa la sensibilidad a otro.⁷¹

7.4.2 AGENTES ANTIFÚNGICOS

Se considera que los antimicóticos pueden ser fungistáticos si solo detienen el crecimiento de los hongos o fungicidas si matan 99.9% de los hongos.⁷⁵

Los principales antifúngicos, entre los que se encuentran los de elección para candidosis, pueden clasificarse en cuatro grupos de acuerdo con el mecanismo de acción. En la tabla 5 se muestran en el orden en que hicieron su aparición en el mercado y, las principales especies de *Candida* que más han mostrado resistencia a ellos.

7.4.3 DETERMINACION DE CIMs Y PRUEBAS COMERCIALES

La resistencia antifúngica continúa creciendo y evolucionando, complicando el manejo del paciente a pesar de la introducción de nuevos agentes antifúngicos.

En los últimos años se han desarrollado técnicas para el estudio de las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, que se usan a menudo para enfrentar los desafíos de seleccionar agentes con actividad probable para una infección dada, pero quizás su uso más importante es en la identificación de agentes que no funcionarán, es decir, para detectar resistencia.

Los métodos estandarizados para realizar pruebas de susceptibilidad antimicóticas *in vitro* confiables son aprobados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos y por el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST) en Europa.⁸¹

Los datos recopilados por estas pruebas son la base para calcular los puntos de corte clínicos específicos de especies (PCCE) y cuando estos no se pueden determinar, se detectan distribuciones de concentración inhibitoria mínima (CIM)⁸⁴ de tipo salvaje y los valores de corte epidemiológicos (VCE).⁷⁵ Los VCE al

diferenciar fenotipo salvaje y no-salvaje, son el medio más sensible para detectar cepas con mecanismos de resistencia adquiridos o emergentes.²⁰

Mecanismo de acción	Tipo de antimicóticos	Nombre de antimicóticos	Especies de <i>Candida</i> resistentes
Alteradores del intercambio iónico (formación de poros en la membrana que permiten el flujo de potasio y con ello, la muerte celular).	POLIENOS	Anfotericina B	<i>C. lusitaniae</i> (intrínseca) + <i>C. tropicalis</i> ⁷⁶ <i>C. glabrata</i> ⁷⁶ <i>C. guilliermondii</i>
		Nistatina	* <i>C. albicans</i> ^{77,78}
Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos/proteínas	PIRIMIDINA FLUORADA	5- Fluorocitosina	<i>C. glabrata</i>
Inhibidores de la conversión de lanosterol en ergosterol (Lo que produce una alteración en la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas).	IMIDAZOLES	Miconazol	<i>C. glabrata</i>
		Ketoconazol	<i>C. dubliniensis</i> ⁴ <i>C. glabrata</i>
		Clotrimazol	<i>C. glabrata</i> ⁷⁹ <i>C. tropicalis</i> ⁷⁹
	TRIAZOLES	Fluconazol	<i>C. krusei</i> (intrínseca) <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. rugosa</i> <i>C. parapsilosis</i> ⁸⁰ <i>C. lusitaniae</i> ⁷⁶ + <i>C. kefyi</i> <i>C. dubliniensis</i>
		Itraconazol	+ <i>C. krusei</i> + <i>C. glabrata</i>
		Voriconazol	+ <i>C. glabrata</i>
		Posaconazol	<i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i>
Isavuconazol	+ <i>C. glabrata</i>		
Inhibidores de la pared celular (Inhibición de la síntesis de β -1,3 glucano componente de la pared celular fúngica)	EQUINOCANDINAS	Caspofungina	+ <i>C. parapsilosis</i>
		Micafungina	+ <i>C. glabrata</i> + <i>C. guilliermondii</i>
		Anidulagunfina	+ <i>C. krusei</i> + <i>C. albicans</i> ⁸⁰ + <i>C. dubliniensis</i> ⁸⁰

*Escasos reportes de resistencia

*Cepas sensible dosis dependiente (SDD)

Tabla 5. Tipos de antimicóticos, su mecanismo de acción y las principales especies de *Candida* resistentes a ellos ⁷⁵

Diversos son los métodos de referencia aprobados por el CLSI, hallándose: el método de microdilución (M27-A3) y el método de difusión en agar (M44-A) para levaduras, y para hongos filamentosos, el método M38-A.

El método M44-A surgió con la intención de facilitar y agilizar la realización de las pruebas en los laboratorios clínicos, se encuentra basado en el estudio de la sensibilidad a cierto antifúngico, en función del halo de inhibición producido por la difusión de este en un medio de cultivo sólido. El medio de cultivo recomendado para esta prueba es el Mueller Hinton agar (MHA) suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/ml de azul de metileno (AM). La adición de la glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición; presentándose en conjunto una buena correlación con el método M27-A3 y con los datos *in vivo*.⁸³

Pruebas comerciales. Un método cuantitativo de difusión en agar son las tiras E-test®, las cuales son alargadas, hechas de plástico inerte que tienen incorporado un gradiente de concentración de cierto antifúngico. Cuando se depositan sobre una placa de agar MHA suplementado ya inoculada, dicho antifúngico difunde en el medio. Tras una incubación a 35°C por 24 h, se determina la CIM en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira E-test.⁸⁶

La correlación de las tiras con el método de referencia (M27-A3) se ha determinado según varios estudios entre el 60 y 100%, dependiendo claro, de varios factores como el medio de cultivo utilizado, la combinación especie/antifúngico, el tiempo de incubación y el antifúngico.^{83,84}

7.5 Relevancia y expectativas

El presente protocolo generará información para ampliar el conocimiento en cuanto a la frecuencia de CO mixta en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 con un nivel hiperglucémico ($\geq 7\%$ de hemoglobina glucosilada), las especies del género *Candida* causantes de este cuadro clínico, los espectros de sensibilidad a antifúngicos de cada especie presente en la muestras mixtas, la relación de esta micosis oportunista con el grado de descompensación en los pacientes a estudiar y la variedad clínica de candidosis en los mismos.

Al determinar el espectro de sensibilidad a ciertos antifúngicos de las especies de *Candida* encontradas de manera mixta en estos pacientes, se podrá implementar un tratamiento más eficaz, específico y que evite complicaciones del cuadro clínico.

7.6 Alerta hospitalaria mundial por *Candida auris*

Si bien es cierto que *C. albicans* sigue siendo la especie más sobresaliente debido a que se identifica con mayor frecuencia a nivel clínico con porcentajes entre 40-80%, hoy en día, existe un interés por el complejo de dos especies y una variedad: *C. haemulonii sensu stricto*, *Candida duobushaemulonii* y la variedad *C. haemulonii var. vulnera*⁸⁵; así como por la especie llamada *Candida auris*.⁸⁶ Estos dos patógenos se encuentran estrechamente relacionados y cada vez son más reconocidos como emergentes debido a la preocupante múltiple resistencia que presentan ante fármacos (MDR); sin embargo, es *C. auris* la que se ha considerado como una emergencia mundial hospitalaria debido a que presenta resistencia a azoles, polienos y es de sensible a susceptibilidad intermedia a equinocandinas⁸⁷ y su prevalencia es de hasta el segundo lugar en candidemias en pacientes hospitalizados⁸⁸, conllevando a mayores índices de mortalidad que los presentados en candidemias cuyo agente etiológico es *C. haemulonii*.

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés; *Centers for Disease Control and Prevention*; CDC) está preocupado por *C. auris* por la antes mencionada resistencia, por la dificultad que presenta la tipificación con métodos de laboratorio estándar (dificultando el control de la propagación en los entornos de atención médica) y porque se ha presentado un número creciente de infecciones en varios países desde que se identificó.³⁶ En 2017 Kumar y col.⁸⁹ describen un método rápido y barato que consiste en el uso del medio CHROMagar Candida® suplementado con medio Pal; en el que se puede diferenciar entre las dos especies relacionadas filogenéticamente: *C. auris* y *C. haemulonii*; mediante la producción o no de pseudohifas, aunque mencionan que la principal limitación que tiene este método es que la identificación preliminar debe ser realizada por un sistema de identificación automatizado como Vitek2®. Sin embargo, dicha prueba no resultaría del todo útil ya que a inicios de este año se publicó que *C. auris* puede realizar cambios fenotípicos de acuerdo con 2 tipos de interruptores: hereditario (paso de blastoconidios a pseudohifas) que se activa al estar en contacto con células mamíferas y, no hereditario (pseudohifas a hifas) que es dependiente de temperatura⁸⁷.

En México hasta el momento no hay reportes de identificación de este patógeno, por lo cual no es posible afirmar si en realidad no se han presentado casos de infección por este microorganismo o no se ha realizado la identificación adecuada.

Es importante mencionar que *C. auris* puede propagarse en entornos de atención médica a través del contacto con superficies o equipos ambientales contaminados, o de persona a persona.³⁶

Por todo lo anterior, el CDC ha emitido una alerta a los centros de salud y ha solicitado a todo el personal de laboratorio que notifique algún aislamiento de este hongo a las autoridades de salud pública locales o estatales, así como a él mismo.

VIII.- METODOLOGÍA

DEFINICIÓN DE POBLACIÓN

Pacientes ambulatorios y hospitalizados del área de endocrinología con Diabetes Mellitus Tipo 2, con un estado glucémico de descompensación, el cual es un nivel de hemoglobina glucosilada igual o mayor a 7% del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

8.1 Tipo y diseño del estudio

Estudio prospectivo, observacional, descriptivo de pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2, en un estado de descompensación glucémica (niveles de hemoglobina glucosilada $\geq 7\%$) del área de endocrinología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", diagnosticados en el Laboratorio de Micología de dicho hospital con CO por *Candida* spp.

8.2 Población y tamaño de la muestra

La muestra de estudio será tomada de la población de pacientes hospitalizados y ambulatorios, con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 y descompensación glucémica tomándose como referencia niveles $\geq 7\%$ de hemoglobina glucosilada, del área de endocrinología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". El tamaño de dicha muestra será proporcional a la población con Diabetes Mellitus en nuestro país que según la Federación Internacional de Diabetes en el año 2017 fue

de 12 millones⁵⁵, motivo por el cual se emplea la fórmula para poblaciones infinitas y estudios descriptivos, cuya variable principal es de tipo cualitativa⁹⁰:

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Donde:

n= tamaño de la muestra

Z= valor de Z crítico, calculado en las tablas del área de la curva normal. Llamado también nivel de confianza.

d= nivel de precisión absoluta. Referido a la amplitud del intervalo de confianza deseado en la determinación del valor promedio de la variable en estudio.

p= proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia

q= proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno en estudio (1-p)

Por lo que con un nivel de confianza de 95%, un nivel de error de 5%, y una proporción aproximada de 4.9% de CO mixta en pacientes con DM2¹⁴, tenemos que el tamaño de muestra es de

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.049)(1 - 0.049)}{(0.05)^2} = 71.6$$

$$n = 72 \text{ pacientes}$$

8.3 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

1.-Pacientes diagnosticados con Diabetes Mellitus tipo 2, hospitalizados y ambulatorios del área de endocrinología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

2.-Pacientes con descompensación glucémica (nivel de hemoglobina glucosilada mayor o igual a 7%)

- 3.-Pacientes con cuadro clínico de probable CO
- 4.-Pacientes adultos de género masculino y femenino
- 5.-Pacientes que hayan aceptado el estudio y firmado el consentimiento informado

Criterios de exclusión:

- 1.-Pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 1
- 2.-Pacientes con control glucémico
- 3.-Pacientes con diagnóstico de leucemia, en tratamiento de hemodiálisis.
- 4.- Pacientes que ya cuenten un diagnóstico de CO, además de ya recibir tratamiento antimicótico
- 5.- Pacientes que deseen no participar en el estudio

8.4 Definición de las variables a evaluar

Tabla 6. Características de las variables a evaluar en el proyecto.

Característica o Atributo por Evaluar del Paciente	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medición
Tipo de paciente	Estancia en hospital del paciente	Cualitativa Dicotómica	Hospitalizado No Hospitalizado
Sexo	Condición orgánica del paciente al momento del estudio	Cualitativa Dicotómica Binominal	Mujer Hombre
Edad	Tiempo que ha vivido el paciente	Cuantitativa Discontinua	Años
Hemoglobina Glicosilada (HbA1c)	Nivel promedio de glucosa en sangre al momento del estudio	Cuantitativa Continua	Porcentaje
Candidosis	Variedad clínica oral	Cualitativa Nominal	-Aguda Seudomembranosa (COAS) -Aguda Atrófica (COAA) -Crónica Hiperplásica (COCH) -Crónica Queilitis Angular (COCQA) -Crónica Atrófica (COCA)
Candidosis oral (CO)	Presencia de estructuras micóticas en las Muestras Bucales	Cualitativa Dicotómica	Positivo Negativo
Evolución de la CO	Tiempo que lleva el paciente afectado por la CO	Cuantitativa discreta	Días

Examen Directo	Hallazgos microscópicos en la muestra	Cualitativa Nominal	Blastoconidios Seudohifas
Agentes etiológicos causantes de la CO	Identificación de los agentes causales de las CO	Cualitativa Nominal	Diferentes especies del género <i>Candida</i>
Concentración Inhibitoria Mínima	Concentración más baja de un agente antimicrobiano que causa una reducción específica en el crecimiento visible del microorganismo en agar o caldo	Cuantitativa continua	µg/ml
Espectro de sensibilidad	Sensibilidad de las diversas especies de <i>Candida</i> obtenidas en la muestra, a ciertas concentraciones de diferentes antimicóticos	Cualitativa Nominal	Sensible SDD Resistente
Tipo de tratamiento antidiabético	Grupo de fármacos que reducen los niveles de glucosa en sangre a través de diferentes mecanismos.	Cualitativa nominal	-Metformina -Sulfonilurea -Insulina -Inhibidores de DPP-4 (dipeptidil dipeptidasa tipo 4) -Inhibidores de SGLT-2 (cotransportador sodio-glucosa) - Tiazolidinedionas (TZD)
Tiempo de diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2	Tiempo que lleva el paciente al día del estudio de habersele diagnosticado DM tipo 2	Cuantitativa discreta	Días
Índice de masa corporal	índice utilizado frecuentemente para clasificar el sobrepeso y la obesidad.	Cuantitativa continua	Kg/m ²
Tensión Arterial (TA)	Presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias.	Cuantitativa continua	mm Hg (milímetros de mercurio)
Colesterol HDL	Concentración sérica de lipoproteína de alta densidad (HDL)	Cuantitativa continua	mg/dL (miligramos por decilitro)
Colesterol LDL	Concentración sérica de lipoproteína de baja densidad (LDL)	Cuantitativa continua	mg/dL
Triglicéridos	Concentración de triglicéridos (grasas) en sangre	Cuantitativa continua	mg/dL
Glucosa	Concentración de glucosa en una muestra de sangre en ayunas	Cuantitativa continua	mg/dL

IX.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

9.1 Cronograma de actividades

Diagrama 2. Cronograma de actividades realizadas.

Titulo		CANDIDOSIS ORAL MIXTA EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2; IDENTIFICACIÓN Y ESPECTRO DE SENSIBILIDAD																							
Mes		Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero				Marzo			
Semana		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
ACTIVIDADES	Toma de Muestras	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
	Tipificación De Especies		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	Pruebas in vitro de sensibilidad		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	Análisis estadístico																			X	X	X			
	Elaboración de reporte																					X	X	X	
	Difusión de resultados																							X	X

9.2 Toma y procesamiento de la muestra

A continuación, se muestra en el diagrama 3, todo el procedimiento experimental realizado desde la búsqueda de pacientes con las características de inclusión al proyecto hasta la identificación de las especies y sus pruebas de susceptibilidad antifúngica.

Como un método adicional de tipificación de las especies causantes de CO de estos pacientes, se realizaron pruebas bioquímicas. En el diagrama 4 se observa detalladamente la preparación del inóculo, la inoculación, incubación, lectura e interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas, con el *kit* comercial AUXACOLOR™ 2.

Se anexa la carta de consentimiento informado y hoja de recolección de datos.

Evaluación *in vitro* de susceptibilidad a antifúngicos

a) Medios, inoculación y condiciones de tiras

Se realizó la evaluación *in vitro* de susceptibilidad a 4 agentes antifúngicos diferentes utilizando tiras semejantes a las comerciales (E-test®), indicadas en el diagrama 5. Dicho ensayo se basa en el uso de tiras de plástico inerte que

incorporan un gradiente de concentración de antifúngico, las cuales, al depositarse sobre placas inoculadas de MHA suplementado con 2% de glucosa y 0.5 mg/ml de AM, liberan por difusión en el medio el antifúngico y, tras una incubación a 35°C durante 24 h, permiten determinar la CIM en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de plástico.

b) Determinación de CIM con tiras y de susceptibilidad

Para el control de calidad la cepa de referencia (*C. albicans* ATCC 10231) se probó simultáneamente con los aislados provenientes de las muestras. Los puntos de corte considerados para catalogar a las cepas como sensibles (**S**), sensibles dosis dependientes (**SDD**) o resistentes (**R**) se especifican para cada antifúngico en la tabla 7, tomados de acuerdo con las guías para la susceptibilidad *in vitro* de las especies de *Candida* del documento M27-A3 del CLSI.

Tabla 7. Puntos de corte recomendados por el CLSI para pruebas de susceptibilidad in vitro de especies pertenecientes al género Candida			
Agente antifúngico	Criterios de interpretación (µg/ml)		
	Sensible	*SDD	Resistente
Itraconazol	≤0.125	0.25-0.5	≥1
Ketoconazol	≤0.1	0.25-0.5	≥1
Fluconazol			
<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	≤2	4	≥8
<i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i>	≤8	16-32	≥64

*SDD= Sensible Dosis Dependiente

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se recolectaron en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel, de donde se obtuvieron las gráficas y tablas para el análisis descriptivo; posteriormente las diferentes pruebas estadísticas se realizaron con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 24, bajo intervalos de confianza al 95% y niveles de significación del 5%.

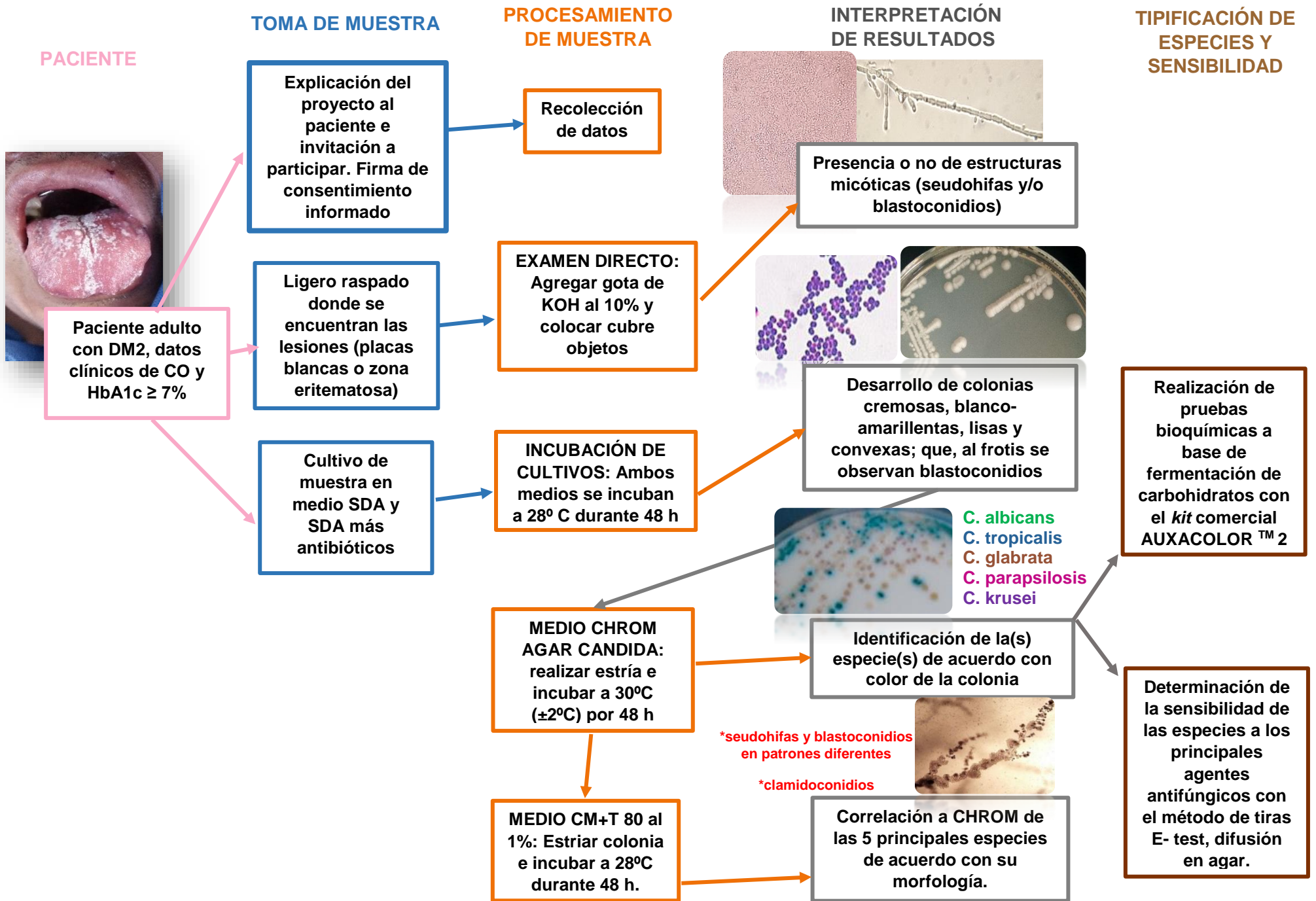


Diagrama 3. Procedimiento experimental desde búsqueda de paciente hasta identificación de agentes etiológicos y susceptibilidad.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO



Cultivo con crecimiento de 24-48 h en medio CHROM Agar Candida® o SDA ± antibióticos

Selección de 1 a 5 colonias iguales



Medio de suspensión R2 con opacidad = 1.5 escala de McFarland

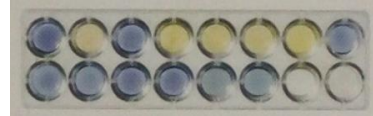
Homogeneizar la suspensión



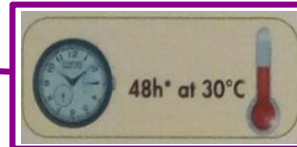
Vórtex

Distribuir 100 µl de inóculo por pocillo

	Pocillo	Prueba	Color / Interpretación	
			Negativa	Positiva
Pruebas de asimilación de azúcares	C. Neg.	Control negativo	Azul	///
	GLU	Glucosa (control positivo)		
	MAL	Maltosa		
	SAC	Sacarosa		
	GAL	Galactosa		
	IAC	Lactosa		
	RAF	Rafinosa	Azul (a)	Amarillo (b)
	INO	Inositol	Verde	Incoloro
	CEL	Cellobiosa		
	TRE	Trehalosa		
	ADO	Adonitol		
	MEL	Melezitosa		
	XYL	Xylosa		
	ARA	Arabinosa		
Pruebas enzimáticas	HEX	Detección de la actividad N-acetilgalactosaminidasa (hexosaminidasa)	Incoloro	Amarillo
	POX/PRO	Detección de la actividad fenoloxidasa de <i>Cryptococcus neoformans</i> (POX)	Incoloro	Marrón
		Detección de la actividad prolina-arilamidasa (PRO)	Gris (c)	Amarillo (b)



Dos lecturas, una parcial a las 24, y la definitiva a las 48 h; de acuerdo con cambio de color del indicador



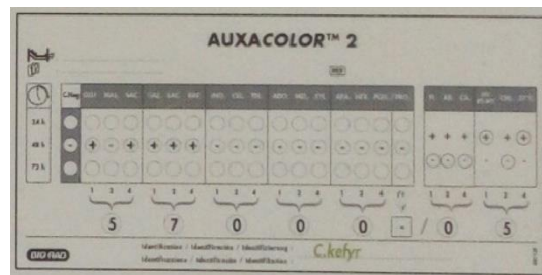
INCUBACIÓN

Recubrir la microplaca con el adhesivo

ESQUEMA DE LA MICROPLACA AUXACOLOR™ 2

C.Neg.	GLU.	MAL.	SAC.	GAL.	IAC.	RAF.	INO.
CEL.	TRE.	ADO.	MEL.	XYL.	ARA.	HEX.	POX/PRO.

LECTURA



En base con la metodología de puntuación

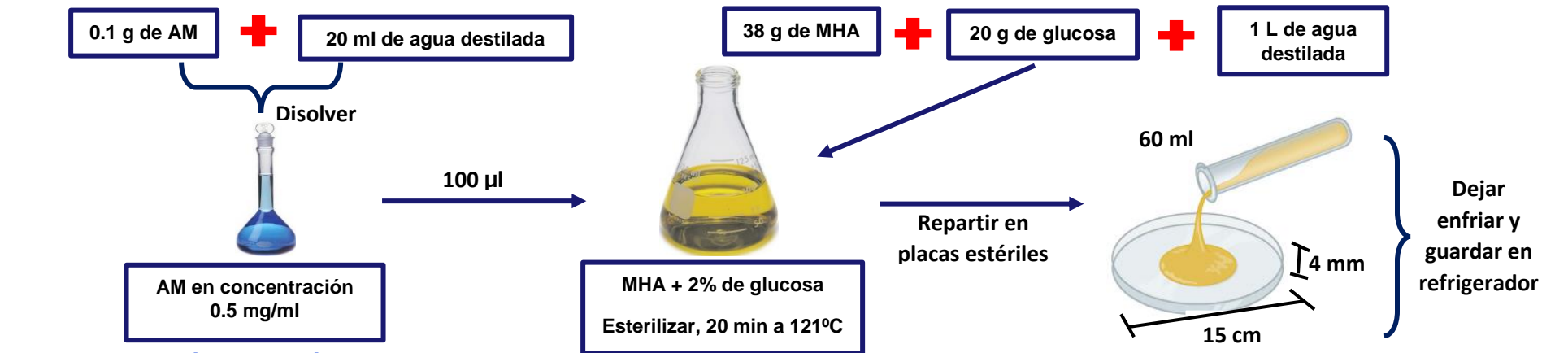
INTERPRETACIÓN

11040 v 05	<i>Candida rugosa</i>	57000 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11040 (+) 21	<i>Geotrichum candidum</i>	57001 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11041 v 05	<i>Candida rugosa</i>	57010 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11050 v 05	<i>Candida rugosa</i>	57011 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11050 (+) 21	<i>Geotrichum candidum</i>	57040 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11400 - 04	<i>Prototheca wickerhamii</i>	57041 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11400 (+) 01	<i>Candida zeylanoides</i>	57050 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11410 (+) 01	<i>Candida zeylanoides</i>	57051 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11600 (+) 01	<i>Candida zeylanoides</i>	57200 - 05	<i>Candida kefyr</i>
11610 (+) 01	<i>Candida zeylanoides</i>	57201 - 05	<i>Candida kefyr</i>
		57240 - 05	<i>Candida kefyr</i>
		57241 - 05	<i>Candida kefyr</i>
12400 - 04	<i>Candida glabrata</i>	57400 - 05	<i>Candida kefyr</i>
13400 - 04	<i>Prototheca wickerhamii</i>	57401 - 05	<i>Candida kefyr</i>
31002 - 07	<i>Candida albicans</i> 2	57440 - 05	<i>Candida kefyr</i>
31042 - 07	<i>Candida albicans</i> 2	57441 - 05	<i>Candida kefyr</i>

Diagrama 4. Etapas a detalle del procedimiento de pruebas bioquímicas con kit AUXACOLOR™ 2.

1.- PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

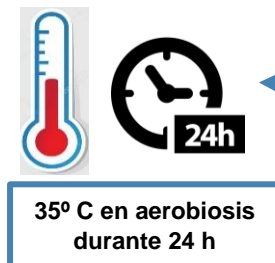
Mueller Hinton Agar (MHA) suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/ml de azul de metileno (AM)



2.- PREPARACIÓN DEL INÓCULO



4.- INCUBACIÓN



3.- INOCULACIÓN DE LAS PLACAS



5.- LECTURA



La CIM es la [antifúngico] en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento (≥80%) con la tira

X.- RESULTADOS

Análisis descriptivo de los datos relacionados con los pacientes

Se incluyeron 72 pacientes con DM2 descontrolada, del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, 64 (89%) se encontraban hospitalizados y 8 (11%) fueron pacientes de consulta externa (no hospitalizados), de éstos 40 pacientes (56%) fueron mujeres y 32 (44%) hombres, la edad mínima de estos pacientes fue de 22 años y la máxima de 85 años, con un promedio de 51 años (tabla 8).

Tabla 8. Frecuencia y porcentajes por género de los pacientes participantes y sus MTC

Género	Mujeres	Hombres
N=72(100%)	40(56%)	32(44%)
Medidas de tendencia central (MTC)		
Edad mínima	Edad máxima	Promedio
22 años	85 años	51 años

De las 72 muestras, en 63 (87.5%) se encontraron al examen directo estructuras micóticas, cúmulo de blastoconidios y/o pseudohifas (imagen 1) que determinan el estado de infección, por lo que se diagnosticó con CO a esos pacientes; en 9 muestras no se pudo comprobar la presencia de estructuras que confirmaran el diagnóstico, estos datos se pueden observar de manera comparativa en la gráfica 1, así como la relación entre tipo de pacientes (hospitalizados y ambulatorios) y género.

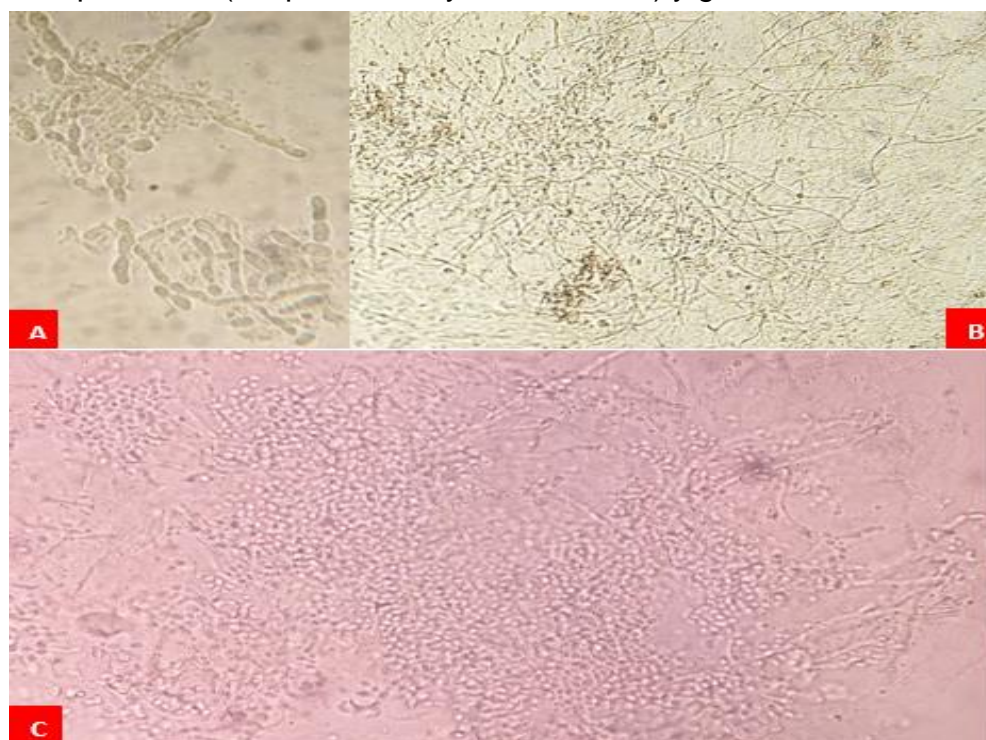
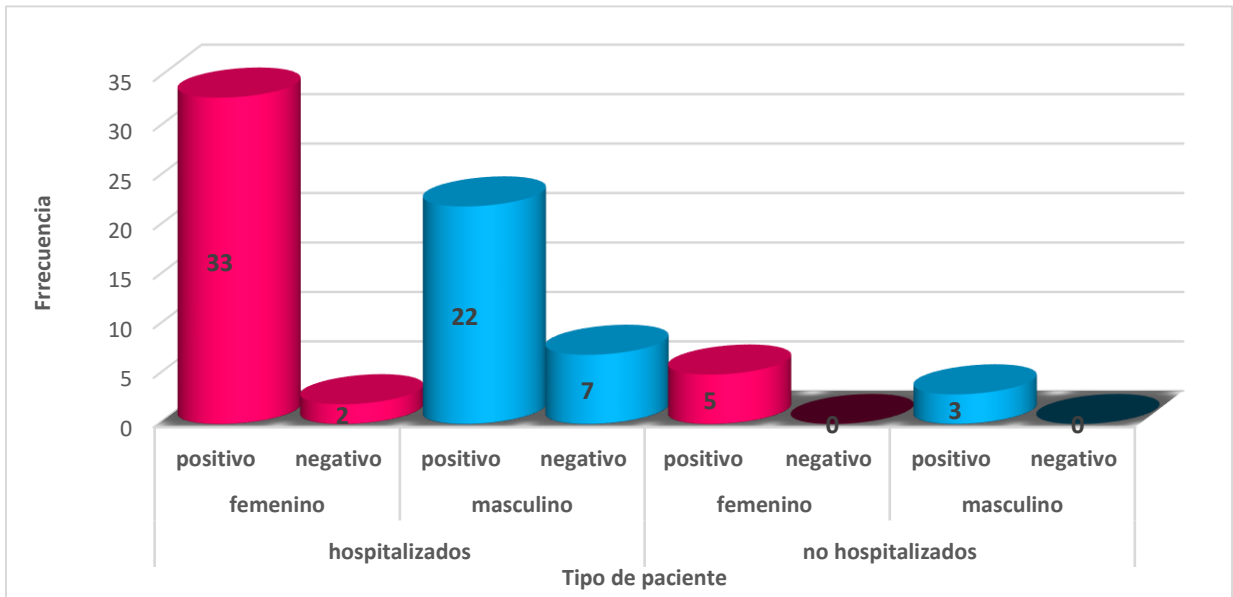
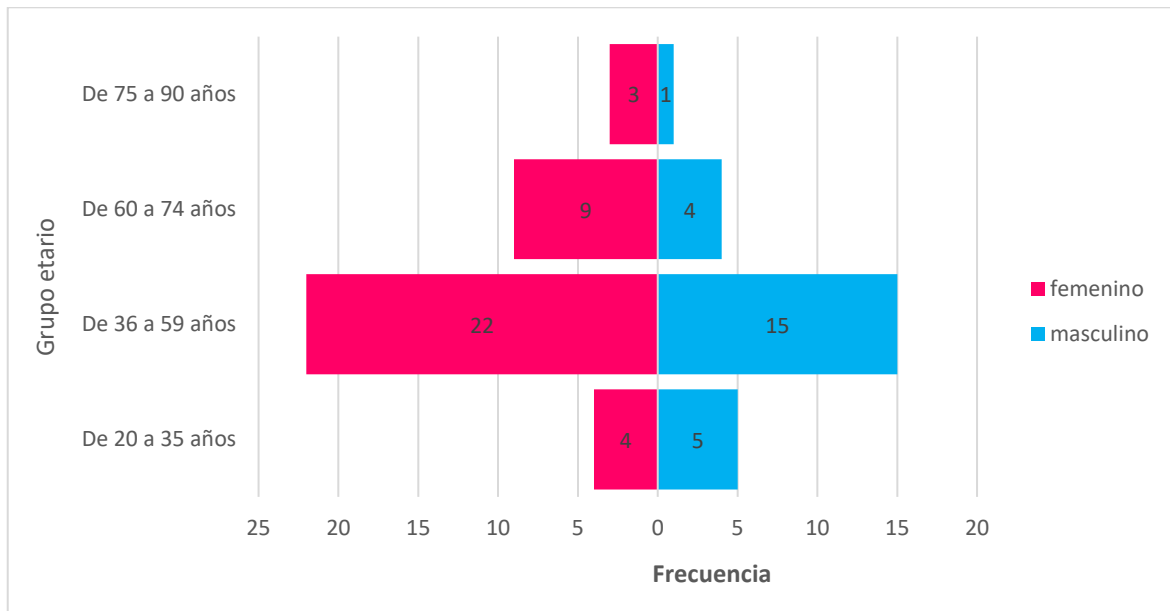


Imagen 1. Examen directo de CO; pseudohifas y blastoconidios (KOH al 10%, A) 40X, B) 10X), biopelícula (KOH al 10%, C 40X).



Gráfica 1. Muestras positivas y negativas, así como su relación entre tipo de paciente y género.

Dentro de los 63 pacientes que fueron diagnosticados con CO, el 60.3% (38/63) fueron mujeres y el 39.7% (25/63) hombres. La edad de los pacientes se clasificó en grupos etarios, que se dividen de la siguiente manera según la OMS⁵¹: **jóvenes-adultos** de 20 a 35 años, **adultos** de 36 a 59 años, **edad avanzada** de 60 a 74 de años y **ancianos** de 75 a 90 años; de los cuales, en el grupo de adultos se encontraron la mayor cantidad de casos con CO con 37 pacientes (gráfica 2).



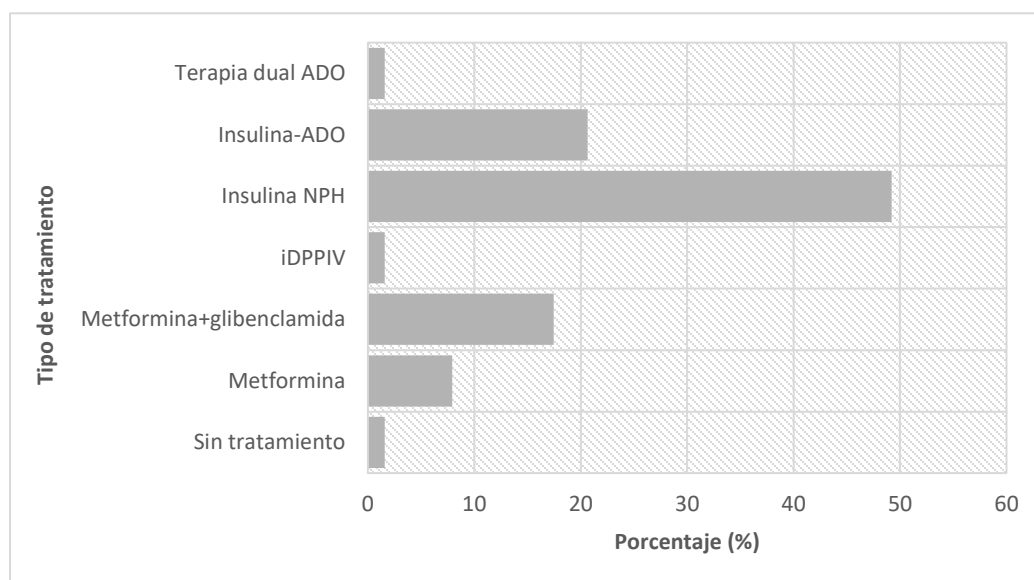
Gráfica 2. Frecuencia de ambos géneros de pacientes diagnosticados con CO de acuerdo con grupo etario.

También se colectaron los datos referentes al tiempo de evolución del padecimiento, se encontró que el promedio fue de 10.4 ± 8.7 años, en la mayoría de los casos los pacientes fueron de reciente diagnóstico constituyendo el 20.6% (tabla 9).

Tabla 9. Medidas de tendencia central y dispersión del tiempo de diagnóstico de DM2 de los pacientes

Tiempo (años) de diagnóstico de DM2	
Medidas de tendencial central	
Promedio	10.41
Mediana	9
Moda	Recién Dx
Medidas de dispersión	
Mínimo	Recién Dx
Máximo	33
Desv. Estándar	8.75

La frecuencia y tipo de tratamiento con el cual los pacientes controlaban la hiperglucemia en casa aparecen en la gráfica 3, se puede ver que los tratamientos orales, considerados de primera línea (metformina y/o glibenclamida) ya no están realizando el efecto deseado, ya que casi la mitad (49.2%) de los pacientes se inyectan insulina de acción intermedia (NPH), los tratamientos que menos son utilizados son: Inhibidores del transportador de sodio-glucosa tipo 2 y la terapia dual de medicamentos orales (diferentes a metformina y glibenclamida), ambos con 1.58%



Gráfica 3. Tipos de tratamientos con el porcentaje de pacientes que los utilizan, nótese que casi la mitad (49.2%) de ellos se inyectan insulina de acción intermedia (NPH).

Análisis descriptivo de datos relacionados a CO de los pacientes

Las variantes clínicas de CO que se encontraron en este estudio en la mayoría de los casos la Candidosis Oral Aguda Seudomembranosa (COAS) fue la más frecuente, con 78% del total de pacientes con CO comprobada, seguida de la Candidosis Oral Aguda Atrófica (COAA) con 13%, la Candidosis Oral Crónica Hiperplásica (COCH) se encontró en el 6% y el tipo de CO menos frecuente en este tipo de pacientes fue la Candidosis Oral Crónica Queilitis Angular (COCQA) con 3% (gráfica 4). El tiempo en que se desarrollaron estas lesiones varió desde 3 días hasta 4 meses, con un promedio de 2 semanas de evolución.

En la imagen número 2 se aprecia la variedad clínica COAS, presentada en el dorso de la lengua como placas blancas que se removían fácilmente, con un fondo eritematoso, el paciente tenía 3 días de evolución. Por otro lado, en la imagen 3 se observa afección completa de la lengua como una placa blanca homogénea, indurada, la cual, al raspado mecánico no se desprendía fácilmente, corresponde a la variedad COCH.

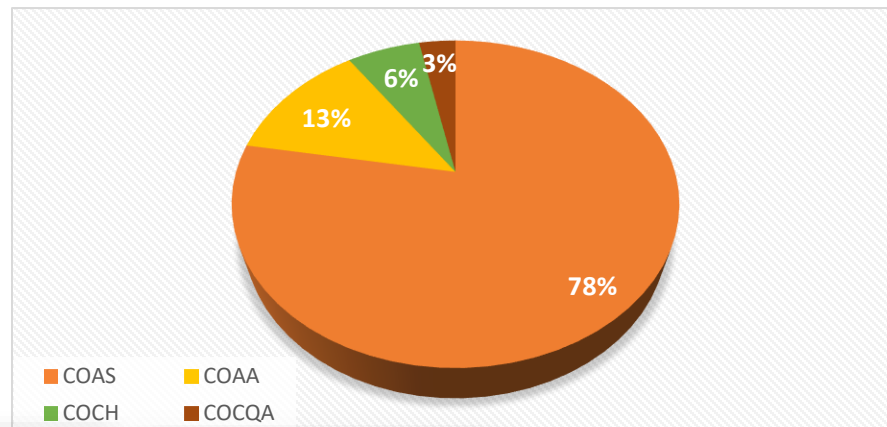


Imagen 2. Variedad clínica de CO (COAS) en paciente con DM2 descontrolada, con evolución de 3 días, se puede observar placas blancas, con fondo eritematoso en la cavidad bucal.

Imagen 3. Variedad clínica COCH en paciente con DM2 descontrolada, exponiéndose placa homogénea que no se desprende al raspado; evolución de 4 meses.

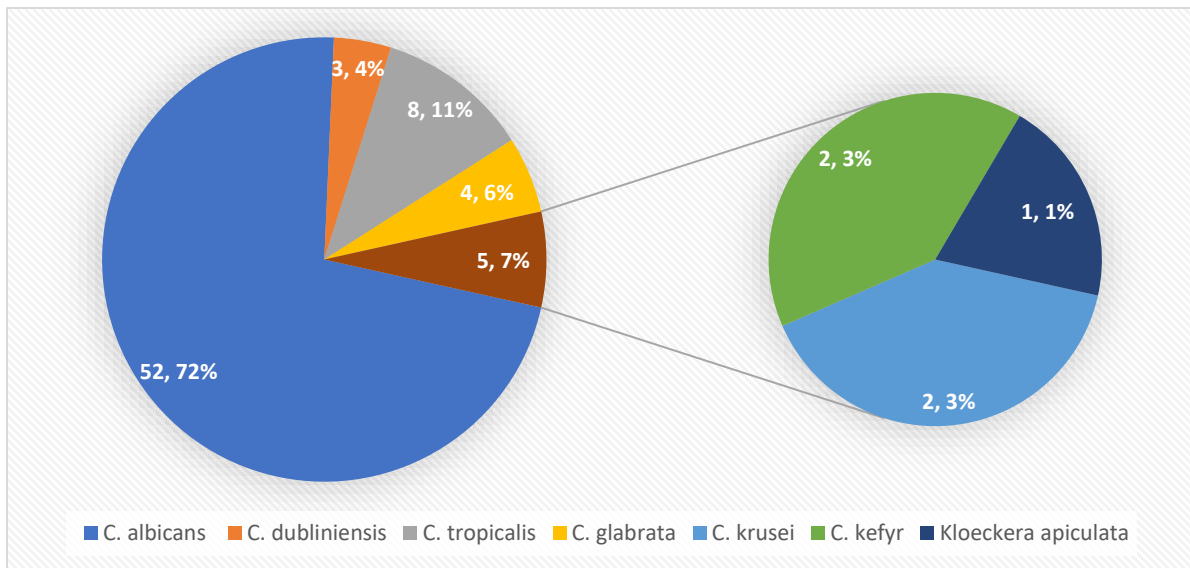
Análisis descriptivo de los datos relacionados a los agentes etiológicos causantes de CO

La identificación de los agentes etiológicos se llevó a cabo por las características macroscópicas de color de las colonias desarrolladas en CHROM-Agar Candida®; lo cual además permitió identificar aquéllos casos de afección por más de una especie de *Candida* (aislados mixtos) (imagen 4A), este método tiene el inconveniente de permitir sólo la identificación presuntiva de las 5 principales especies (tabla 9); la confirmación de identidad de las especies se llevó a cabo mediante la morfología de estas 5 especies en medio *Corn-Meal* + Tween 80 (imagen 4B); y la identificación definitiva se realizó mediante las pruebas bioquímicas comerciales AUXACOLOR™ 2 (imagen 4C).



Imagen 4. A) Cultivo mixto (*C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata*) en CHROM Agar Candida®, **B)** clamidoconidios de *C. albicans* en *Corn-Meal* + Tween 80, **C)** pruebas bioquímicas comerciales de *C. albicans*.

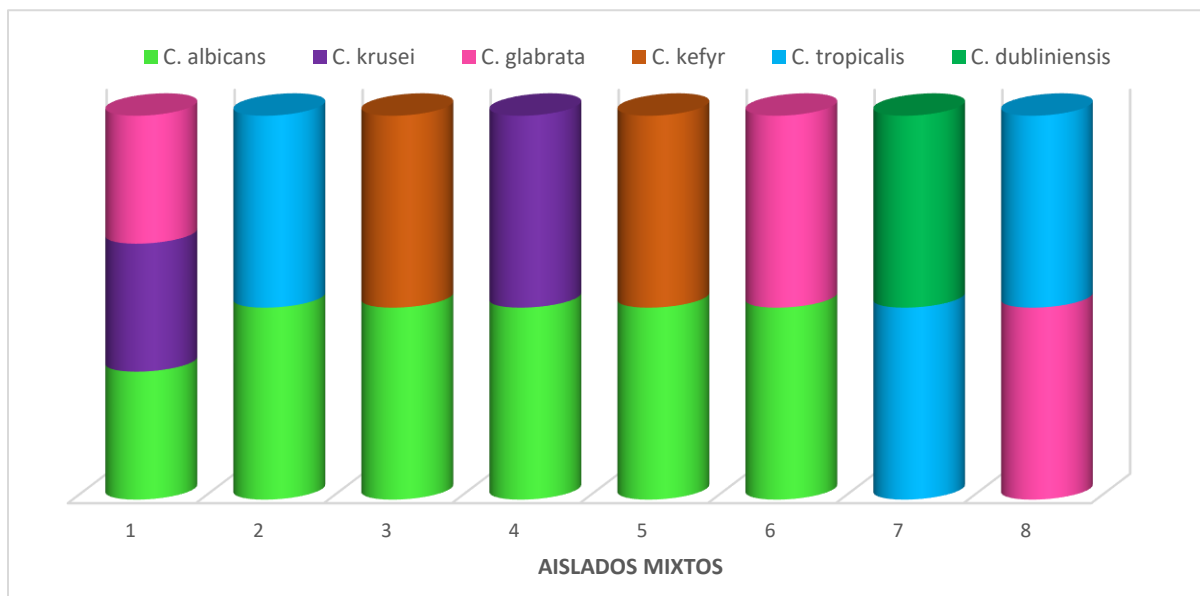
Se identificaron 7 especies de levaduras en total, de las cuales el mayor porcentaje correspondió a *C. albicans* (72%), seguida de *C. tropicalis* (11%) y *C. glabrata* (5.55%). En menor porcentaje se encontraron *C. dubliniensis* (4.16%), *C. krusei* y *C. kefir*, ambas con (2.77%). El 1.38% correspondió a un microorganismo perteneciente al género *Kloeckera* (estado anamorfo). Estos datos se presentan en la gráfica 5.



Gráfica 5. Especies de levaduras aisladas, mostrándose la frecuencia separa por coma (,) del porcentaje correspondiente a cada una.

Análisis descriptivo de casos diagnosticados con CO mixta

Se determinaron 8 aislados mixtos, constituyendo el 13% (8/63) del total de muestras; 7 de ellas fueron por dos especies de *Candida* y de 1 muestra se aislaron 3 especies (*C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata*). En la gran mayoría de los casos mixtos (6/8) estuvo implicada *C. albicans*, así como en los 2 casos donde identificó a *C. kefir*. En la gráfica 6 se muestran las especies relacionadas en los 8 aislados mixtos.



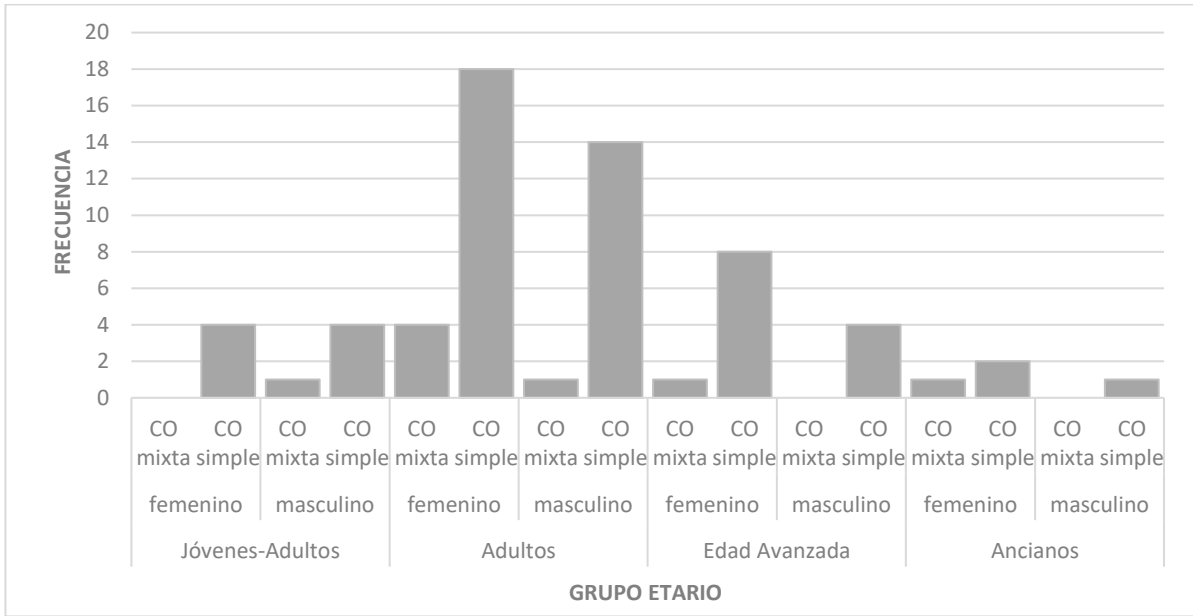
Gráfica 6. Se muestran los 8 aislados mixtos, y las especies implicadas. Nótese que los aislados 3 y 5 son causados por *C. albicans* y *C. kefir*.

La frecuencia de CO mixta en los grupos etarios para jóvenes-adultos fue de un aislado, perteneciendo a un hombre. Se observó una mayor relación entre el grupo de adultos y la frecuencia de CO mixta, debido a que se observaron 5 aislados (4 pacientes mujeres y 1 hombre). Tanto en los dos grupos etarios restantes, edad avanzada como ancianos, la frecuencia sólo fue de un aislamiento y ambos en mujeres (gráfica 7), estas frecuencias muestran una concordancia respecto al número de CO simple que se determinaron, es decir, la mayor frecuencia tanto de CO simple como de CO mixta fue en adultas.

Respecto a la asociación entre el diagnóstico de CO mixta y tipo de tratamiento que los pacientes empleaban como control de la hiperglucemia, se obtuvieron resultados de un aislado mixto en 5 pacientes que tomaban metformina, 3 aislados mixtos de 12 pacientes con indicación de metformina+ glibenclamida, 3 diagnósticos de CO mixta de 31 pacientes que se inyectaban insulina NPH, y por último, 1 diagnóstico de CO mixta en un paciente con terapia dual de medicamentos orales, diferentes a metformina y glibenclamida. Es importante mencionar que no se encontró CO mixta en pacientes con tratamiento iDPPIV ni en aquellos que se inyectaban insulina y tomaban dos medicamentos orales (gráfica 8).

Análisis descriptivo y estadístico sobre la inferencia de relación entre CO mixta y ciertas variables

En cuanto a determinar la relación entre CO y el porcentaje de HbA1C que presentaban los pacientes con ese diagnóstico, se encontró que el promedio de HbA1C en pacientes con CO simple fue de 10.84%, mientras que para los pacientes con CO mixta el promedio de hemoglobina glucosilada fue ligeramente mayor, 12.06%; aunque existe diferencia entre ambos tipos de candidosis y su relación a HbA1C, no es estadísticamente significativa (tabla 10). De igual manera en la asociación entre CO mixta y el tiempo que diagnóstico de DM2, se determinó que los pacientes con CO simple tenían en promedio 32 años padeciendo DM2; mientras que los pacientes con CO mixta tenían un promedio menor de años con el diagnóstico de DM2 (27 años). También en la tabla 10 se muestran diversas inferencias de la relación ente la frecuencia de CO mixta y algunas variables importantes



Gráfica 7. Relación de grupo etario, dividido por género con el tipo de CO hallada. Existe una asociación de CO con el grupo de adultos, y una asociación entre CO mixta y el género femenino en este mismo grupo etario.



Gráfica 8. Relación entre la frecuencia de presencia de CO mixta y el tipo de tratamiento antihiper glucemiante; se puede observar que hay una relación positiva con metformina+ glibenclamida e insulina NPH.

Tabla 10. Análisis estadístico de inferencia entre la frecuencia de la variable CO mixta y otras variables de importancia				
Inferencia de relación entre la frecuencia de CO mixta* con:				
	Tipo de variable	Prueba estadística	Valor-p	Conclusión
los diferentes sectores etarios (jóvenes-adultos, adultos y acianos)	Cualitativa	-Tabla de contingencia 2x2 -Chi cuadrada de Pearson	0.698	Se acepta H ₀ que establece independencia entre ambas variables, es decir, no existe asociación
género (femenino, masculino)	Cualitativa	-Tabla de contingencia 2x2 -Chi cuadrada y Fisher	0.461	Se acepta H ₀ , por lo tanto, no existe relación entre ambas variables
porcentaje (%) de HbA1C	Cuantitativa ¹ (p=0.2)	t- Student	0.1	Se acepta H ₀ , por lo tanto, no existe relación entre ambas variables
tiempo de diagnóstico de DM2 (años)	Cuantitativa ² (p=0.006)	U Mann-Whitney	0.412	Se acepta H ₀ , por lo tanto, no existe relación entre ambas variables
tratamiento empleado como control de hiperglucemia	Cualitativa	Chi cuadrada de Pearson	0.097	Se acepta H ₀ , por lo tanto, no existe relación entre ambas variables
*Variable cualitativa		H ₀ = Hipótesis nula	¹ Distribución normal	² Distribución anormal

Análisis descriptivo y comparativo de datos referentes al control metabólico de los pacientes con CO

Los registros de perfil metabólico, tales como IMC, Glucemia basal, Glucosa Post-prandial, Presión arterial sistólica/diastólica, Hemoglobina glucosilada, triglicéridos, colesterol y colesterol HDL y LDL; se muestran en la tabla 9. A destacar sobre estos resultados es que como era de esperarse el promedio del IMC sobrepasa de 23.9 kg/m² que es lo establecido por la OMS⁵¹ como normal, mostrando una correlación positiva con CO, pero que no alcanza la significancia estadística (p=0.239).

No existe gran diferencia en los resultados de glucosa basal y glucosa a las 2 h, ya que cuentan con 258±164.6 y 229.6±65.2 mg/dL respectivamente. Podemos observar que los promedios (127/82 mm/Hg) de las presiones arteriales se mantienen en un rango considerado de control normal. Tanto en estos parámetros como en los resultados de triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL no hay una gran diferencia con lo establecido como buen control, por lo que no se alcanza significancia estadística para asociarlos con predisposición a CO mixta (Tabla 11).

Entre el parámetro de HbA1C elevada (10.9±2.5%) y CO mixta existe una relación positiva, pero que no alcanza significancia estadística (p=0.1) para poder asociar ambas variables.

Tabla 11. Medidas de tendencia central de las variables responsables del control metabólico. Obsérvese que en ningún caso hay una relación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para adquirir CO mixta.

Parámetro metabólico	IMC (kg/m ²)	Glucosa (mg/dL)	Glucosa 2 h (mg/dL)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	HbA1C (%)	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	Col. HDL (mg/dL)	Col. LDL (mg/dL)
Promedio	63.8	258	229.6	126.9	81.7	10.9	201.1	155.5	31.2	91.1
Desviación estándar	27.3	164.6	65.2	15.5	11.1	2.5	97.9	46.6	13.8	41.5
Asociación con CO mixta										
p-valor	0.951 ^b	0.302 ^b	0.885 ^b	0.876 ^a	0.574 ^b	0.1 ^a	0.375 ^a	0.788 ^a	0.611 ^a	0.415 ^a
a) Prueba T-Student										
b) Prueba U-Mann-Whitney										

Análisis descriptivo e inferencial de los datos obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a diferentes antimicóticos realizadas a los aislados de los pacientes con CO mixta

Las pruebas de susceptibilidad a los tres antimicóticos comerciales más utilizados para tratamiento de CO (FLZ, ITZ, KTZ) fueron realizadas a las 17 especies provenientes de los aislados de 8 pacientes con CO mixta, mediante el uso de tiras similares a las comerciales denominadas E-test® que contaban con los siguientes gradientes de concentración: FLZ (4,8,16,32,64 µg/ml), ITZ (0.1,0.2,0.4,0.8,1.0 µg/ml) y KTZ (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 µg/ml), mostrados en la imagen 5.

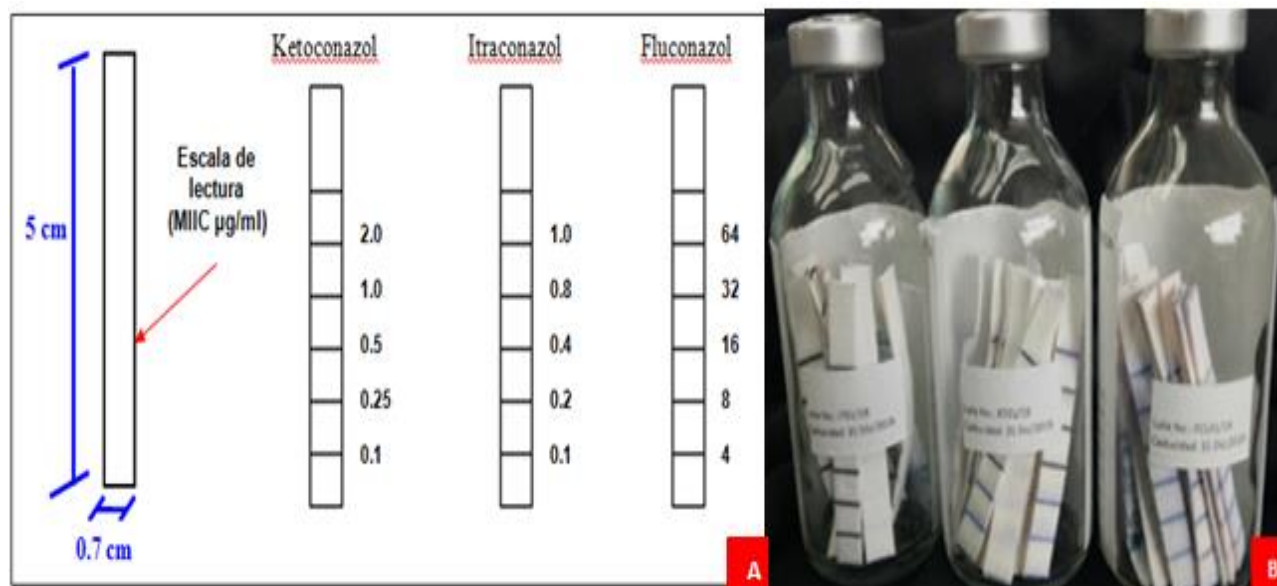


Imagen 5. Tiras reactivas para detección de concentración inhibitoria mínima (CIM). **A)** Rangos de concentración para FLZ, ITZ y KTZ. **B)** Tiras de plástico no poroso, impregnadas en forma estable por el reverso con un gradiente de antimicótico.

Control de calidad con la cepa de referencia

Las CIMs para la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231, fueron determinadas tras 24 h de incubación a 35°C, y se encontró que estas fueron: 0.120 µg/ml para FLZ, 0.2 µg/ml para ITZ y 0.3 µg/ml para KTZ; siendo aceptables de acuerdo con lo establecido en las guías de control de calidad (tabla 12).

Agente Antifúngico	Intervalos de CIMs (µg/ml)	
	Guías del CLSI	*Nuestros resultados
Fluconazol	0.125-0.5	0.120
Itraconazol	0.064-0.25	0.2
Ketoconazol	0.125-0.5	0.3

*Nuestros resultados fueron obtenidos después de 24 h de incubación

Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) de los antimicóticos para los aislados mixtos

En la tabla 12 se muestran las CIMs y su equivalente en patrón de susceptibilidad de las especies que componen los 8 aislados mixtos, sobresaliendo los resultados obtenidos en aquellos aislados (1, 2, 5,7) que tienen a *C. krusei* y *C. glabrata*; ya que reportaron las CIMs más elevadas correspondiendo sólo a patrones SDD y R. En especial el aislamiento número dos (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*) sólo fue sensible a ketoconazol y fluconazol para la especie de *C. albicans*.

Las CIMs para las 6 cepas de *C. albicans* fueron <4 µg/ml para FLZ, desde <0.1 a <1 µg/ml para KTZ y desde 0.1 a >1 µg/ml para ITZ. Para el caso de las 3 especies de *C. tropicalis* las CIMs fueron >4 µg/ml para FLZ, <0.1 µg/ml para KTZ y >1 µg/ml para ITZ. En tanto que las 3 especies de *C. glabrata* reportaron CIMs desde <4 a 40 µg/ml para FLZ, desde <0.1 a 1.0 µg/ml para KTZ y desde 0.4 a >1 µg/ml para ITZ. La otra especie que reportó elevadas CIMs fue *C. krusei* (2 aislados) desde 12 a 16 µg/ml para FLZ, de 0.25 µg/ml para KTZ y >1 µg/ml para ITZ. Por otra parte, la especie de *C. dubliniensis* aislada tuvo CIMs de >4 µg/ml para FLZ, <1 µg/ml para KTZ y de 0.6 µg/ml para ITZ. Por último *C. kefyr* reportó CIMs <4 µg/ml para FLZ, <0.1 µg/ml para KTZ y de <0.1 a 0.2 µg/ml para ITZ (tabla 14).

En la imagen 7 se pueden observar las CIMs correspondientes al menos a un aislado de cada especie aisladas en las muestras mixtas.

Susceptibilidad antifúngica de los aislados provenientes de pacientes con DM2 y CO mixta

De acuerdo con lo establecido por el CLSI en su documento M27-A3 (tabla 7) 6 de los aislados de *C. albicans* fueron sensibles a FLZ y 5 sensibles a KTZ, uno de ellos fue SDD, mientras que 4 aislados fueron resistentes a itraconazol. Un resultado similar fue observado en *C. tropicalis* ya que las 3 cepas fueron sensibles a FLZ y KTZ, pero resistente a Itraconazol. Para los 3 aislados de *C. glabrata*: uno fue sensible, uno SDD y otro resistente a FLZ, mientras que para KTZ uno fue sensible y dos fueron resistentes, para ITZ un aislado fue SDD y dos aislados fueron resistentes. La cepa de *C. dubliniensis* resultó ser sensible para FLZ y KTZ, pero resistente para ITZ. Los 2 aislados de *C. krusei* fueron los únicos que no resultaron ser sensibles para los 3 antimicóticos, ya que fueron SDD para FLZ y KTZ, mientras que ambos aislados fueron resistentes a ITZ. *C. kefyr* fue la única especie que no tuvo aislados resistentes, pues de las dos cepas identificadas, ambas fueron sensibles a FLZ y KTZ, y únicamente una cepa fue SDD a Itraconazol, porque la otra fue sensible a este antifúngico (tabla 15).

Al realizar el análisis inferencial de relación entre el espectro de sensibilidad y las especies de *Candida* aisladas de los casos de CO mixta se determinó de manera global que la especie que más resultó sensible a los tres antifúngicos probados fue *C. kefyr* (83.3%), la cepa con un patrón menos evidente (SDD) fue *C. krusei* (66.7%) y la que menos presentó una marcada sensibilidad (R) fue *C. glabrata* (55.6%). Lo anterior muestra que existe una relación estadísticamente significativa ($p=0.015$).

En tanto de manera específica, fue para KTZ en donde se presentó asociación entre presencia de resistencia a una especie (66.7% de *C. glabrata* vs. 0% las demás especies) con un valor de $p=0.018$. En el caso de FLZ el valor de significancia fue $p=0.055$ al realizar la prueba de Chi-cuadrada, por lo que no se pudo establecer asociación. Para el antifúngico ITZ tampoco se pudo establecer asociación de resistencia ($p=0.580$) (tabla 16).

Tabla 13. CIM y patrones de susceptibilidad de las especies aisladas provenientes de 8 pacientes con CO mixta

Núm. de aislados mixtos	Especies involucradas	CIM ($\mu\text{g/ml}$) Patrón de susceptibilidad		
		Ketoconazol	Itraconazol	Fluconazol
1	<i>C. albicans</i>	<0.1 S	0.1 S	<4 S
	<i>C. krusei</i>	0.25 SDD	>1 R	16 SDD
2	<i>C. albicans</i>	<0.1 S	0.6 R	<4 S
	<i>C. krusei</i>	0.25 SDD	0.8 R	12 SDD
	<i>C. glabrata</i>	1.0 R	>1 R	9 SDD
3	<i>C. dubliniensis</i>	<0.1 S	0.6 R	<4 S
	<i>C. tropicalis</i>	<0.1 S	>1 R	<4 S
4	<i>C. albicans</i>	<0.1 S	>1 R	<4 S
	<i>C. kefyr</i>	<0.1 S	<0.1 S	<4 S
5	<i>C. albicans</i>	0.25 SDD	>1 R	<4 S
	<i>C. glabrata</i>	0.7 R	>1 R	40 R
6	<i>C. albicans</i>	<0.1 S	0.6 R	<4 S
	<i>C. kefyr</i>	<0.1 S	0.2 SDD	<4 S
7	<i>C. tropicalis</i>	<0.1 S	>1 R	<4 S
	<i>C. glabrata</i>	<0.1 S	0.4 SDD	<4 S
8	<i>C. albicans</i>	<0.1 S	0.4 SDD	<4 S
	<i>C. tropicalis</i>	<0.1 S	>1 R	<4 S

Tabla 14. Intervalo de CIM ($\mu\text{g/ml}$) de los agentes antifúngicos para los 17 aislados mixtos provenientes de la cavidad oral de los pacientes con DM2 descontrolada, determinadas por medio de tiras.

Especie de <i>Candida</i> (núm. de cepas)	Agente antifúngico	Intervalo de CIM obtenidas por tiras
<i>C. albicans</i> (6)	Fluconazol	<4
	Ketoconazol	desde <0.1 a <1
	Itraconazol	desde 0.1 a >1
<i>C. tropicalis</i> (3)	Fluconazol	<4
	Ketoconazol	<0.1
	Itraconazol	>1
<i>C. glabrata</i> (3)	Fluconazol	desde <4 a >64
	Ketoconazol	desde <0.1 a 1.0
	Itraconazol	desde 0.4 a >1
<i>C. dubliniensis</i> (1)	Fluconazol	<4
	Ketoconazol	<1
	Itraconazol	0.6
<i>C. krusei</i> (2)	Fluconazol	desde 12 a 16
	Ketoconazol	0.25
	Itraconazol	>1
<i>C. kefyr</i> (2)	Fluconazol	<4
	Ketoconazol	<0.1
	Itraconazol	desde <0.1 a 0.2

Tabla 15. Patrones de susceptibilidad de las cepas aisladas de pacientes con CO mixta

Especie de <i>Candida</i> (núm. de cepas)	Agente antifúngico	S	SDD	R
<i>C. albicans</i> (6)	Fluconazol	6(100%)	-	-
	Ketoconazol	5(83.3%)	1(16.6%)	-
	Itraconazol	1(16.6%)	1(16.6%)	4(66.4%)
<i>C. tropicalis</i> (3)	Fluconazol	3(100%)	-	-
	Ketoconazol	3(100%)	-	-
	Itraconazol	-	-	3(100%)
<i>C. glabrata</i> (3)	Fluconazol	1(33.3%)	1(33.3%)	1(33.3%)
	Ketoconazol	1(33.3%)	-	2(66.6%)
	Itraconazol	-	1(33.3%)	2(66.6%)
<i>C. dubliniensis</i> (1)	Fluconazol	1(100%)	-	-
	Ketoconazol	1(100%)	-	-
	Itraconazol	-	-	1(100%)
<i>C. krusei</i> (2)	Fluconazol	-	2(100%)	-
	Ketoconazol	-	2(100%)	-
	Itraconazol	-	-	2(100%)
<i>C. kefyr</i> (2)	Fluconazol	2(100%)	-	-
	Ketoconazol	2(100%)	-	-
	Itraconazol	1(50%)	1(50%)	-

S= Sensible **SDD=** Sensible Dosis Dependiente **R=** Resistente

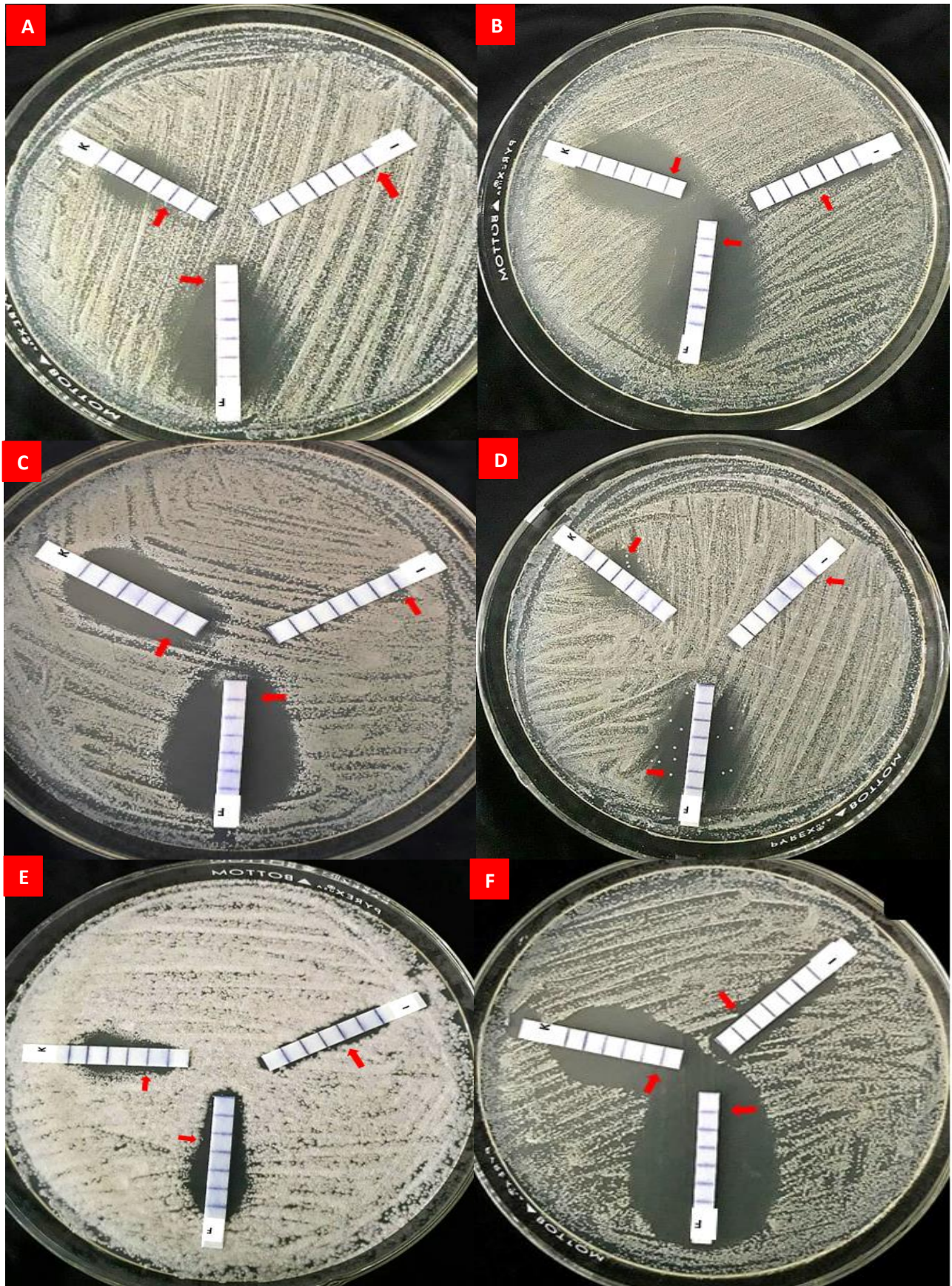


Imagen 7. Pruebas de susceptibilidad con tiras para determinación de CIM. **A)** *C. albicans*; FLZ= <4, KTZ= 0.25, ITZ= >1 µg/ml. **B)** *C. dubliniensis*; FLZ= <4, KTZ= <0.1, ITZ= 0.6 µg/ml. **C)** *C. tropicalis*; FLZ= <4, KTZ= <0.1, ITZ= >1 µg/ml. **D)** *C. glabrata*; FLZ= 40, KTZ= 0.7, ITZ= >1 µg/ml. **E)** *C. krusei*; FLZ= 12, KTZ= 0.25, ITZ= 0.8 µg/ml. **F)** *C. kefyr*; FLZ = <4, KTZ= <0.1, ITZ= 0.2 µg/ml.

Tabla 16. Asociación entre resistencia a Ketoconazol y las diferentes especies del género <i>Candida</i> provenientes de los aislados mixtos de CO							
	S	%	SDD	%	R	%	Prueba de Chi-cuadrada
Asociación para Ketoconazol							
<i>C. albicans</i>	5	83.3	1	16.7	0	0	p=0.018
<i>C. tropicalis</i>	3	100	0	0	0	0	
<i>C. glabrata</i>	1	33.3	0	0	2	66.7	
<i>C. dubliniensis</i>	1	100	0	0	0	0	
<i>C. krusei</i>	0	0	2	100	0	0	
<i>C. kefyr</i>	2	100	0	0	0	0	
TOTAL	12	70.6	3	17.6	2	11.8	

XI.- DISCUSIÓN

El diagnóstico de CO en pacientes con Diabetes Mellitus es más frecuente que en la población sana, además de esto, existen diversos reportes en los cuales se indica que las cepas de *Candida* provenientes de pacientes con VIH, DM2, Cáncer y CO presentan actividad proteolítica que facilita la invasión de los tejidos permitiendo el establecimiento de infección localizada o superficial; que en ocasiones puede evolucionar a sistémica; comparadas con las cepas de sujetos sanos⁹¹. En este estudio, la CO se encontró en 87.5% (63/72) de los pacientes con DM2 estudiados; con una preferencia de mujeres sobre hombres (1.5:1). También se observó que hay mayor frecuencia (37/63) de CO en el grupo de adultos que va de 36 a 59 años; atribuible a varios procesos que acompañan el avance de la edad como son: la pérdida de dientes⁴² y el uso de prótesis que provocan la reducción del pH salival favoreciendo la adhesión y desarrollo de *Candida*², al igual que la xerostomía deriva en la disminución de la concentración de saliva y sus elementos antifúngicos (lisozimas, lactoferrinas, lactoperoxidasas); nuestros resultados concuerdan con lo publicado por Suárez y col.¹⁴

Existe diferencia entre el tipo de paciente, hospitalizados y no hospitalizados, en los primeros fue más frecuente encontrar CO, se describen varios factores que contribuyeron a ello, además de que el motivo de la hospitalización fue descompensación metabólica se agrega la existencia de factores predisponentes implícitos en su hospitalización prolongada tales como mala higiene, mal estado nutricional, antibioticoterapia, los cuales favorecen el desarrollo de la infección, aunque no se alcanzó significancia estadística para asociar dichas variables. Osuna et. al.⁹² obtuvieron resultados considerables (21%) de casos de CO, en pacientes que la causa de admisión al hospital fue descompensación metabólica, y este tipo de pacientes tuvieron una mayor frecuencia de estancia hospitalaria (mayor a 10 días) a diferencia de aquellos con buen control. También Fanello y col.⁹³ han demostrado que existe un riesgo relativamente alto de infección en la cavidad oral conforme aumentan los días de hospitalización, la CO se manifestó sobre todo en los 7 primeros días; ambas publicaciones concuerdan con el motivo de internamiento y tiempo de evolución de CO que se encontró en los pacientes en el presente estudio.

Existen ciertos desacuerdos respecto a si los factores metabólicos, que se conoce constituyen la mejor manera de controlar la enfermedad y evitar el desarrollo de

complicaciones macro y microvasculares, tienen correlación con la predisposición de tener CO en la población con DM2. Carda⁴² demostró que pacientes con HbA1c por encima de 8% tenían una glucosa salival aumentada, lo que aumenta el crecimiento del hongo. De igual manera Balan y col.⁹⁴ afirman que, durante los episodios de hiperglucemia, la alteración ambiental en la cavidad oral aumentó la producción de glucosa y ácido en la saliva, lo que favoreció la transición de *Candida sp.* de comensal a patógeno. En el presente trabajo se encontró una relación positiva entre valores elevados de HbA1c (por arriba de 8.4%) y CO mixta; sin alcanzarse una significancia estadística.

La CO es la infección fúngica más reportada en pacientes con DM2 que tienen problemas periodontales⁵. En la mayoría de los casos la variedad clínica que más se observó fue COAS (78%) que tal y como su nombre lo menciona, el tiempo de evolución no sobrepasó los 5 días; concordando con lo observado por Araiza y col.⁴ en pacientes con VIH/SIDA donde la variedad más encontrada fue COAS (90%). Es importante mencionar que en segundo lugar aparece la COAA con 13%; esta variedad se encuentra asociada a xerostomía (sequedad en boca), que es uno de los síntomas más característicos en la DM, de ahí que su importancia radique en que puede constituir un síntoma o signo inicial de esta enfermedad crónica en pacientes de cierta evolución no diagnosticados o ser indicadora de descompensación metabólica en enfermos conocidos y tratados³³; este último porcentaje es similar al publicado por Suárez et. al.¹⁴ en pacientes con DM2.

Dentro de los agentes etiológicos, *C. albicans* fue el más aislado (72%) tal como se reporta en la mayoría de los artículos relacionados a candidosis. Un estudio conducido por Mohammadi y col.¹⁵ concluyen que las especies de *Candida* encontradas de la cavidad oral de pacientes con DM son sólo 4: *C. albicans* (36.2%), *C. krusei* (10.4%), *C. glabrata* (5.1%) y *C. tropicalis* (3.4%), cifras muy similares en este estudio. Otros autores^{94,95} han mencionado la identificación de *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* y *C. pulcherrima* de la mucosa oral de pacientes total y parcialmente edéntulos (62.3 %) y la mucosa oral de los diabéticos (37.7%).

Por otra parte, el porcentaje de cepas NCA que se identificó en el presente estudio fue de 27%, en porcentaje de 11% para *C. tropicalis*, 6% para *C. glabrata*, 4% *C. dubliniensis*, 3% para *C. krusei* y *C. kefyr*; porcentajes similares fueron reportados para

las cepas de *C. albicans* (74.6%), *C. tropicalis* (15.2%), *C. kefyr* (3.4%) por Rosa-García⁹⁶ tras un estudio de la colonización e infección bucal por *Candida* sp. en pacientes con y sin DM2 que además tenían enfermedad renal crónica en situación de diálisis.

El segundo agente etiológico más aislado en este proyecto fue *C. tropicalis* con un porcentaje de 11%; el cual fue encontrado de igual manera en segundo lugar (4.5%) por Zuza-Alves et. al.⁹⁷ en un estudio realizado en Brasil, tras aislados de especies de *Candida* provenientes de la cavidad oral en pacientes con trasplante de hígado. Es de importancia mencionar que *C. tropicalis* está cobrando mayor relevancia tanto debido a su frecuencia como a sus factores de virulencia, los cuales impactan directamente en la estrategia terapéutica. Lo anterior cobra relevancia con un estudio indio que concluye que existe un aumento significativo de las infecciones por *Candida* en pacientes con cáncer oral que se sometieron a quimioterapia o radioterapia, donde predominaron las especies NCA, principalmente *C. tropicalis*, presentándose en el 42,8% de los casos⁹⁷. En cuanto a sus factores de virulencia, se ha demostrado gran producción de proteasas que ayudan a la evasión del sistema inmunitario del hospedero a través de la degradación de la albúmina entre otras proteínas²⁰. También análisis filogenéticos⁹⁸ sugieren que *C. tropicalis* está estrechamente relacionada con *C. albicans*, por lo que, en consecuencia, existe similitud con la capacidad de producción de hifas verdaderas (producidas por *C. albicans* y *C. dubliniensis*) y la formación eficaz de biopelículas⁹⁵.

En un estudio de revisión sistemática de la bibliografía realizado por Reyes y col.⁹⁹ sobre el estado actual de la etiología de la candidosis en nuestro país, se menciona que la forma clínica superficial más común es la genital (47.81%), seguida por la candidosis oral con un considerable 36.26%. Es de importancia conocer que esta forma clínica se presentó en diferentes poblaciones como pacientes con y sin VIH, niños y adolescentes, pacientes con cáncer, con DM, niños con mala nutrición y personas de la comunidad Tarahumara. Resulta también de interés conocer que el agente etiológico con mayor frecuencia de aislamiento fue *C. albicans* con 77.24%, seguido del complejo *C. glabrata* con 13.16%, *C. tropicalis* con un 5.13%, *C. krusei* con un 3.29% y el complejo *C. parapsilosis* con menos del 1%; ya que en nuestro estudio la frecuencia de aislados son muy similares tanto para la especie de *C. krusei* y del complejo *C. parapsilosis* (siendo nula para el presente estudio).

Un paciente de los que participaron presentó variedad clínica COAS, con tiempo de evolución de aproximadamente 6 días. En la identificación se encontró a *Kloeckera apiculata* (1.38%), agente inusualmente reportado como patógeno. *Hanseniaspora uvarum* forma teleomorfa de *Kloeckera apiculata* es encontrada en fruta fresca, particularmente en uvas, formando parte importante del microbioma que envuelve la fermentación alcohólica. En la literatura existe el reporte de un aislamiento proveniente de la cavidad oral de una paciente de 70 años con lesiones asociadas al uso de prótesis dentales¹⁰⁰; pero al igual que los resultados obtenidos en un proyecto realizado en Cuba sobre CO con aislamiento de *K. apiculata* cuyos pacientes eran VIH positivos¹⁰¹; no se puede establecer con certeza la fuente del contagio, dada la falta de antecedentes epidemiológicos evidentes¹⁰². Recientemente en 2018, Jankowski y col.¹⁰³ presentan el caso de un paciente del cual se aisló *K. apiculata* de una lesión en piel, la cual resolvió tras la administración de tratamiento antifúngico; posicionando a la especie como muy probable agente patógeno.

En este estudio, 8 pacientes (13%) presentaron aislados mixtos, un paciente presentó 3 especies (*C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata*) y 7 pacientes tuvieron presencia de dos especies como: *C. albicans* /*C. kefyr* (determinada en dos pacientes), *C. tropicalis*/*C. glabrata*, *C. dubliniensis*/*C. tropicalis*, *C. albicans* /*C. tropicalis*, *C. albicans* /*C. glabrata* y *C. albicans* /*C. krusei*; estos últimos dos aislados también son reportados en pacientes con DM en un porcentaje de 8% por Mohammadi¹⁵. en el estudio que realizó con estos pacientes y pacientes sanos. La coexistencia de diferentes especies hace más persistente la infección y puede señalar un estado de riesgo para desarrollar infecciones más severas, además de dificultar el tratamiento terapéutico. De ahí la importancia en la identificación de *C. tropicalis* y *C. glabrata*, que en los últimos años han aumentado su nivel de patogenicidad e incluso se ha determinado sinergismo entre ambas especies para causar candidosis orofaríngea severa,^{96,104} y de difícil terapia por ser menos susceptibles a azoles, y aumentando el riesgo de candidemia a través de diferentes mecanismos.^{94,96,104} Otros autores han publicado frecuencias de aislados mixtos similares al de este proyecto y con especies parecidas.^{14,15,101} Rosa-García⁹⁶ identificó 9 cultivos mixtos en pacientes con DM2, uno de ellos siendo causado por 3 especies (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*), cuatro por *C. albicans* /*C. glabrata* y uno por *C. glabrata* /*C. tropicalis*. Es de interés el conocimiento que obtiene de su proyecto Martínez Machín¹⁰¹, ya que señala una relación entre el número de especies aisladas

de la cavidad oral de pacientes VIH positivos y el tipo de infección; consistente en que el aislamiento de una sola especie se relaciona con pacientes de infección primaria, así como el aislamiento de más de una especie con aquellos pacientes que sufren infecciones recurrentes.

Estudios recientes de los patrones de recurrencia confirman que la recurrencia producida por una cepa diferente a la que originó el episodio inicial prevalece en pacientes con tratamiento previo de antifúngicos¹⁰¹.

El tratamiento de la candidosis oral usualmente es de base tópica (nistatina, clotrimazol, ketoconazol) para pacientes que no cuentan con algún tipo de complicación; sin embargo, la terapia antimicótica con triazoles es apropiada en pacientes con infecciones recurrentes, refractarios al tratamiento o en aquellos con alto riesgo de desarrollar infecciones sistémicas⁵, entre los que se encuentran pacientes con VIH, cáncer, DM, etc. Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó la susceptibilidad *in vitro*, mediante difusión en agar de FLZ, ITZ y KTZ.

Es de importancia recordar que la respuesta clínica al tratamiento antimicótico depende de ciertos factores, en el caso específico del presente trabajo, depende de: las características de inmunidad de los pacientes con DM2 (disminución de la población de células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, entre otros)⁴⁰, incremento de glucosa salival, los factores de virulencia expresados por *Candida*, al igual que la sensibilidad del microorganismo al medicamento y la farmacodinamia de este, entre otros.

En los últimos años, numerosos estudios han reportado que el incremento en la frecuencia de los aislados (la mayoría provenientes de pacientes con algún tipo de inmunosupresión) de especies NCA presentan menor susceptibilidad, e incluso resistencia a 2 ó 3 agentes antifúngicos, que *C. albicans*.^{14,15,104,105} En este proyecto se encontró que al evaluar KTZ, 2 aislados de *C. glabrata* (66.7%) fueron resistentes y 2 cepas de *C. krusei* (100%) fueron DSS, difiriendo del resultado de *C. albicans* donde todos los aislados resultaron sensibles (tabla 14). Pero es la evaluación de ITZ, la que arroja resultados interesantes, debido a que no sólo la gran mayoría de las cepas NCA: 3 aislados de *C. tropicalis* (100%), 2 de *C. glabrata* (66.7%), 1 de *C. dubliniensis* (100%) y 2 de *C. krusei* (100%) (tabla 14) fueron resistentes, sino también, *C. albicans* reportó 66.7% de resistencia, no concordando con lo publicado en la literatura; Sanitá¹⁰⁴ encontraron también resultados altos para *C. glabrata* (93.3%), para *C. tropicalis* 5% y para *C. albicans* 4% de cepas resistentes a este tratamiento. De manera contraria, otras

especies del grupo NCA presentan comportamiento similar al de *C. albicans* y son más susceptible a ciertos azoles, en nuestros resultados esas especies fueron *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* y *C. kefyr* que tuvieron el 100% de cepas sensibles tanto a fluconazol como a ketoconazol, además con valores de CIM bajas, incluso por debajo de los extremos inferiores del intervalo (tabla 13).

De manera ideal no sólo debe detectarse la presencia de resistencia, sino también el mecanismo involucrado, que en el caso de los principales antimicóticos utilizados que son los azoles, se ha demostrado resistencia cruzada. Derivado de esto, algunos autores describen que la presencia de resistencia a FLZ; antifúngico mayormente utilizado y por lo tanto con más reportes de resistencia; tiene como consecuencia también resistencia a ITZ¹⁰⁶. Dicha aseveración no concuerda con lo encontrado en nuestro proyecto, ya que la gran mayoría de las especies aisladas (a excepción de *C. krusei* y *C. glabrata* con espectro SDD) fueron sensibles ante FLZ, concordando con que otros autores también han determinado espectros sensibles a dicho fármaco en especies provenientes de pacientes con CO.^{104,105} Se ha observado que las diferencias en la susceptibilidad *in vitro* a FLZ que van desde 70% a 100% de los aislados orales, dependen del grupo de pacientes estudiados.¹⁰⁴

Como ya se mencionó, el agente antimicótico que más expresó resistencia fue Itraconazol (en 5 de las 6 especies aislada). Sin embargo, al realizar las pruebas estadísticas, no se obtuvo significancia para poder asociar al antimicótico con alguna especie de *Candida*. Manzano-Gayosso y col.¹⁰⁷ también reportan el mayor porcentaje (19.9%) de resistencia a ITZ de especies de *Candida* causantes de onicomicosis al evaluar susceptibilidad *in vitro* a diferentes fármacos.

Nuestro estudio determinó que sólo existe asociación significativamente estadística entre *C. glabrata* y resistencia a KTZ (66.7%); que concuerda con el alto porcentaje (47.2%) de aislados orales resistentes a KTZ que publicó Bremenkamp¹⁰⁸ en un estudio que realizó con pacientes que padecían DM. Nuestro resultado puede explicarse en referencia al fármaco y al agente etiológico, ya que el KTZ es uno de los tratamientos más indicados para candidosis superficiales viéndose reflejado en el porcentaje alto de resistencia, por otro lado, *C. glabrata* es la especie representativa de pacientes adultos; Lindberg y col.¹⁰⁹ demostraron con significancia estadística que el aislamiento de *C.*

glabrata es más común en pacientes de edad aproximada a 50-60 años; que fue el grupo etario que predominó en este estudio con CO.

Entre los diversos estudios de susceptibilidad *in vitro* a antifúngicos donde se incluyen los métodos de microdilución en caldo, difusión en disco y citometría de flujo, es el primero de estos el que se considera como método de referencia por el CLSI. En la literatura dermatológica coreana, Song Bum⁸³ demostró concordancia con dicho método al utilizar las tiras de difusión en agar (E-test®) de 3 antimicóticos frente a especies de *Candida* provenientes de aislados de pacientes con CO. Es importante mencionar que los resultados que obtuvo Song Bum son similares a los encontrados en este estudio, por lo que de manera indirecta; además de que nuestro trabajo de susceptibilidad contó con controles de calidad; demuestran que las tiras de susceptibilidad antifúngica parecidas a las tiras comerciales E-test® que aquí se emplearon son un buen método para determinar susceptibilidad.

Si bien no se puede establecer una correlación entre la sensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica,¹⁰⁶ el determinar las concentraciones inhibitorias mínimas, contribuye en gran medida a la identificación de cepas sensibles y lo que es aún de mayor interés en la terapéutica: cepas resistentes a determinados agentes antifúngicos, que explican la falla en tratamientos instaurados.

Esperemos que futuros estudios puedan orientar en el camino hacia una mejor estrategia de prevención y terapéutica respecto a la candidosis, en especial CO mixtas.

XII.- CONCLUSIONES

*El porcentaje de Candidosis Mixtas en cavidad oral de pacientes con DM2 descompensados es de 13%.

*La variedad clínica más frecuente fue COAS con 78%.

*La especie proveniente de aislados de CO mixta en pacientes descompensados con DM2 que resultó ser más sensible a los tres antimicóticos evaluados (Fluconazol, Itraconazol y Ketoconazol) fue *C. kefyr* (83.3%), *C. krusei* (66.7%) en la mayoría de los aislados fue SDD y la especie con más resistencia fue *C. glabrata* (55.6%), con una relación estadísticamente significativa ($p=0.015$).

*Ketoconazol fue el único antimicótico que presentó asociación entre presencia de resistencia a una especie (66.7% de *C. glabrata* vs. 0% las demás especies) con un valor de $p=0.018$.

*Las CIMs para las 6 cepas de *C. albicans* fueron $<4 \mu\text{g/ml}$ para FLZ, desde <0.1 a $<1 \mu\text{g/ml}$ para KTZ y desde 0.1 a $>1 \mu\text{g/ml}$ para ITZ. Para el caso de las 3 especies de *C. tropicalis* las CIMs fueron $>4 \mu\text{g/ml}$ para FLZ, $<0.1 \mu\text{g/ml}$ para KTZ y $>1 \mu\text{g/ml}$ para ITZ. En tanto que las 3 especies de *C. glabrata* reportaron CIMs desde <4 a $40 \mu\text{g/ml}$ para FLZ, desde <0.1 a $1.0 \mu\text{g/ml}$ para KTZ y desde 0.4 a $>1 \mu\text{g/ml}$ para ITZ. La otra especie que reportó elevadas CIMs fue *C. krusei* (2 aislados) desde 12 a $16 \mu\text{g/ml}$ para FLZ, de $0.25 \mu\text{g/ml}$ para KTZ y $>1 \mu\text{g/ml}$ para ITZ. Por otra parte, la especie de *C. dubliniensis* aislada tuvo CIMs de $>4 \mu\text{g/ml}$ para FLZ, $<1 \mu\text{g/ml}$ para KTZ y de $0.6 \mu\text{g/ml}$ para ITZ. Por último *C. kefyr* reportó CIMs $<4 \mu\text{g/ml}$ para FLZ, $<0.1 \mu\text{g/ml}$ para KTZ y de <0.1 a $0.2 \mu\text{g/ml}$ para ITZ.

*No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, para adquirir CO de acuerdo con la edad (grupos etarios), el género, al grado de descontrol glucémico, tiempo de diagnóstico de diabetes, o en base al tratamiento anti-hiperglucemiante empleado.

XIII.- ANEXOS

13.1 Consentimiento informado



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Consentimiento bajo información para participar en proyecto de investigación titulado:

Título: “Candidosis oral mixta en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2; Identificación y espectro de sensibilidad”

Investigadores:

M. en C. José Alexandro Bonifaz Trujillo, Investigador principal, cel. 55 26-99 26-90

Dra. Sandra Denise Fernández Samar

QFB Javier Araiza Santibáñez, investigador asociado

QFB Ana Karen Carrillo Jiménez, investigadora asociada

Presidente del Comité de Ética:

Dra. María del Carmen Dubón Peniche, teléfono 2789-2000 extensión 1164

a) Justificación y objetivos de la investigación

Me están invitando a participar en este estudio debido a que presento Diabetes Mellitus tipo 2 y mis niveles de glucosa en la sangre son mayores a 7%; para diagnosticar si tengo una infección por hongos en la boca, este tipo de investigación que realizarán es de riesgo mínimo.

El hongo que buscan es del grupo o género *Candida* y está en mi boca de manera normal, pero debido a que mi metabolismo está alterado y mis defensas bajas porque tengo Diabetes Mellitus tipo 2, este hongo puede causar una infección que afecte mi lengua, encías, paladar y comisuras causando dolor, ardor, inflamación, sensación de boca seca, entre otras. Por esta razón es importante para mi salud bucal que me realice este estudio.

b) Procedimientos que se van a utilizar y su propósito, así como la justificación de los procedimientos que son experimentales.

Los médicos al tener conocimiento que tengo Diabetes Mellitus tipo 2, me comentaron sobre este estudio de la boca y me invitaron a participar en él.

Si decido entrar al estudio, los médicos van a revisar mi boca, tomarán fotografías como evidencia de que tomaron una muestra y me harán preguntas sobre mis enfermedades con el propósito de ayudar a diagnosticar si tengo el hongo.

Es necesario que el médico tome una muestra sólo de mi boca, la muestra la van a tomar haciendo un ligero raspado con un instrumento de metal esterilizada, dicha muestra se va a enviar al laboratorio de micología.

Título: “Candidosis oral mixta en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2; Identificación y espectro de sensibilidad”

La muestra del raspado de mi boca sólo podrá identificarse con mis iniciales para evitar que mi identidad sea conocida y el resultado será conocido sólo por mí y mis médicos. Es muy probable que mi resultado y el de los demás invitados en este estudio se agrupen y se publiquen en una revista seria, por lo que les doy mi autorización para hacer esto a mis médicos, siempre y cuando no se revele quien soy.

c) Molestias y riesgos esperados.

Este estudio es de un nivel de riesgo mínimo, por lo que las molestias que puedo experimentar al realizar la toma de muestra son igualmente mínimas. Los médicos ya han tenido experiencia en este tipo de estudios en la boca, con otro tipo de pacientes y no han tenido ninguna complicación.

d) Beneficios que puedan obtenerse

El beneficio para mí, si decido participar en el estudio es recibir un diagnóstico gratuito. Sin embargo, en caso de ser necesario un tratamiento para la infección tendré que comprarlo por mi cuenta, como siempre lo he hecho con mis demás medicamentos, así mismo el médico me indicará las revisiones que serán necesarias para ver si el hongo ya se quitó.

e) Procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto

No existen procedimientos alternativos, para realizar el diagnóstico y verificar si yo tengo o no hongo en la boca.

f) Garantía de recibir respuesta a cada pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios, y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto

Este informe de consentimiento puede contener palabras que yo no entiendo, por lo que puedo preguntar al médico que tiene la obligación de aclarar mis dudas respecto al estudio o explicarme cualquier palabra que no entienda.

g) Libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen perjuicios para continuar con su cuidado y tratamiento.

En cualquier momento y por cualquier razón puedo decirles a mis médicos que decido ya no entrar o continuar en el estudio; sin que se vea afectada la atención que recibo en el hospital, no pierdo ninguno de mis beneficios como paciente del hospital.

No es necesario que les diga a los médicos la razón por la que no quiero o decido salir del estudio, basta con decirles que no me interesa seguir participando.



Título: “Candidosis oral mixta en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2; Identificación y espectro de sensibilidad”

h) Seguridad de no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.

Las muestras se etiquetarán solo con mis iniciales para evitar que se conozca mi identidad, así como las fotografías que se tomarán serán sin poner mi cara, sólo del área de mi boca y únicamente serán vistas por los médicos que están haciendo este estudio.

i) Compromiso de proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar participando.

Tengo derecho a hacer cualquier pregunta sobre el estudio cuando no entienda algo, cuando quiera conocer información del proceso de análisis de muestra. Si no quiero hacer las preguntas ahora puedo volver después o puedo llamar a mis médicos si no puedo ir al hospital, al Dr. José Alejandro Bonifaz Trujillo al cel. 55 26-99 26-90 (las 24 horas) o a la Dra. Sandra Denise Fernández Samar al 8115007388

j) Disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a la que legalmente tendrá derecho, por parte de la institución de atención a la salud, en el caso de daños que la ameriten, directamente causadas por la investigación.

Si al momento de realizar el estudio, presentara alguna complicación ocasionada por el estudio, tendré derecho a recibir el tratamiento indicado y la indemnización que me corresponde por esta complicación.

k) Si existen gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

Si hubiera gastos derivados de realizar el estudio, como complicaciones al momento de la toma de muestra, no se me pedirá que yo los pague.

l) Indicar nombres, firmas, dirección de dos testigos y su relación con el sujeto de la investigación.

Testigo 1 (Nombre) _____ Fecha _____
Dirección _____
Relación con el paciente _____
Firma _____

Testigo 2
(Nombre) _____ Fecha _____
Dirección _____
Relación con el paciente _____
Firma _____



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Título: “Candidosis oral mixta en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2; Identificación y espectro de sensibilidad”

- m) Deberá ser firmado por el sujeto de investigación o su representante legal, en su caso, si el sujeto de investigación no supiera firmar, imprimirá su huella digital y otra persona que él designe firmará por él.**

Firmo este papel ya que entendí de que trata el estudio, como me van a tomar la muestra y no tengo dudas. Los médicos ya dieron respuesta a todas mis preguntas y resolvieron mis dudas, aun si después de firmar tengo dudas, los médicos tienen la obligación de contestarlas.

Ni los médicos ni el Hospital me van a pagar por participar en el estudio, ya que participo de manera voluntaria. Las consultas y tratamientos que no sean parte del estudio, debo pagarlas yo como normalmente lo hago.

Nombre del paciente _____

Firma _____

Representante legal _____

Firma _____

Fecha _____

- n) Nombre y teléfono a la que el sujeto de investigación podrá dirigirse en caso de duda.**

Si tengo dudas o preguntas sobre mis derechos como paciente de investigación, puedo llamar a la Dra. María del Carmen Dubón Peniche, que es la presidenta del Comité de Ética al teléfono 2789-2000 extensión 1164 o asistir directamente al Comité de Ética en Investigación del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en calle Dr. Balmis 148, Col. Doctores, Ciudad de México.

También si tengo algún problema o duda con el estudio, debo llama al Dr. José Alejandro Bonifaz Trujillo al tel. 5761-3923 (las 24 horas) o a la Dra. Sandra Denise Fernández Samar al 8115007388

- o) Referencia para atención medica apropiada**

En caso de requerir atención medica debo acudir al servicio de Dermatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” de lunes a viernes de 8 a 16 horas o al servicio de Urgencias de este mismo hospital disponible las 24 horas.

Ccp Laboratorio de Micología. Unidad 109 Dermatología

13.2 Hoja de recolección de datos

“CANDIDOSIS ORAL MIXTA EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2; IDENTIFICACIÓN Y ESPECTRO DE SENSIBILIDAD”

No.ficha: _____ Iniciales de paciente: _____ Fecha: ____/____/201__

Número de expediente: _____ Edad _____ (años). Sexo: 1) F ____; 2) M ____

TIPO DE PACIENTE: _____ Hospitalizado _____ No hospitalizado

Tiempo de diagnóstico de Diabetes Mellitus: _____ (años) _____ (meses)

Antecedentes familiares de diabetes: 0) Ninguno__ 1) Padre__ 2) Madre__ 3) Ambos__ 4) Otro__

HAS: ____ SI ____ NO

Otras enfermedades asociadas: _____

MARCADORES DE CONTROL METABÓLICO

Peso _____ (Kg); Talla _____ (cm); IMC _____ (kg/m²) CINTURA: ____ (cm)

Presión arterial: ____/____ (mmHg) Glucosa: _____ (mg/dL)

HbA1C %: _____ Creatinina: _____ COT: _____

TGL: _____ HDL: _____ LDL: _____

TRATAMIENTO:

0: sin tratamiento _____

1: Metformina _____

2: Metformina+ glibenclamida _____

3: iDPP IV _____

4: iSGLT _____

5: Insulina humana _____

6: Análogo de insulina _____

7: Insulina+ ADO _____

8: Terapia dual ADO _____

9: Terapia dual ADO+ insulina _____ Dosis _____

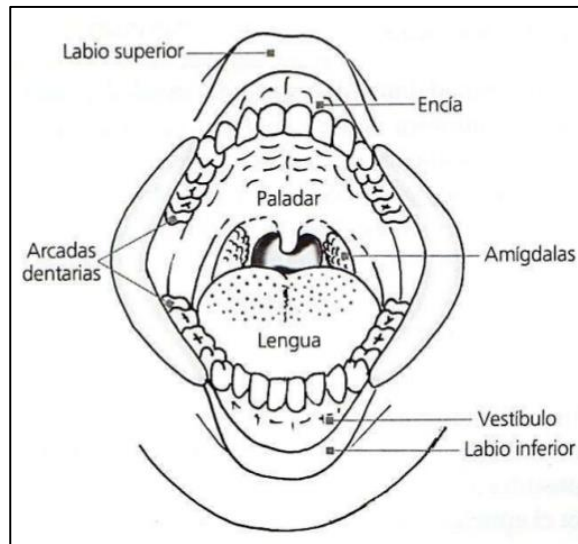
CANDIDOSIS ORAL:

Presencia de estructuras micóticas: _____ SI _____ NO

Tiempo de evolución: _____ (semanas) _____ (días)

LOCALIZACIÓN DE CO:

VARIEDAD CLÍNICA PRESENTE EN EL PACIENTE	
CO Aguda Seudomembranosa (COAS)	
CO Aguda Atrófica (COAA)	
CO Crónica Hiperplásica (COCH)	
CO Crónica Queilitis Angular (COCQA)	
CO Estomatitis subplaca (COES)	



RESULTADOS

Examen directo:	
Tipificación de especies de <i>Candida</i> spp.	
Espectro de sensibilidad:	

XIV.-REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología médica básica. (6a. ed.). México: McGraw-Hill;2020 (en prensa)
2. Aguirre Urizar JM. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol.2002;19(1): 17-21
3. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. PLoS Pathog. 2010; 6(1): 713-722
4. Araiza J, Contreras-García S, Magallón-Zazueta L, Sierra-Garduño M. y col. Candidosis oral mixta en pacientes con VIH/SIDA. Identificación y espectro de sensibilidad. Dermatol Rev Mex.2018; 62(3):206-215
5. Akpan Morgan R. Oral Candidiasis. Postgrad Med J.2002;78(1):455–459
6. Deorukhkar SC, Roushani S. Identification of *Candida* Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis. Ann Microbiol Immunol. 2018;1 (1):1002-1010
7. Romero-Luévano AG, Araiza-Santibáñez J, Hernández MA, Cerón-Araiza M. y col. Candidosis mixtas en aislados clínicos de pacientes procedentes del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga; identificación e importancia. Dermatol Rev Mex. 2014; 58(1):239-246
8. Sandoval Aguilar N. et al. Determinación de *Candida* sp. DermatologíaCMQ. 2005; 3(4): 322-324
9. Alfonso C. et al. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar. Rev Iberoam Micol. 2010; 27(2):90–93
10. Sahand IH, Maza JL, Eraso E, Montejó M, Aguirre JM, Quindos G. et al. Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity. J Med Microbiol. 2009; 58(1):1437–1442
11. Arenas R. Micología médica ilustrada. (4ta.ed.). México: Mc Graw Hill; 2014
12. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infecciones en humanos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017; 30(1):33–39
13. Morris-Jones R, Gómez B, Diez S, Uran M, Morris-Jones S, Casadevall A, Nosanchuk J, Hamilton J. Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans in vitro* and during infection. Infection and immunity. 2005; 73(9): 6147-6150
14. Suárez B, Álvarez MI, de Bernal M, Collazos A. *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. Colomb Med. 2013; 44(1): 26-30

15. Mohammadi F, Javaheri MR, Nekoeian S, Dehghan P. Identification of *Candida* species in the oral cavity of diabetic patients. *Curr Med Mycol*. 2016; 2(2): 1-7
16. Castrillón RL, Palma RA, Padilla DC. Reacción inmunológica en infecciones por *Candida* sp. *Dermatología Rev Mex*. 2004; 48(3):140-50
17. Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Desgarenes-Padilla C. Factores de virulencia en *Candida* spp. *Dermatología Rev Mex*. 2005; 49(1):12-27
18. Richardson JP. et al. *Candida* innate immunity at the mucosa. *Semin Cell Dev Biol*. 2018; 3(1):24-31
19. Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence*. 2012; 1(1):1-6
20. Canela HMS, Cardoso B, Vitali LH, Coelho HC, Martínez R, Ferreira MES. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*. 2017; 00:1-11
21. Favero D, Furlaneto-Maia L, França EJ, Góes HP, Furlaneto MC. Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. *Curr Microbiol*. 2014; 68(1):161-166
22. Calderone AR, Fonzi AW. Virulence factors of *C. albicans*. *Trends Microbiol*. 2001; 9(1):327-335
23. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang S, Hube B, Naglik. Candidalysin is a fungal peptidotoxin critical for mucosal infection, *Nature*. 2016; 532(1): 64–68
24. Brand A, Gow NAR. Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12(4):350-357
25. Ranjan A, Dongari-Bagtzoglou A. Tipping the balance: *C. albicans* adaptation in polymicrobial environments. *J fungi*. 2018; 4(1): 112-118
26. Xu H, Sobue T, Thompson A, Xie Z, Poon K, Ricker A, Cervantes J, Diaz PI, Dongari-Bagtzoglou A. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell. Microbiol*. 2014; 16(1): 214–231
27. Nasution O, Srinivasa K, Kim M, Kim YJ, Kim W, Jeong W, Choi W. Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2008; 7(1): 2008–2011
28. Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio*. 2011; 2(1): 1-7

29. Lambooi JM, Hoogenkamp MA, Brandt BW, Janus MM, Krom BP. Fungal mitochondrial oxygen consumption induces the growth of strict anaerobic bacteria. *Fungal Genet Biol.* 2017;109(1): 1–6
30. Marx-Sánchez M, Fernández-Cuevas L, Alcalá-Pérez D, Tercero-Quintanilla G, Esquivel-Pedraza L. Prevalencia de alteraciones bucales en el Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua. *Dermatol Rev Mex.* 2017; 61(2):87-97
31. Darwazeh AMG, Lamey P-J, Samaranayake LP, Macfarlane TW, Fisher BM, Maccuish AC. The relationship between colonisation, secretor status and in-vitro adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from diabetics. *J Med Microbiol.* 1990; 33(1):43-49
32. Poirier C, Cliimenos E, Ferrer M, López J, Caballero R. Importancia de los factores predisponentes en la candidiasis bucal. *Medicina Oral.* 1997; 2(1): 21-29
33. García Mateos MM. et al. Manifestaciones orales como primer signo de diabetes mellitus. *SEMERGEN.* 2004; 30(4):169-174
34. Jaimes Aveldañez A. y col. Portadores de *Candida* en la mucosa oral: tipificación de 35 cepas con CHROMagar *Candida*. *Med Int Mex.* 2008; 24(4):262-266
35. Meira HC, De Oliveira BM, Pereira IF, Naves MD, Mesquita RA, Santos VR. Oral candidiasis: A retrospective study of 276 Brazilian patients. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2017; 21(1):351-355
36. Center of Control Disease. CDC. 2018; [Consultado: 22/01/2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/>
37. Beiro–Fuentes R, Vidal-García I, Vidal-García MC, Orgeira Padin J. Factores predisponentes sistémicos de la candidosis oral. *Medicina General.* 2002; 41(1): 121-125
38. Sanhueza L, Concha L, Durruty P, García de los Ríos M. Alteraciones hematológicas en la Diabetes Mellitus. *Rev Chil Endocrinol Diabetes.* 2014; 7(4):137-142
39. A-Maskari AY, Al Maskari MY, Al-Sudairy S. Oral manifestations and complications of diabetes mellitus: A review. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2011; 11(2): 179-186
40. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet Med.* 2011; 23(1):455-459
41. Sandoval Aguilar N, Arenas R, Fernández R, Moncada D, Arroyo S, Prado Ferrer N, Fabián San Miguel G. Determinación de *Candida* sp en la orofaringe de pacientes con

- diabetes mellitus tipo 1. Identificación mediante métodos colorimétricos rápidos (CROMagar y Vitek). *DermatologíaCMQ*. 2005; 3(4):322-324
42. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gómez de Ferraris ME, Peydró A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11(1): 309-314
43. Javed F, Klingspor L, Sundin U, Altamash M, Klinge B, Engström PE. Periodontal conditions oral *Candida albicans* and salivary proteins in type 2 diabetic subjects with emphasis on gender. *BMC Oral Health*. 2009; 9(1):12-22
44. Palle, Holmstrup & Tony, Axéll. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections, *Acta Odontologica Scandinavica*. 1990; 48(1):57-59
45. Madhu P. Oral candidiasis. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*. 2013; 2(1): 03-06
46. Wolff Fitzpatrick's. *Color Atlas and Synopsis of Clinical Dermatology*. (7 ed.). UK: McGraw-Hill; 2013
47. Goldsmith LA, Fitzpatrick TB. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill Professional; 2012
48. Ibáñez Mancera NG, Robles Bonilla C, Lecona Ayala J. Frecuencia de candidiasis oral asociada al uso de prótesis dentales en pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad Anáhuac Norte. *Revista ADM*. 2017; 74 (2): 74-78
49. Millsop JW, Fazel N. Oral Candidosis. *Clinics in Dermatology*. 2016; 2(1):33-45
50. Neville Brad W. *Oral and Maxillofacial Pathology*. (4a. ed.). USA: Elsevier; 2016
51. Organización Mundial de la Salud. OMS. Diabetes. 2018; [Consultado: 21/03/2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
52. Infectious Diseases Society of America. IDSA. Diabetes. 2019; [Consultado: 20/04/2019]. Disponible en: <https://www.idsociety.org/search-results?query=diabetes>
53. Dartevelle P, Ehlinger C, Zaet A, Boehler C, Rabineau M, Westermann B, Marban C. *D-Cateslytin*: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections. *Nature*. 2018; 8(1):34-39
54. Bremenkamp RM, Caris AR, Jorge AOC, Back-Brito GN, Mota AJ, Balducci I, Brighenti FL, Koga-Ito CY. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. Oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Elsevier*. 2010; 56(1) :549-555
55. International Diabetes Federation. IDF. *Diabetes Atlas*. (8th ed.). USA:IDF; 2017
56. Fox SI. *Fisiología Humana*. (12ª ed.). New York: Mc Graw Hill; 2011

57. American Diabetes Association. ADA. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*. 2019;42 (Suppl. 1): S13-S28
58. Guzmán- Flores, JM., López-Briones, S. (2012). Células de la inmunidad innata y adaptativa en la diabetes mellitas tipo 2 y obesidad. *Gaceta médica de México*; 148(1):381-389
59. Manfredi, M., McCullough, MJ., Polonelli, L., Conti, S., Al-Karaawi, ZM., Vescovi, P., et al. (2006). In vitro antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*; 21(1):177–82
60. Dalmas E. (2019). Role of innate immune cells in metabolism: from physiology to type 2 diabetes. *Semin Immunopathol*; 1(1):1-15
61. Shiny, A., Bibin, YS., Shanthirani, CS., Regin, BS., Anjana, RM., Balasubramanyam, M. et al. (2014). Association of Neutrophil-Lymphocyte Ratio with Glucose Intolerance: An Indicator of Systemic Inflammation in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Technol Ther*; 23(4): 103-111
62. Arrieta, F. et. al. (2014). Metabolic control and chronic complications during a 3-year follow-up period in a cohort of type 2 diabetic patients attended in primary care in the Community of Madrid (Spain). *Endocrinología y Nutrición*; 61(1): 11–17.
63. Figueroa-Suárez ME. et al. (2014). Estilo de vida y control metabólico en diabéticos del programa DiabetIMSS. *Gaceta Médica de México*; 150(1):29-34
64. Al-Maskari A. et. al. Oral manifestations and complications of Diabetes Mellitus: A review. *Sultan Qaboos Univ Med J*.2011;11(2):179-186
65. Estrada-Barraza D. et. al. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar *Candida*® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislados clínicos. *Rev Iberoam Micol*. 2011; 28(1):36–42
66. Ghelardi E. et. al. Efficacy of Chromogenic *Candida* Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 141–147
67. Alfonso C, López M, Arechavala A, Perrone MC, Guelfand L. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar *Rev Iberoam Micol*. 2010; 27(2): 90-93
68. Odds F. et. al. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for the presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*.1994; 32(1): 1923-1929

69. Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Rodríguez C, Zayas Y, Rodríguez R. Identification of *Candida* species of clinical importance by means of a modified auxonographic method. *Rev Cubana Med Trop.* 2010; 62(1):48-57
70. BIO-RAD Laboratories. BIO-RAD. AUXACOLOR™ 2 56513 colorimetric sugar assimilation test for identification of the main yeasts of medical interest. 2013; [Consultado: 03/04/2019]. Disponible en: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/56513_880050_ES.pdf
71. Gutiérrez-Martínez MJ, Araiza-Santibáñez J, Hernández MA, Chávez-Mayol JM, Rodríguez-Piñeyro OM, Bonifaz A. Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. *Dermatol Rev Mex.* 2012; 56(2):93-101
72. López-Ávila K. et. al. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomed.* 2016; 27(1): 127-136
73. Pfaller MA. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine.* 2012; 125(1): S3–S13
74. Vanden H. Mechanims of Antifungal Resistance. *Rev Iberoam Micol.* 1997; 14(1):44-49
75. Nett J, Andes D. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin N Am.* 2016; 30(1): 51–83
76. Golás M. et. al. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* species--one year observation. *Pol J Microbiol.* 2014; 63(2):217-222
77. McGinnis M R, Rinaldi M G. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. 4th ed. Baltimore Md: The Williams & Wilkins Co; 1996
78. Pinoncel y De Gante NA. Prevalencia de la resistencia a antifúngicos y de mutaciones en genes asociados en especies de *Candida* aisladas de pacientes ginecológicas. [Tesis de maestría]. Baja California: Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada; 2010
79. Díaz MC, Camponovo R, Araya I, Cerda A, Santander AM, Carrillo A. Identificación y sensibilidad antifúngica in vitro de *Candida* spp. de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. *Rev Esp Quimioter.* 2016; 29(3): 151-154
80. Ponton J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol.* 2018; 25(1): 78-82

81. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J* 2013;60(11): 67-77
82. Karabıçak N, Alem N. Antifungal susceptibility profiles of *Candida* species to triazole: application of new CLSI species-specific clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of antifungal resistance. *Mikrobiyol Bul.* 2016;50(1):122-132
83. Song YB, Kyu Suh M, Yim Ha G, Kim Heesoo. Antifungal susceptibility testing with Etest for *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis. *Ann Dermatol.* 2015; 27(6): 715-720
84. Martín E, Cantón E, Espinel A. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 16(1):20-30
85. Grenfell RC, da Silva Junior AR, Del Negro GMB, Munhoz RB, Gimenes VMF, Assis DM. Identification of *Candida haemulonii* Complex Species: Use of ClinProTools™ to Overcome Limitations of the Bruker Biotyper™, VITEK MSTM IVD, and VITEK MSTM RUO Databases. *Front Microbiol.* 2016; 7(1):56-66
86. Ben-Ami R. et al. Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. *Emerging Infectious Diseases.* 2017; 23(2):23-31
87. Sharma J, Rosiana S, Razzaq I. Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in *Candida* pathogens. *J. Fungi.*2019;5(17):1-28
88. Mathur P. Five-year profile of candidemia at an Indian Trauma Center: high rates of *Candida auris* blood stream infections. *Mycoses.* 2018; 18(2): 45-49
89. Kumar A, Sachu A, Mohan K, Vinod V, Dinesh K. Simple low cost differentiation of *Candida auris* from *Candida haemulonii* complex using CHROMagar Candida medium supplement with Pal's medium. *Rev Iberoam Micol.* 2017;34(2):109–111
90. Aguilar-Barojas S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco.* 2005; 11(2): 333-338
91. Hernández Solís, S.E. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidosis oral y sujetos sanos. *Rev Iberoam Micol.* 2014; 31(2):137-140
92. Osuna M, Rivera MC, Bocanegra CJ, Lancheros A, Tovar H, Hernández JA, Alba M. Caracterización de la Diabetes Mellitus tipo 2 y el control metabólico en el paciente hospitalizado. *Acta Med Colomb.*2014;39(4): 344-351

93. Fanello J, Bouchara P, Sauteron M. et. al. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *J Med Microbiol.* 2006; 55 (1): 223–228
94. Balan P, Castelino RL, Fazil Areekat, B.K. *Candida* Carriage Rate and Growth Characteristics of Saliva in Diabetes Mellitus Patients: A Case-Control Study. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospect.* 2015; 9(1): 274–279
95. Rodrigues C, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* sp. Infections in patients with Diabetes Mellitus. *J. Clin. Med.* 2019; 8(76):109-117
96. Rosa-García E, Miramontes-Zapata M, Sánchez-Vargas L, Mondragón Padilla A. Colonización e infección bucal por *Candida* sp. en pacientes diabéticos y no diabéticos con enfermedad renal crónica en diálisis. *Nefrología.* 2013;33(6):764-770
97. Zuzá-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Front. Microbiol.* 2017; 8(1927):01-25
98. Anuj Kumar (2018): A fungus among us: The emerging opportunistic pathogen *Candida tropicalis* and PKA signaling, Virulence, DOI: 10.1080/21505594.2018.1438026
99. Reyes-Montes MDR, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Frías-De León MG. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Rev Iberoam Micol.* 2017;34(4): 203-210
100. Emmanouil-Nikoloussi E, Kanellaki-Kyparissi M, Papavassiliou P, Koliakos K, Dermentzopoulou M, Foroglou C. *Hanseniaspora uvarum* the ultrastructural morphology of a rare ascomycete, isolated from oral thrush. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 1994; 37(1): 13-17
101. Martínez Machín G. et. al. Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidosis oral. *Rev Cubana Med Trop.* 1997; 49(3): 102-114
102. García-Martos P, Hernández Molina JM, Galán F, Ruíz-Henestrosa R, García-Agudo R. Isolation of *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) in humans. *Mycopathologia.* 1999; 144(1): 73-75
103. Jankowski M, Jagielski T, Misiak G, Czajkowski R. Hand dermatitis with *Hanseniaspora uvarum* as a plausible causative agent. *Postepy Dermatol Alergol.* 2018;35(6): 56-66

- 104.Sanita PV, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with Candida-associated denture stomatitis with or without diabetes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013; 116(1):562-569
- 105.Negri M, Henriques M, Svidzinski T, Rodrigues C, Oliveira R. Correlation between Etest®, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species From Infection and Colonization. J Clin Lab Anal. 2009; 23(1): 324-330
- 106.Pérez-Cárdenas JE, Hoyos Zuluaga AM, Cárdenas C. Sensibilidad antimicótica de diferentes especies de hongos aislados de pacientes con micosis ungueal en la ciudad de Manizales (Caldas, Colombia). Biosalud. 2013; 11(2): 26-39
- 107.Manzano-Gayosso P, Méndez Tovar LJ, Arenas R, Hernández-Hernández F, Millán-Chiu B, Torres-Rodríguez J. et. al. Levaduras causantes de onicomycosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. Rev Iberoam Micol. 2011;28(1): 32-35
- 108.Bremenkamp R. et. al. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. Elsevier.2011;56(1): 549-555
- 109.Lindberg E, Hammarström H, Ataollahy N, Kondori N. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeast isolated from the blood samples of patients with candidemia. Nature. 2019; 9(3838): 1-6