

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Enfermería (Medicina y Odontología) / Immunología, Mikrobiologia eta Parasitologia saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (Medikuntza eta Odontologia).

Colonización oral por *Candida* y su relación con la presencia de caries y/o enfermedad periodontal crónica en población adulta del País Vasco.

Tesis Doctoral

Janire De La Torre Pérez

Leioa, 2016

La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro.

El esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

Parece que por fin se termina esta larga etapa, y es que los cursos de doctorado comenzaron en 2009, y parece que esta tesis cuenta una gran parte de mi vida. La aventura empezó viendo a mi compañero Asier Eguia defender su tesis, que me metió el gusanillo dentro, si bien no me paré a pensar en ese momento todas las horas de trabajo que aquella lectura escondía. Así es que después de todo ese tiempo invertido es justo mirar hacia atrás y dar las gracias a todas esas personas que me han acompañado y ayudado por el camino.

Es difícil agradecer en una frase al Prof. Jose Manuel Aguirre todo su apoyo y ejemplo profesional en esta etapa. Él me animó y orientó desde el primer minuto, con una ilusión y paciencia propias de un padre. Y mi otro tutor, el Prof. Guillermo Quindós, que vino de la mano del primero, y que tantas cosas me ha enseñado. Gracias por tu disponibilidad, por todas las horas de despacho, planificación y ánimos. Gracias a ambos por hacer este trabajo posible, por comunicaros tan bien y formar tan buen tándem. Mi éxito es también vuestro.

Empezaré por acordarme de todas las personas del “labo”, que formaron parte del proyecto al principio. Por dejarme tanto hueco en la estufa y perdonarme todos los errores de novata. Gracias a Aketza, por sus divertidos post it y esos miles de tubos estériles a tiempo para las muestras, algún día publicaremos todos nuestros resultados de *Staphylococcus*. A Cristina, por todo lo que me ha enseñado y ayudado, por las fotos y las correcciones, porque eres un gran ejemplo. A Sandra, por su amistad y las largas conversaciones. A Ilargi, por toda la instrucción inicial, por tu alegría, tu cariño y por los años que nos quedan de ser amigas, y a nuestros niños, amigos. A Elena Eraso, que también me ha ayudado en todo lo que le he preguntado, por saber estar ahí. Al resto de personas con las que me he cruzado y compartido pipetas, cafés y pastas de cumpleaños en esa etapa: Arantxa, Inés, Marcelo...y a las chicas de la revista, Rocío y Carmen, que siempre son tan majas conmigo.

A Marilu, que ha sido mi amiga y ayudante dentro y fuera del laboratorio. Gracias por las PCR, por tantos artículos, por las traducciones y por ser tan buena gente.

A tod@s los que forman o han formado parte de la asignatura y del Máster de Medicina Bucal, por dejaros incordiar durante doscientos y pico pacientes para la recogida de muestras y por vuestra compañía en sesiones clínicas, congresos, simposios, cenas y despacho. Entre ellos, y espero no dejarme a nadie, Bego Martinez, Carol Saiz, Alvaro

Peñaranda, M^a Carmen Gonzalez, María Prieto, Zummary, Javier Alberdi, Irania Sanchez, Rafa Martinez Conde, Jose Lopez Vicente, Asier Eguía, Andoni de Juan, Agurne Uribarri y en especial a Marian Echevarría, por su eficiencia en la uni, por ayudarme y comprenderme tanto.

A los del "labo" de Medicina Bucal, a Natalia Rey, que me demostró que algún día terminaríamos y a Amaia Setién, siempre dispuesta a contestar. A Ameli, por la estadística. Y cómo no a Xabier Marichalar, porque siempre estás dispuesto con una sonrisa, porque me ayudas con mi ineptitud estadística e informática y porque eres un gran amigo y mejor persona.

A mis amigas de la uni, Nagore y Miren que también empezaron en esto de la investigación conmigo. A Elena Ruiz de Gopegui, por las fotos y a toda la gente maja de "perio" por apoyarme. A Eneritz Bilbao, por compartir risas en la desesperación.

Es justo dar las gracias a todas esas personas que trabajan en la uni y hacen posible el desarrollo de nuestros estudios, la gente de esterilización, de recepción, las secretarias, el director de la clínica y cómo no a tod@s es@s pacientes voluntarios que me han cedido sus muestras y sus firmas.

Ajenos a la universidad, quiero agradecer a mis amigas, todas esas horas de comprensión y compañía en estos años. Por ayudarme a levantarme cada vez que me he caído. A Iñigo, por sus frases y apoyo.

A mis compañer@s de trabajo en la consulta, por escucharme y aguantarme.

Y por supuesto, a mi familia. A mis padres, por toda su paciencia, su trabajo, su hombro incondicional y por haber hecho posible que llegue hasta aquí. En breve comprobaré en mis propias carnes cuánto sacrificio os ha costado. A mi hermana, por ser la mejor amiga, hermana y compañera, por estar ahí siempre.

A Xabi, que aunque has llegado al final, has aguantado como un campeón esta fase tan dura con emoción hasta el final. Gracias por tu paciencia y por hacerme lo que será el mejor regalo y casualidad de nuestras vidas.

Eskerrik asko guztioi!

A quien nunca imaginé que iba a dedicarle la tesis,

A Kemen

Lista de abreviaturas

ABC: *ATP-Binding Casette*

ADA: *American Dental Association*

ALS: *Agglutinin Like Sequence*

AMB: AMB

CAL: clinical attachment loss

CAMBRA: *Caries Management By Risk Assessment*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI: concentración mínima inhibitoria

EP: enfermedad periodontal

EPC: enfermedad periodontal crónica

EUCAST: *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAO: *Food and Agriculture Organization* - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FLZ: fluconazol

GPP: gingival paper point

GWAS: *Genome-Wide Association Study* – estudios de asociación del genoma completo

ITZ: itraconazol

MCP: moderate chronic periodontitis- enfermedad periodontal crónica moderada

MCZ: miconazol

MFS: *Major Facilitators Superfamily*

MTPS: *Multitag Pyrosequencing*

NYS: nistatina

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: oral rinse- enjuague oral

PIP: pérdida de inserción periodontal

PSZ: posaconazol

RT-PCR: *Real time polimerase chain reaction* - reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SAP: *Secreted Aspartil Proteinase*

SCP: severe chronic periodontitis- enfermedad periodontal crónica grave

VRZ: voriconazol

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Hipótesis.....	5
1.2 Objetivos.....	5
2. Antecedentes.....	7
2.1 Salud oral y <i>Candida</i>	9
2.2 Caries.....	12
2.2.1 Etiología.....	12
2.2.1.1 Factores del hospedador.....	13
2.2.1.2 Bacterias.....	13
2.2.1.3 Dieta.....	14
2.2.1.4 Susceptibilidad genética.....	15
2.2.2 Epidemiología.....	15
2.2.3 Clasificación.....	16
2.2.3.1 Clínico-histológica.....	16
2.2.3.2 Anatómica.....	17
2.2.3.3 Evolutiva.....	17
2.2.4 Aspectos clínicos.....	18
2.2.5 Aspectos diagnósticos.....	19
2.2.5.1 Diagnóstico de la lesión de caries.....	19
2.2.5.2 Evaluación del riesgo de caries.....	22
2.2.6 Tratamiento.....	23
2.2.6.1 Estrategias para la prevención de la caries dental.....	23
2.2.6.1.1 Dietéticos.....	23
2.2.6.1.2 Higiénicos.....	23
2.2.6.1.3 Modificación de la estructura dental.....	24
2.2.6.2 Tratamiento de la lesión de caries.....	25
2.2.7 Perspectivas futuras.....	28
2.2.7.1 En el diagnóstico.....	28
2.2.7.2 En el tratamiento.....	28
2.2.7.3 En la inmunización.....	28
2.2.7.4 En la regeneración con células madre.....	29
2.3 Enfermedad Periodontal Crónica (EPC).....	30

2.3.1	Etiología.....	30
2.3.1.1	Aspectos microbiológicos	30
2.3.1.1	Factores de riesgo y factores predisponentes	32
2.3.1.2	Cálculo.....	34
2.3.2	Epidemiología.....	34
2.3.3	Clasificación	35
2.3.4	Aspectos clínicos	36
2.3.5	Aspectos diagnósticos.....	37
2.3.5.1	Sondaje y periodontograma.....	37
2.3.5.2	Estudio radiográfico	38
2.3.5.3	Otros	38
2.3.5.4	Pronóstico	38
2.3.6	Tratamiento.....	40
2.3.6.1	Terapia inicial. Instrumentación subgingival y mantenimiento	40
2.3.6.2	Terapia correctora. Cirugía periodontal.....	42
2.3.6.3	Terapia de mantenimiento	43
2.3.7	Perspectivas futuras	43
2.3.7.1	Marcadores genéticos y cambios epigenéticos relacionados con el diagnóstico y pronóstico.....	43
2.3.7.2	Relacionadas con el tratamiento	44
2.4	<i>Candida</i> y cavidad oral	45
2.4.1	Género <i>Candida</i>	45
2.4.2	Etiopatogenia	46
2.4.3	Factores de virulencia.	46
2.4.3.1	Adhesión.....	46
2.4.3.2	Mecanismos de evasión de las defensas del hospedador.....	47
2.4.3.3	Invasión y destrucción de los tejidos.....	47
2.4.3.4	Formación de biopelículas.....	48
2.4.4	Formas clínicas de candidiasis oral.....	49
2.4.4.1	Clasificación	50
2.4.4.2	Tratamiento.....	52
2.4.5	Fármacos antifúngicos	53
2.4.5.1	Polienos	54
2.4.5.2	Azoles	55

2.4.5.3	Fármacos análogos del ADN.....	58
2.4.5.4	Equinocandinas.....	58
2.4.6	Fallos terapéuticos y resistencias a los fármacos antifúngicos.....	58
2.4.6.1	Mecanismos de resistencia a los fármacos antifúngicos en la biopelícula.....	60
2.4.7	Metodología para el estudio de las resistencias.....	61
3.	Pacientes, material y métodos.....	65
3.1	Pacientes.....	67
3.2	Obtención de las muestras microbiológicas.....	70
3.3	Cultivo, aislamiento e identificación de <i>Candida</i>	71
3.4	Estudio <i>in vitro</i> de la sensibilidad a los fármacos antifúngicos.....	73
3.5	Análisis estadístico.....	76
3.6	Búsqueda bibliográfica.....	77
4.	Resultados.....	79
	-ESTUDIO 1-.....	83
	-ESTUDIO 2-.....	111
	-ESTUDIO 3-.....	139
5	Discusión.....	175
6	Conclusiones.....	193
7	Referencias bibliográficas.....	197

1. INTRODUCCIÓN

Candida es un colonizador habitual de la cavidad oral, lo que puede suponer un riesgo de diseminación sistémica e infección recurrente, especialmente en pacientes con deficiencias inmunológicas. Esta situación es cada vez más frecuente debido a diversas causas como la introducción de ciertos tratamientos médicos con antibióticos de amplio espectro y agentes inmunosupresores, la realización de trasplantes, la colocación de catéteres intravenosos, etc¹. El envejecimiento de la población que aún conserva sus dientes es una realidad creciente en nuestra sociedad, siendo este grupo etario el que mayor riesgo tiene de padecer inmunosupresión².

En la boca, *Candida* se aísla de las superficies mucosas y de la placa dental supra e infragingival en más de la mitad de los adultos³⁻⁵. La caries y la enfermedad periodontal crónica (EPC) son patologías íntimamente relacionadas con la presencia de la biopelícula dental o “placa dental” de la que *Candida* suele formar parte. Se ha relacionado *Candida* con la caries en niños y adolescentes y se ha descrito que podría ser sinérgica con otros microorganismos cariogénos⁶⁻¹¹. En la actualidad, mientras se observa una disminución en la prevalencia de la caries en niños, un alto porcentaje de los adultos sigue padeciendo esta enfermedad^{12,13}.

La enfermedad periodontal crónica se da sobre todo en pacientes adultos y algunos estudios^{14,15} han relacionado las formas más graves de esta enfermedad con la presencia de *Candida*, mientras que en otros estudios *in vitro* se han descrito relaciones de antagonismo entre este hongo y los principales periodontopatógenos^{16,17}.

El verdadero papel de *Candida* en estas enfermedades orales comunes es aún incierto, como también lo son los mecanismos que hacen que este hongo se transforme de comensal en patógeno¹⁸.

Existen un gran número de agentes antifúngicos para tratar las candidiasis, aunque se describen fracasos terapéuticos debido a resistencias a los mismos¹⁹. La presencia de biopelículas microbianas puede dificultar la penetración de los fármacos antifúngicos y disminuir su eficacia en las infecciones de la cavidad oral²⁰.

1.1 Hipótesis

Los pacientes adultos del País Vasco que padecen caries y/o enfermedad periodontal crónica presentarían un importante grado de colonización oral por levaduras del género *Candida* y esta colonización estaría relacionada con la gravedad de estas enfermedades.

1.2 Objetivos

El objetivo principal de este estudio es conocer las características epidemiológicas, microbiológicas y patogénicas de la colonización oral por *Candida* en pacientes adultos con caries y/o enfermedad periodontal crónica y su potencial relación con estas enfermedades.

Los objetivos específicos son:

- Conocer la frecuencia y las características epidemiológicas de la colonización oral por levaduras del género *Candida* en pacientes adultos con caries y/o enfermedad periodontal crónica.
- Caracterizar las diferentes cepas y especies de *Candida* aisladas en estos pacientes.
- Determinar la sensibilidad *in vitro*, a los fármacos antifúngicos más habituales, de los aislamientos orales de *Candida* de estos pacientes.
- Buscar relaciones entre la colonización por *Candida* y los datos clinicopatológicos de la caries y de la enfermedad periodontal crónica, presentes en estos pacientes.

2 ANTECEDENTES

2.1 Salud oral y *Candida*

Los efectos de las enfermedades bucodentales en los pacientes en términos de dolor, sufrimiento, deterioro funcional y disminución de la calidad de vida son considerables y costosos. Se estima que el tratamiento de estas enfermedades representa entre el 5 y el 10% del gasto sanitario de los países industrializados y supera los recursos de muchos países en desarrollo²¹. La salud oral es crucial para mantener una buena calidad de vida y para el bienestar general de la población²².

El vínculo entre las enfermedades bucales y la actividad de la microbiota oral está bien establecido²². En la cavidad oral conviven varias comunidades microbianas con importantes implicaciones tanto para la salud como para la enfermedad. De hecho, se considera que el microbioma oral es uno de los más complejos y diversos del ser humano, debido a la existencia de dos superficies funcionales únicas, los tejidos blandos que constituyen las mucosas y los duros, representados por los dientes, lo que condiciona microambientes ecológicos distintos^{23,24}.

Los análisis genómicos y los estudios de asociación del genoma completo (GWAS), bioquímicos (secretoma, metaboloma, etc.) y de imagen (microscopía a tiempo real) han acelerado el conocimiento de la microbiota oral^{23,25,26}. La composición bacteriana de la microbiota se conoce mejor que la población fúngica o vírica. Sin embargo, aunque los hongos representan una pequeña proporción de la microbiota oral, el conocimiento de su composición e identidad, podrían aclarar dudas etiológicas en algunas enfermedades bucales^{27,28}.

Los hongos, como *Candida*, son organismos que se encuentran presentes en todos los nichos naturales y algunos colonizan las mucosas del ser humano como comensales, sin consecuencias aparentes²⁵. Los estudios de Ghannoum *et al.*²⁹ sobre la caracterización

basal del microbioma indican que *Candida* puede estar presente en el 75% de los seres humanos y que todas las personas pueden estar colonizadas por este hongo en algún momento de su vida, siendo, aproximadamente un 40%, portadoras continuas.

Candida se considera un colonizador habitual de las superficies mucosas de la boca, pero también puede encontrarse adherida a los dientes y a las prótesis dentales³⁰. La presencia de *Candida* en la boca no implica que exista una enfermedad activa, dado que se encuentra en forma de comensal en las personas sanas y la colonización es asintomática, aunque si puede ser un patógeno oportunista cuando coexisten ciertos factores favorecedores locales y/o sistémicos³¹.

Los microorganismos orales en contacto con el diente y las mucosas se organizan en biofilms o biopelículas, también denominada “placa dental” en la cavidad oral, constituyendo comunidades microbianas bien estructuradas y únicas según el hospedador y su localización³². Entre las células residentes de la biopelícula se establece una comunicación molecular o *quorum sensing* que modula el comportamiento colectivo de las diferentes especies o incluso de los diferentes reinos que pueden convivir. Esta comunicación entre reinos se ha convertido en un campo de investigación muy interesante y ya se han establecido algunas de las señales que relacionan a *Candida* con ciertas bacterias en la cavidad oral^{23,28}. Se ha observado *in vivo*^{27,33} que aunque la carga bacteriana es superior a la fúngica en la boca, cuando aumenta la presencia oral de *Candida*, aumentan también algunas especies bacterianas. Además se ha observado que *Streptococcus* y *Candida* interactúan estableciendo una relación mutua potencial porque se incrementa la producción de exopolisacáridos³⁴.

En la actualidad, las infecciones fúngicas o micosis están aumentando porque la población de riesgo de padecer estas enfermedades (ancianos, pacientes con diabetes,

infectados por el VIH, trasplantados, en tratamiento con quimioterapia o con antimicrobianos de amplio espectro, etc....) está creciendo^{24,35}. La especie *Candida albicans* provoca la mayoría de las micosis orales y es además una causa frecuente de infecciones hospitalarias o nosocomiales con una alta mortalidad que puede superar el 50%²⁸. La mayoría de las infecciones graves por *Candida* parecen estar causadas por cepas colonizadoras, por lo que Nobbs *et al.*²⁸ señalan que una reducción en su carga podría reducir la incidencia de esta enfermedad grave.

2.2 Caries

La caries es una enfermedad conocida desde tiempos inmemoriales que sigue siendo muy prevalente a pesar de los esfuerzos realizados para su erradicación^{36,37}. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la caries como un proceso patológico local y de origen externo en un diente erupcionado, que ablanda los tejidos duros y que progresa hasta formar una cavidad³⁸.

2.2.1 Etiología

La caries es una enfermedad de etiología multifactorial en la que se produce una desmineralización de la estructura dentaria debido a los ácidos que forman los microorganismos de la placa dental al fermentar los carbohidratos de la dieta, particularmente la sacarosa³⁹. La desmineralización no es un proceso continuo y unidireccional, sino que es un proceso cíclico, al que acompañan también ciclos de remineralización⁴⁰. Existen varios determinantes etiológicos y factores asociados que interactúan entre ellos para establecer la enfermedad cariogénica³⁷ (Figura 1).

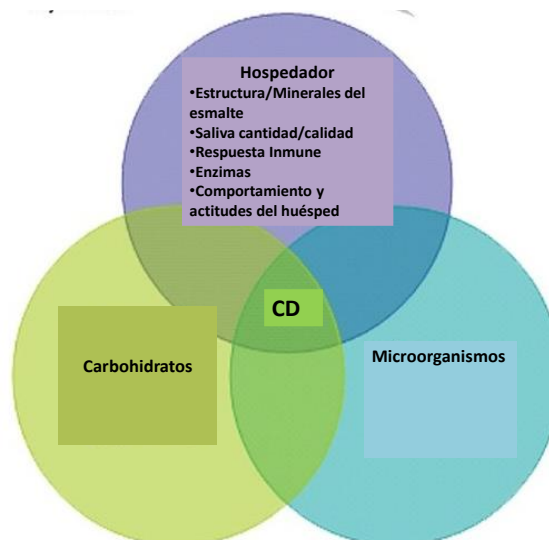


Figura 1: Factores etiológicos (modificado de Carounanidy J Conserv Dent 2009³⁷).

2.2.1.1 Factores del hospedador

El esmalte dental está compuesto sobre todo por hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y mantiene una proporción similar de fosfato, calcio y fósforo que la saliva, que es un fluido saturado, de forma que entre ambos existe un equilibrio dinámico de estos oligoelementos³⁷. Mientras el pH es neutro, los iones liberados por la subsuperficie del esmalte sobresaturan la saliva y vuelven a precipitar en el diente, pero cuando el pH es ácido los iones H^+ libres reaccionan con el fosfato salival que intenta neutralizarlos y la saliva se encuentra insaturada de iones, de forma que la subsuperficie del esmalte seguirá desmineralizándose mientras el pH sea menor de 5,5. Si el esmalte tiene flúor incorporado en forma de fluorapatita, mientras el pH no disminuya por debajo de 4, su superficie se mantiene intacta en las lesiones incipientes^{37,41}. El acceso de la saliva y su capacidad neutralizadora sobre el diente está disminuido en presencia de la placa dental adherida, una situación que propicia la disolución del esmalte subyacente⁴¹. La saliva contiene proteínas con actividad antimicrobiana, como la lisozima, la albúmina, o los anticuerpos IgA e IgG, que juegan un importante papel en el proceso de colonización y recolonización microbiana del diente, especialmente tras la higiene dental⁴². La cantidad y la calidad de la saliva, junto con los hábitos higiénicos son factores muy importantes en el desarrollo de la caries³⁷.

2.2.1.2 Bacterias

La formación de la placa dental comienza con la colonización de la superficie del diente por bacterias, como *Streptococcus*, que secretan una matriz extracelular de polisacáridos en la que se encuentran embebidas y que facilita su adhesión al diente⁴³. Durante la maduración de la placa, otras especies microbianas colonizan también el diente formando una biopelícula más organizada, con complicadas relaciones de sinergia y

antagonismo microbiano⁴⁴. Esta biopelícula les permite vivir en un equilibrio homeostático que puede ser alterado por los cambios microambientales. En la caries, la ingesta frecuente de sacarosa es el factor que provoca importantes cambios microambientales³⁷.

Streptococcus mutans ha sido una de las primeras especies relacionadas con la caries. Esta especie integra ocho serotipos diferentes⁴⁵. El microbioma asociado a la caries no se ha caracterizado por completo todavía, pero por métodos moleculares y genéticos se han identificado especies relacionadas con la caries que todavía no se han podido cultivar y que supondrían el 40% de las especies detectadas. Se ha establecido que *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Selenomonas* y *Streptococcus* son los géneros más representativos³⁹. También se ha encontrado una asociación de los géneros *Rothia*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Actinomyces*, *Haemophilus* y *Veillonella* con la caries⁴⁶. La microbiota de la caries es diferente y cambia según el sujeto, el lugar, el tipo y la profundidad de la lesión, ya que las biopelículas se adaptan a los diferentes microambientes^{44,46-48}. En general se considera que *Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus* son los microorganismos iniciadores de las caries coronal y radicular respectivamente y que los *Lactobacillus* son los responsables del progreso de la caries en la dentina⁴². Georgios *et al.*⁴⁹ han observado que las personas que padecen un mayor número de caries poseen una microbiota que con una velocidad aumentada en el catabolismo de los azúcares y en la producción de ácidos.

2.2.1.3 Dieta

La frecuente exposición oral a sacarosa es el factor más importante para mantener un descenso del pH en la superficie dental⁴². Por este motivo la OMS y la FAO recomiendan un consumo diario inferior a 15-20 kg por persona y año, o un 10% de la

energía extraída de carbohidratos libres⁵⁰. Existe una evidencia moderada de que una restricción aún mayor del consumo de este tipo de azúcares (5% de la energía) pueda redundar en un descenso más importante en la cantidad de caries⁵¹. Otro tipo de azúcares también pueden afectar al desarrollo de caries, especialmente cuando forman parte de alimentos líquidos o pegajosos⁴⁷.

2.2.1.4 Susceptibilidad genética

Se estima que la cariogenicidad es heredable en un 30-60%²⁶. Los genes y las interacciones epigenéticas con el medio ambiente, contribuyen junto con otros factores favorecedores también desconocidos, a la aparición la enfermedad⁵². Los avances biotecnológicos han posibilitado realizar estudios de asociación genética. Estos estudios catalogan las variantes genéticas específicas que contribuyen al riesgo de padecer caries y pueden permitir una mejor prevención, la detección temprana y el tratamiento precoz de la caries²⁶. Se han estudiado los genes implicados en procesos biológicamente conocidos^{26,52} como la formación del esmalte y de proteínas implicadas en la amelogénesis^{26,52-55}, los genes que afectan a la preferencia de algunos sabores⁵⁶, al desarrollo dentario^{54,57}, a los mecanismos de defensa del hospedador^{54,57-60} y a la composición de la saliva y el flujo salival⁶¹. Sin embargo, estos genes candidatos sólo explicarían una parte de la capacidad de heredar la tendencia a padecer caries dental²⁶.

2.2.2 Epidemiología

La caries dental afecta al 80% de la población general en muchos países¹², lo que la ha convertido en la enfermedad microbiana más prevalente, ya que afecta aproximadamente a unos 2430 millones de personas, por lo que representa un importante problema de salud pública^{2,47}. No afecta a todos por igual, de tal modo que la etnia⁶², el bajo nivel educativo y económico y el lugar de residencia (especialmente

las áreas rurales), son factores que influyen de forma significativa en el desarrollo de la caries⁶³. A este efecto se le denomina polarización de la enfermedad, es decir, que en un segmento limitado de la población se observa una gran presencia de la enfermedad⁴². En la mayoría de los países industrializados se ha observado un descenso en la prevalencia de la caries en los últimos años, sobre todo entre los niños¹², pero este descenso es menos acusado en los pacientes de mayor edad¹³. Además, cada vez hay más personas mayores que conservan sus dientes². En los ancianos, la modificación del flujo salival, el desgaste dental con exposición de la dentina, la enfermedad periodontal y el desarrollo de enfermedades sistémicas, favorecen la formación de la placa dental en las superficies radiculares que son especialmente susceptibles a la caries^{13,64,65}.

2.2.3 Clasificación

2.2.3.1 Clínico-histológica

Según el código ICDAS-II⁶⁶ (Figura 2) que realiza una clasificación basada en los cambios histológicos apreciables de forma visual en la superficie oclusal de un molar, la caries se clasifica en distintos estadios.

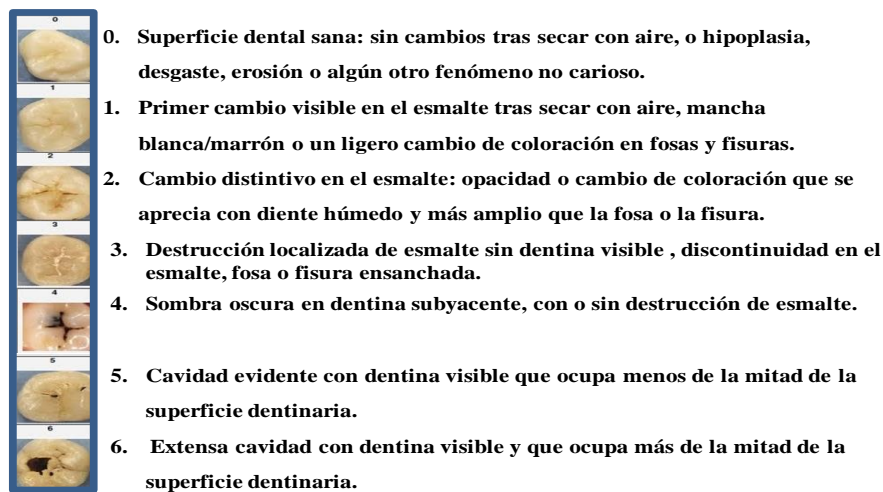


Figura 2: Clasificación histológica de la caries (modificado de Jenson⁴⁰⁴).

2.2.3.2 Anatómica

La clasificación coronal (Figura 3) se realiza según la localización de la lesión en la corona del diente, que recibe el nombre de su creador G.V. Black (1896)⁶⁷.

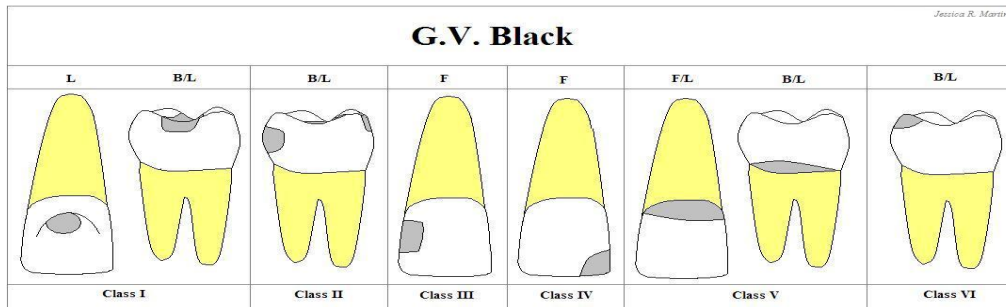


Figura 3: Clasificación anatómica de las caries coronal ⁴⁰³

La clasificación de la caries radicular (Tabla 1) se refiere a la clasificación anatómica e histológica de las lesiones radiculares⁶⁸.

Tabla 1: Clasificación anatómica e histológica de la caries radicular (modificado de Shivakumar⁶⁸).

E	La superficie radicular no se ve correctamente.
0	La superficie radicular no tiene cambio de color ni defectos de superficie, cemento intacto
1	Área claramente demarcada en la raíz o unión amelocementaria con cambio de coloración pero sin cavitación (<0,5mm), sólo afecta al cemento.
2	Área claramente demarcada en la raíz o unión amelocementaria con cambio de coloración y con una cavidad más profunda de 0,5mm. Afecta al cemento y a la dentina.

2.2.3.3 Evolutiva

La caries se clasifica según su evolución en el tiempo en:

- a) Activa: la superficie del esmalte está rugosa y tiene un aspecto blanquecino opaco. En una lesión de la dentina o del cemento cuando el tejido está blando y decolorado⁶⁹.
- b) No activa: las características de la superficie de la lesión cambian y esta se encuentra lisa y endurecida. Puede estar cavitada o no⁶⁹.
- Primaria/ Secundaria: si ocurre en una localización nueva o en una que había sido previamente tratada⁴².

2.2.4 Aspectos clínicos

La caries dental es un proceso patológico en general progresivo y lento⁴³, aunque depende de la localización y del individuo⁴². El comienzo de la desmineralización de la subsuperficie crea una mancha blanca en el esmalte y se considera que cuando esa lesión excede de los 3-5mm ya alcanza el borde amelodentinario¹³. Una vez alcanzada la dentina puede progresar más rápidamente ya que es un tejido menos mineralizado. En éste estadio se puede producir sensibilidad y dolor episódico, aunque el dolor es más frecuente cuando la lesión es más profunda y se aproxima a la pulpa⁴⁸. La dentina infectada es blanda y húmeda, pero la caries en la dentina también se puede frenar por remineralización, creando una dentina esclerótica oscura y dura, o por la formación de dentina secundaria y cálculos pulpaes. El éxito de estas respuestas depende de la gravedad del ataque de la caries y de la capacidad reactiva de la pulpa, mientras esta continúe vital. Si el proceso defensivo no tiene éxito o no se interviene a tiempo, se produce una infección, dolor, necrosis pulpar y formación de un absceso⁴² (Figura 4).

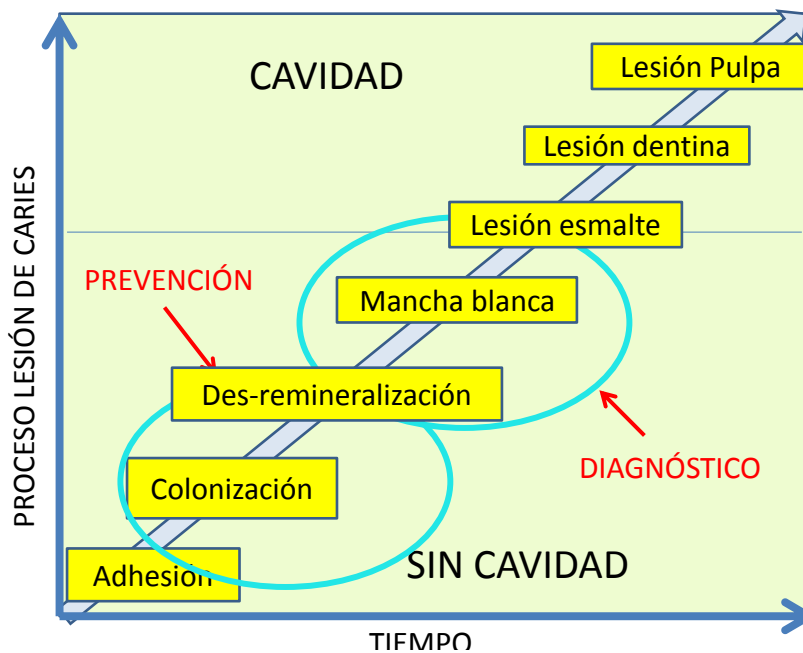


Figura 4: Evolución natural de la caries. Situación ideal de intervención.

2.2.5 Aspectos diagnósticos

Los objetivos primarios del diagnóstico de la caries son identificar a los pacientes con lesiones que requieren tratamiento restaurador, a aquellos con lesiones que requieren tratamiento no operatorio y a los pacientes con un alto riesgo de desarrollar caries⁴².

2.2.5.1 Diagnóstico de la lesión de caries

Durante años se han diagnosticado las caries siguiendo los parámetros de la definición de la OMS (caries = cavidad), pero la comunidad científica considera que el diagnóstico temprano puede ser más efectivo para el control de la enfermedad⁷⁰. Sin embargo, las lesiones más complicadas de diagnosticar son las incipientes o estadios 1, 2 y 3 de ICDAS (Figura 2), especialmente cuando se han empleado fluoruros de forma preventiva preventiva, ya que estos dejan una superficie externa dura y una capa subyacente de desmineralización^{71,72}. Su diagnóstico es interesante porque es el punto en el que la lesión se puede tratar de forma no operatoria. Se estima que el 34% de los pacientes tienen este tipo de lesiones y que sólo el 16% de ellas se cavitan en un período

de dos años⁷² (Figura 6). El diagnóstico de las caries es una ciencia inexacta y requiere varias pruebas diagnósticas a la vez:



Figura 5: Tinción de surcos y fisuras de un molar. Posible lesión incipiente

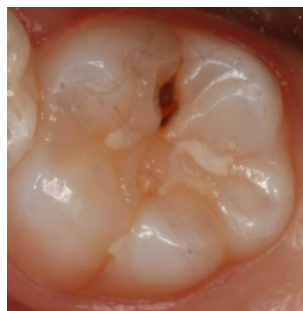


Figura 6: Lesión cavitada en superficie

2.2.5.1.1 Examen visual

Consiste en detectar los cambios en la textura o superficie dental con un espejo y sonda dental, aunque su empleo es controvertido por la posibilidad de traumatismo iatrogénico, en condiciones de buena iluminación y secado de las superficies^{42,73}. Puede ser incluso más exacto que el realizado con las últimas tecnologías si lo lleva a cabo un experto⁷⁴. También es útil el empleo de lentes de aumento⁷².

2.2.5.1.2 Examen radiográfico

Las radiografías de aleta de mordida son esenciales para el diagnóstico de las caries interproximales y de las lesiones precavitadas (Figura 7). Con la tecnología digital o la convencional, se considera que del 56 al 80% de las lesiones que se detectan no están aún cavitadas y por lo tanto se considera que es el patrón diagnóstico insustituible de este tipo de lesiones⁷⁴⁻⁷⁶. Pueden también emplearse técnicas radiográficas más avanzadas y precisas (tomografía) para la estimación de la profundidad de las lesiones interproximales⁷⁷.



Figura 7: Diagnóstico de lesiones interproximales incipientes y avanzadas no cavitadas mediante radiografía de aleta de mordida.

2.2.5.1.3 Técnicas complementarias para el diagnóstico

Suelen ser técnicas que presentan una alta sensibilidad pero de baja especificidad, por lo que no son las herramientas de primera elección para el diagnóstico de la caries, pero pueden resolver dudas y ayudar a monitorizar cambios en una lesión concreta⁴². Estas técnicas pueden clasificarse en:

- a) Interproximales: Transiluminación a través de fibra óptica para caries interproximales⁷⁰ y resonancia magnética⁷⁸.
- b) Oclusales: Láser de fluorescencia (DIAGNOdent® pen)^{71,79}, láser de diodo⁸⁰, medidas de impedancia eléctrica⁷¹, microtomografía computerizada⁸¹ y resonancia magnética⁷⁸.

Una vez descubiertos los primeros signos clínicos visibles, se debe hacer un diagnóstico de la extensión y gravedad de la lesión y saber si se trata de un proceso activo o no¹² (Figura 2). En general, se dispone de bastante tiempo desde que una lesión es incipiente hasta que progresa en la dentina, de modo que en ese período se pueden emplear las terapias preventivas o las restauradoras¹².

2.2.5.2 Evaluación del riesgo de caries

El análisis del riesgo de caries se puede realizar a modo de consejo informal al paciente o mediante tecnología informática, siendo los sistemas más conocidos el sistema CAMBRA^{70,82,83} y el Cariogram^{73,84}. Este tipo de asesoramiento ayuda a establecer la frecuencia de las visitas odontológicas de forma personalizada^{74,82}.

2.2.5.2.1 Historia del paciente, exploración física y evaluación radiológica

En la historia clínica del paciente se deben reflejar todos los datos incluyendo la edad, el sexo, la exposición al flúor, los hábitos nocivos, la dieta, el nivel socioeconómico, la higiene, el estado de salud general y los tratamientos farmacológicos que está recibiendo⁴².

2.2.5.2.2 Análisis salival

La determinación de las tasas de secreción salival y de la capacidad amortiguadora de la saliva son medidas interesantes, especialmente en los adultos, aunque sus resultados como predictores del riesgo de caries, no son concluyentes^{83,85}. Existen productos que hacen una evaluación colorimétrica en función del pH producido por el biofilm y que durante años ha sido empleado con éxito por los pediatras en Japón (Cariostat)⁷⁰. Finalmente, se emplean de modo orientativo los detectores rápidos semicuantitativos de *Streptococcus mutans* (Saliva-Check *Mutans* y Saliva- Check IgA *Mutans*) y *Lactobacillus* en saliva⁸⁴. Se considera que un paciente tiene un alto riesgo de desarrollar nuevas lesiones cavitadas si se encuentran⁴²:

A) Elevados recuentos de *Streptococcus mutans*: deben realizarse estas pruebas cuando el paciente tiene uno o más factores de riesgo en la historia clínica, cuando se ha

sometido a tratamiento antimicrobiano, cuando acude con nuevas lesiones incipientes, cuando está sometido a tratamiento ortodóncico o cuando el plan de tratamiento conlleva un extenso trabajo dental restaurador.

B) Dos de los siguientes factores: dos o más caries activas, numerosas restauraciones, malos hábitos dietéticos o un flujo salival bajo.

2.2.6 Tratamiento

La caries se trata con una combinación de terapias que promueven la remineralización de la lesión para detener su progreso si es posible y si no lo es mediante procedimientos de operatoria dental restauradora. Es probable que la restauración deba ser sustituida con el tiempo debido a lesiones secundarias o al fracaso restaurador¹². Las lesiones inactivas no deben tratarse si no existe compromiso funcional o estético⁴².

2.2.6.1 Estrategias para la prevención de la caries dental

2.2.6.1.1 Dietéticos

Se deben recomendar unos buenos hábitos alimenticios en cuanto a los horarios y al tipo de alimentos, introduciendo un alto contenido en vegetales en la dieta y reduciendo especialmente el consumo de sacarosa⁸⁶⁻⁸⁸.

2.2.6.1.2 Higiénicos

Se debe utilizar diariamente una pasta dental fluorada, al menos dos veces al día, de fluoruro de sodio o fluoruro de sodio con arginina⁸⁹. Los estudios^{64,90} demuestran que el empleo de pasta con una concentración de 5000 ppm de flúor en vez de la convencional de 1350 ppm, tiene efectos beneficiosos en la prevención de las caries radiculares ya que endurece la superficie del cemento. El cepillado debe complementarse con la

higiene interproximal con seda o cepillo interdental⁴² y puede acompañarse con un enjuague también fluorado⁷³.

2.2.6.1.3 Modificación de la estructura dental

Consiste en la aplicación de sustancias en la consulta o de forma doméstica que endurecen o remineralizan el diente. Las más eficaces son:

Fluoruro diamino de plata (SDF)

Los barnices de SDF consiguen detener el progreso de la caries aplicados cada 6-12 meses, aunque tienen el inconveniente de oscurecer la lesión, no siendo aptos para la estética pero si muy útiles para la prevención de caries radiculares y en pacientes con compromiso de su salud general^{64,74}.

Fluoruros

El flúor es uno de los factores más importantes en el descenso de los casos de caries en los países desarrollados⁴¹. Tiene tres mecanismos de acción: la incorporación de flúor a la hidroxiapatita formando fluorapatita, la disposición de cristales libres de fluoruro de calcio que participan en el intercambio iónico de la desmineralización ante la disminución del pH y un efecto antibacteriano inhibiendo la acción de las metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9) bacterianas y salivales. Este efecto ha sido demostrado *in vitro*⁹¹ aunque el mecanismo *in vivo* aún no está claro⁴¹. La exposición a fluoruros induce cambios epigenéticos en la producción de la matriz del esmalte⁵². Los barnices de Fluoruro de sodio a 22500 ppm aplicados profesionalmente cada tres meses, deben emplearse especialmente para prevenir las caries radiculares^{64,74}.

Compuestos no fluorados

La arginina en forma de bicarbonato, sola o en combinación con un dentífrico fluorado, es eficaz en la prevención de la caries e incluso en la remineralización de lesiones incipientes⁷³.

2.2.6.1.4 Antisépticos

Pueden emplearse iodo o clorhexidina en pacientes de alto riesgo, especialmente para prevenir las caries radiculares, tanto en enjuagues como en geles^{74,92,93}. Se han realizado muchos estudios clínicos con buenos resultados para evaluar la efectividad de algunos productos como el té verde⁹⁴, extractos de *Stevia rebaudiana*⁹⁵, quitosano⁹⁶, aceites esenciales⁹⁷, “Triphala” una mezcla de frutos usado en la medicina tradicional⁹⁸, granada, guayaba y flor de loto⁹⁹ en la prevención de la caries¹⁰⁰.

2.2.6.1.5 Estimulación del flujo salival

El xilitol se usa como terapia preventiva para la caries en niños¹⁰¹, aunque algunos estudios *in vivo* del metaboloma han demostrado que no es tan eficaz como se pensaba¹⁰² y los estudios clínicos ponen en duda su efectividad en la prevención de la caries en los adultos¹⁰³. No obstante se considera que es interesante como azúcar no fermentable para emplearlo en chicles en combinación con bicarbonato sódico o arginina y así estimular el flujo salival en algunos pacientes⁷⁴ y dentro de formulaciones mucoadhesivas con bicarbonato para reducir el pH¹⁰⁴.

2.2.6.2 Tratamiento de la lesión de caries

Las lesiones no cavitadas y las que están en el tercio más externo de la dentina pueden remineralizarse y no deben ser obturadas⁷⁴ (Figura 8). En 2002 la Federación Dental

Internacional (FDI) publicó un documento que defiende el tratamiento mínimamente invasivo de la caries¹⁰⁵.

2.2.6.2.1 Remineralización de lesiones incipientes

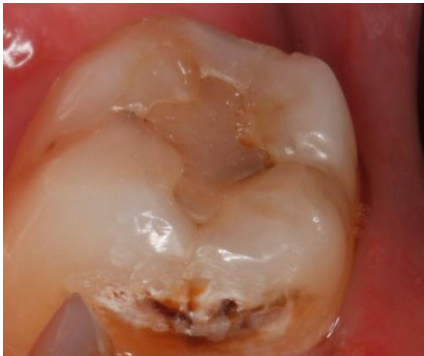


Figura 8: Lesión incipiente de caries o mancha blanca.

Los productos empleados para la remineralización pueden ser de aplicación profesional o de uso doméstico. Los de uso doméstico son los mismos que se emplean para la prevención de la caries: dentífricos, geles o colutorios fluorados así como los péptidos bioactivos derivados de la caseína de la leche en formato de crema denominado CPP-ACP (fosfopéptido de la caseína más fosfato de calcio amorfo)¹⁰⁶.

En la consulta pueden también aplicarse barnices de flúor, selladores de resina o de ionómeros de vidrio tanto en lesiones oclusales, radiculares como interproximales y los novedosos biopolímeros, como el monómero de baja viscosidad P₁₁₋₄, que remineralizan la subsuperficie del esmalte¹⁰⁷. Los selladores pueden formar parte también de la terapia preventiva y aplicarse preferentemente en los molares o premolares recién erupcionados en pacientes de riesgo⁷³.

2.2.6.2.2 Operatoria dental

Se recomienda obturar una caries oclusal a partir del grado 3 de la clasificación ICDAS II, en los pacientes de riesgo alto-muy alto⁶⁶. Las caries interproximales se obturan cuando radiográficamente se limitan al esmalte en los pacientes de alto riesgo y cuando

llegan a la dentina en el resto de pacientes⁸⁶. Las caries radicales se obturarán en el estadio grado dos de la clasificación de caries radicular⁶⁸.

2.2.6.2.2.1 Abordaje terapéutico

Se puede emplear instrumental rotatorio o tecnología láser Er:YAG, interesante sobre todo en pacientes con pánico al ruido o a las inyecciones¹⁰⁸.

a) Remoción de la lesión

Se puede realizar con instrumental rotatorio e instrumentos manuales, mediante ultrasonidos, mediante láser, por abrasión con aire, sonoabrasión (con o sin detectores químicos de caries)¹⁰⁹ y mediante productos químicos^{38,110}. El uso de material rotatorio es la técnica habitual y suele requerir anestesia local, por lo que con el objetivo de eliminar esta inconveniencia han surgido el resto de las opciones, con la desventaja de ser más lentas¹¹¹.

El esmalte afectado siempre debe eliminarse, y en cuanto a la dentina, la eliminación puede no ser completa con el objetivo de no producir daño pulpar (siempre y cuando el paciente no tuviera signos o síntomas previos a la intervención)¹¹²⁻¹¹⁴.

Existen tres métodos: la eliminación completa, la excavación por etapas (una sesión de remoción parcial con la colocación de un ionómero de vidrio y base cavitaria y una segunda intervención a los dos o tres meses para la remoción completa y la obturación definitiva)¹¹² y la eliminación parcial de la caries (con remoción parcial de la dentina)^{113,114}. Ningún estudio ha demostrado una efectividad mayor de ninguna de estas técnicas⁸⁷, aunque las técnicas de remoción parcial son más efectivas en cuanto a lo conservación de la vitalidad pulpar¹¹⁵.

b) Obturación

La elección del material depende en gran medida de las características físicas y las consideraciones estéticas. Se emplean selladores de fosas y fisuras para las pequeñas cavidades oclusales e interproximales si son accesibles, ionómeros de vidrio si nos interesa remineralizar la zona, no tiene carga funcional y la cavidad es muy pequeña, amalgamas en dientes posteriores, resinas compuestas o *composites* o restauraciones protésicas en grandes cavidades, etc⁴². El *composite* es el material más empleado y recomendado por la *American Dental Association* (ADA) en dientes anteriores y posteriores con restauraciones clase I y II⁴².

2.2.7 Perspectivas futuras

2.2.7.1 En el diagnóstico

Se podrán incorporar pruebas genéticas para la evaluación del riesgo de caries^{26,52} y pruebas salivales complementarias a este propósito^{116,117}.

2.2.7.2 En el tratamiento

Se están desarrollando nuevos compuestos antimicrobianos en colutorio¹¹⁸ y probióticos en tabletas (*Lactobacillus salivarius* WB21)¹¹⁹ o en leche en polvo (por ejemplo *Lactobacillus paracasei* SD1)^{120,121}.

2.2.7.3 En la inmunización

La vacuna contra la caries es un objetivo prioritario de estudio desde¹²², actualmente se investigan las vacunas para las mucosas, es decir que no solo estimulen la respuesta inmune sistémica sino que también induzcan una respuesta, sobre todo de anticuerpos como la IgA salival, en la mucosa¹²³. Con este propósito se están investigando *in vitro*

vacunas ADN que codifican genes de la adhesión y síntesis de glucanos de *Streptococcus mutans*¹²⁴ y la inmunización nasal con KF-rPAc (*Flagellin-PAc Surface adhesión protein*)¹²⁵.

2.2.7.4 En la regeneración con células madre

Se están analizando las células madre derivadas de la pulpa dental adulta tanto para inducir la regeneración dental como para una ingeniería tisular¹²⁶. Se trata de averiguar las diferencias entre las células madre derivadas de la pulpa dental adulta de los dientes sanos y las de los dientes con caries que tienen un mayor poder de proliferación y de diferenciación osteogénica que las primeras^{127,128}.

2.3 Enfermedad Periodontal Crónica (EPC)

La enfermedad periodontal consiste en una inflamación gingival en lugares donde ha habido un despegamiento de las fibras colágenas del ligamento periodontal del cemento radicular y el epitelio de unión ha migrado apicalmente. El proceso inflamatorio asociado al tejido conectivo se acompaña de la pérdida de inserción y la reabsorción del hueso alveolar¹²⁹.

2.3.1 Etiología

La EPC se inicia y se mantiene por la presencia de la placa microbiana, aunque los mecanismos de defensa del hospedador tienen un papel esencial en su patogenia y en la susceptibilidad intrínseca del paciente para esta enfermedad, de hecho sólo algunos pacientes presentan formas avanzadas¹³⁰. Se considera que los patógenos claves modelan la respuesta inmune de manera que el hospedador no consigue controlar el crecimiento de la placa, inclinando la balanza desde la homeostasis a la disbiosis. Entonces los microorganismos comensales tornan a patógenos y actúan sinérgicamente con los patógenos claves formando una comunidad proinflamatoria que termina produciendo la destrucción del tejido¹³¹.

2.3.1.1 Aspectos microbiológicos

Aproximadamente 500 especies bacterianas forman parte del biofilm dental, siendo el diente un sustrato permanente al que los microorganismos pueden estar constantemente adheridos formando la placa dental supragingival¹³². Su presencia constante estimula el exudado crevicular y, a medida que el surco gingival se va ensanchando, se liberan mediadores de la inflamación de forma que las condiciones ambientales del ecosistema varían y con ellas la composición microbiana va adaptándose al nicho periodontal y

desarrolla la placa subgingival⁴⁴. La asociación de estas bacterias no es aleatoria, se organizan para vivir en un equilibrio ecológico y la mayoría están implicadas en mantener la salud. Sin embargo, una minoría de estos, denominados microorganismos patógenos clave, produce enfermedad. Destacan especialmente tres bacterias anaerobias gram negativas a las que se denomina como *Red Complex* (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*)^{28,133} y la asociación microbiana llamada *Orange complex*, que incluye a las bacterias *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Streptococcus constellatus*. Estos microorganismos han sido aislados clásicamente de la placa subgingival como los principales periodontopatógenos en la EPC^{130,132,134}. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (previamente *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) es otro importante microorganismo periodontopatógeno que se asocia más frecuentemente con las periodontitis agresivas que a la EPC¹³⁰.

La detección de *Porphyromonas gingivalis* se relaciona con una evolución desfavorable de la enfermedad, ya que parece ser la responsable de la activación de la respuesta inmune que puede inducir pérdida ósea¹³⁵⁻¹³⁷. Las enzimas proteolíticas de su superficie celular y sus adhesinas son los principales factores de virulencia que pueden causar daño tisular directo. Además se ha observado una fuerte sinergia de *Porphyromonas gingivalis* con *Treponema denticola* en la formación y desarrollo *in vitro* de biopelículas polimicrobianas¹³⁸.

Los estudios sobre el microbioma de la bolsa periodontal muestran que alrededor del 60% de las especies detectadas no han sido cultivadas en el laboratorio²⁴. Hay varios

géneros desconocidos en las bolsas profundas¹³⁹ y nuevos taxones con un papel todavía desconocido en la etiopatogenia de la EPC¹⁴⁰.

2.3.1.1 Factores de riesgo y factores predisponentes

2.3.1.1.1 Edad

El cúmulo de los factores de riesgo como presencia de sarro, mayor cantidad de lugares con difícil acceso a la higiene, menor destreza, etc., con el paso de los años, es la causa principal de la mayor prevalencia de EPC en las personas mayores, más que el hecho de que la edad produzca la enfermedad¹³⁰.

2.3.1.1.2 Tabaquismo

Se estima que el riesgo de padecer EPC es de 2,5 a 7 veces mayor en un fumador que en un no fumador, además, la respuesta al tratamiento es peor en los fumadores¹³⁰. El tabaquismo enmascara algunos síntomas de la enfermedad, como los cambios de coloración en la encía o el sangrado al sondaje, y aumenta los niveles salivales de calcio, creando una mayor cantidad de sarro, disminuyendo la calidad de la higiene¹⁴¹ y alterando la ecología de la placa dental¹⁴⁰.

2.3.1.1.3 Factores relacionados con la respuesta inflamatoria del hospedador

Los procesos inflamatorio e inmune se originan en los tejidos gingivales para proteger al hospedador del ataque microbiano local, produciendo una respuesta que no es igual en todos los pacientes. Tras la colonización microbiana se produce un infiltrado de células inflamatorias en el epitelio de unión, una proliferación vascular y se liberan numerosas enzimas y citocinas (colagenasas y prostaglandinas), y se van perdiendo fibras de colágeno. El epitelio de unión va migrando hacia la zona apical aumentando el

tamaño de la bolsa donde siguen proliferando los microorganismos, las células y los mediadores inflamatorios hasta que la pérdida tisular termina activando los osteoclastos y afectando también al hueso alveolar¹³⁰ (Figura 9).

Algunos factores del huésped modulan esta respuesta:

a) Enfermedades sistémicas

Diferentes situaciones como la reducción del número o la alteración de la función de los leucocitos polimorfonucleares acelera y agrava la destrucción de los tejidos periodontales. La modificación de las hormonas circulantes en sangre que produce alteraciones inflamatorias, las terapias con fármacos inmunosupresores o cualquier enfermedad que produzca inmunosupresión (infección por el VIH, diabetes, etc.) pueden predisponer a la destrucción del periodonto¹³⁰. La diabetes, especialmente cuando no está bien controlada, se considera un factor predictor del desarrollo de EPC¹⁴². También se sugiere que las infecciones polimicrobianas pueden causar cambios vasculares e intestinales significativos¹⁴³⁻¹⁴⁵. Existen algunos estudios^{146,147} que relacionan la EP con la enfermedad cardiovascular y la regulación del perfil lipídico, la preeclampsia, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las neumonías y la artritis reumatoide. No obstante, son necesarios más estudios clínicos a largo plazo para determinar estas posibles causas^{148,149}.

b) Estrés

El estrés puede ser inmunosupresor y perturbar el equilibrio de la respuesta inflamatoria, el metabolismo lipídico y el de la glucosa¹³⁰. El cortisol y las catecolaminas se han empleado como marcadores del estrés¹⁵⁰, algunos estudios han establecido una relación significativa entre *Porphyromonas gingivalis* y las

concentraciones de cortisol en el suero de pacientes con EPC y con las de algunos marcadores de estrés oxidativo en sangre¹⁵⁰⁻¹⁵².

c) Genética

Existen evidencias sobre la existencia de una predisposición genética para la EPC, pero es imposible vincularla con un determinado gen. Se están intentando identificar los genes y los polimorfismos génicos asociados con la EP, para establecer el riesgo que tiene una persona de padecer la enfermedad y prevenirla o enfocar el tratamiento de una determinada forma. Se están empleando los GWAS en personas sanas y susceptibles, siendo los más estudiados *NIN*, *EMRI*, *KCNK1* y *DAB2IP*^{153,154}.

d) Otros factores

La presencia de placa microbiana o la deficiente higiene oral, la malposición dentaria e incluso pertenecer a sectores sociales de menor nivel educativo y económico son factores que también pueden influenciar en el desarrollo de la EPC¹⁵⁵.

2.3.1.2 Cálculo

El cálculo o sarro dental representa la placa bacteriana mineralizada (Figura 9-11). Se considera que el sarro es un factor etiológico secundario a la periodontitis, ya que dificulta la eliminación de la placa, por lo que debe ser eliminado como condición básica para lograr una acción terapéutica adecuada¹³⁰.

2.3.2 Epidemiología

La EPC presenta una alta prevalencia aunque los datos se ven muy influenciados por la metodología, la definición y los protocolos de estudio¹⁵⁶. Se estima que 400 millones de europeos padecen EP¹⁴⁰, y esta enfermedad está considerada como una de las

infecciones mundiales más prevalentes¹⁵⁷. En España, según la Encuesta de Salud Oral de 2005¹⁵⁸, el 25,9% de los adultos jóvenes de entre 35 y 44 años presentaban una pérdida de inserción periodontal (PIP: distancia entre la línea amelocementaria y el fondo del surco: recesión gingival + sondaje) leve-moderada y el 7,3 % grave, mientras que los adultos más mayores (65-74 años), un 40% tenían una PIP leve-moderada y un 31,5% grave.

2.3.3 Clasificación

En la tabla 2 aparece la Clasificación de las enfermedades periodontales de acuerdo con el *Workshop on the Classification of Periodontal Diseases*, 1999¹⁵⁹.

Tabla 2: Clasificación de las enfermedades periodontales, Armitage¹⁵⁹.

1. Enfermedades gingivales	Enfermedades periodontales
<ul style="list-style-type: none"> A) E. G inducidas por la placa dental <ul style="list-style-type: none"> • A1) Gingivitis asociada a placa dental • A2) E. G modificada por factores sistémicos • A3) E.G por fármacos • A4) E.G por malnutrición B) E. G no inducidas por placa <ul style="list-style-type: none"> • B1) E.G origen bacteriano específico • B2) E.G origen vírico • B3) E.G origen fúngico • B4) E.G origen genético • B5) Manifestaciones gingivales de origen sistémico • B6) E.G origen traumático • B7) Reacción a cuerpo extraño • B8) Otras 	<ul style="list-style-type: none"> 2. Enfermedad periodontal crónica <ul style="list-style-type: none"> • A) EPC localizada • B) EPC generalizada 3. Periodontitis agresiva <ul style="list-style-type: none"> • A)PA localizada • B)PA generalizada 4. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas <ul style="list-style-type: none"> • A) Origen hematológico • B) Origen genético 5. Enfermedad periodontal necrosante <ul style="list-style-type: none"> • A) Gingivitis ulcerativa necrotizante • B) Periodontitis ulcerativa necrotizante 6. Abscesos del periodonto <ul style="list-style-type: none"> • A) Gingival • B) Periodontal • C) Pericoronar 7. Periodontitis asociada con lesiones endodónticas 8. Deformidades y afecciones de desarrollo o adquiridas

Esta enfermedad, anteriormente conocida como periodontitis del adulto, pasó a denominarse enfermedad periodontal crónica desde el simposio realizado por la

American Society of Periodontology en 1999, ya que a pesar de ser más común en adultos, puede comenzar a cualquier edad. Los estudios de prevalencia demuestran que es la forma más común de periodontitis¹³⁰.

En la evaluación de la EPC se deben valorar la PIP, la profundidad de sondaje (distancia entre el margen gingival y el fondo del surco) y el sangrado al sondaje. En función de estas medidas se puede clasificar la EPC en tres estadios: Leve (PIP 1-2mm), Moderada (PIP de 3-4mm) y Grave (PIP de $\geq 5\text{mm}$)¹⁶⁰ (Figuras 9 y 10).

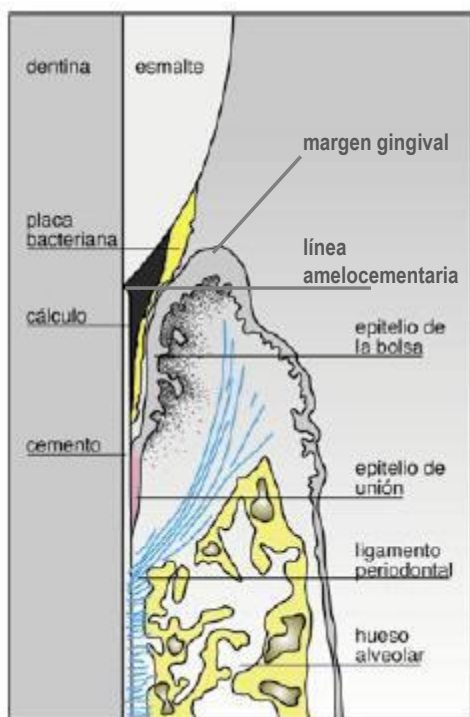


Figura 9: Anatomía de la bolsa periodontal. Modificado de Alpiste⁴⁰⁶.

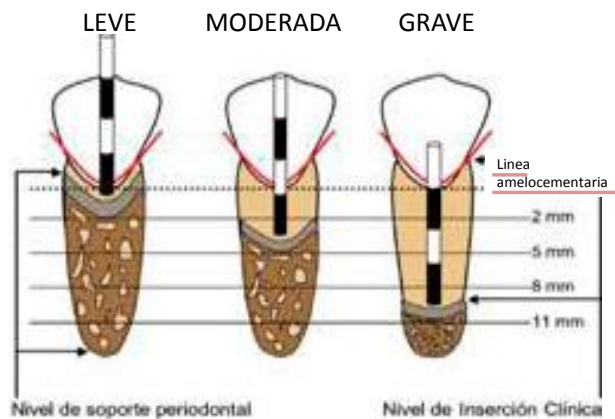


Figura 10: Esquema de las medidas de Pérdida de Inserción Periodontal (PIP) mediante sonda. Se considera la medida más fiable ya que tiene un punto fijo como referencia. Modificado de Smiley¹⁸³.

2.3.4 Aspectos clínicos

Las características clínicas de la Enfermedad Periodontal Crónica (EPC) son: inflamación gingival (alteración del color y textura), sangrado al sondaje y resistencia reducida de los tejidos al sondaje, pérdida de inserción y pérdida de hueso alveolar (Figura 11). Entre las características variables se incluyen la presencia de cálculo,

hipertrofia o retracción de encía, exposición de la furca radicular, aumento de la movilidad dental o desplazamiento y posible pérdida del diente¹³⁰.

La progresión de la enfermedad suele ser lenta aunque en cualquiera de sus estadios puede experimentar una exacerbación aguda^{130,161}.



Figura 11: Características clínicas y radiográficas de la EPC.

2.3.5 Aspectos diagnósticos

Se debe realizar una inspección clínica y radiográfica de la boca del paciente y un examen periodontal básico.

2.3.5.1 Sondaje y periodontograma.

Se realiza introduciendo una sonda periodontal fina graduada convencional o electrónica (Figura 10) en al menos dos lugares (mesiovestibular y distovestibular, por ejemplo) de cada diente y se va anotando (normalmente por cuadrantes o sextantes) los

puntos identificados de sangrado al sondaje, presencia de cálculo, profundidad de bolsa, recesión gingival, lesiones de furca y movilidad dentaria^{130,162}.

2.3.5.2 Estudio radiográfico

La radiografía de aleta de mordida o periapical (Figura 11) convencional o digital con control posicional, se sigue considerando un buen método diagnóstico para evaluar la pérdida ósea y las lesiones de furca¹⁶³. Otras técnicas radiográficas son la radiografía digital sustractiva que compara el nivel óseo entre distintas reevaluaciones del paciente y las técnicas radiográficas tridimensionales más precisas y caras como CBCT *Cone Beam Computerized Tomography*, QCT *Quantitative Computer Tomography*, STTACT *Spiral Tomography Tuned Aperture Computed Tomography*, CBVT *Cone Beam Volumetric Tomography*, MCT *Microfocus Computed Tomography*, OCT *Optical Coherence Tomography*¹⁶⁴. El análisis radiográfico ha de realizarse de forma periódica ya que es un método objetivo para evaluar la progresión de la enfermedad¹⁶⁵.

Existen otros métodos alternativos a la radiología para el diagnóstico por imagen de la EPC, como la ultrasonografía¹⁶⁶, aunque son más lentos y requieren un mayor entrenamiento.

2.3.5.3 Otros

También es importante evaluar el estado de las restauraciones dentales, el número de caries, los problemas endodónticos (lesiones periapicales, vitalidad dentaria) y los problemas oclusales.

2.3.5.4 Pronóstico

Tras el diagnóstico de EPC se debe trazar un plan de tratamiento inicial y, en función del resultado de éste, se sentarán las bases para la terapia final, que puede ser correctora

o de mantenimiento. A la hora de establecer la terapia de forma individualizada, son muy útiles las pruebas genéticas que determinan el riesgo relativo de desarrollar la EPC y/o el pronóstico de su progresión según la gravedad¹⁶². Existen modelos informáticos de asesoramiento del riesgo periodontal, programas en los que se introducen los datos relativos al paciente según el riesgo de padecer enfermedad periodontal o de agravarla, como por ejemplo el PRA model y el Miller Mc-entire score^{167,168}. Estos tests pueden ayudar también al clínico a la hora de tomar decisiones restauradoras¹⁶⁹.

2.3.5.4.1 Tests complementarios

Son otros análisis que nos ayudan a la selección de las medidas terapéuticas basándonos en la presunta evolución de las lesiones de EPC. Pueden ser:

1) Tests salivares

Estos nos indican el índice de secreción y la capacidad amortiguadora de la saliva del paciente¹³⁰.

2) Búsqueda de sustancias asociadas con patógenos putativos

Mediante el análisis de ADN, usando diversas técnicas de biología molecular como los microarrays, PCR convencional y a tiempo real e hibridación *in situ*^{134,170,171}. También puede realizarse la detección de perfiles antigénicos bacterianos^{170,172} y la evaluación de la actividad enzimática¹⁷³.

Nos aportan información sobre los microorganismos periodontopatógenos más relevantes y algunos sobre su concentración, para adjuntar un tratamiento extra en las localizaciones recalcitrantes o para tomar decisiones quirúrgicas, aunque no nos indican su sensibilidad a los antibióticos¹⁷⁰.

3) Detección de enzimas derivadas del huésped¹⁷⁴

4) Detección de productos de descomposición tisular

Los productos que se pueden detectar son los glucosaminoglucanos, algunas proteínas asociadas al metabolismo óseo y las metaloproteinasas¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

5) Detección de mediadores de la inflamación

Pueden ser útiles las pruebas que detecten prostaglandina E2, citoquinas, IL-1 β en saliva o en el líquido crevicular^{161,177,178}.

6) Desarrollo de anticuerpos monoclonales¹⁶¹

Lo interesante de estos tests complementarios es que sean rápidos, que la técnica sea sencilla (a poder ser empleando saliva) y sean tanto diagnósticos de la enfermedad como pronósticos en cuanto a su evolución¹⁶¹.

2.3.6 Tratamiento

El tratamiento constará de distintas fases.

2.3.6.1 Terapia inicial. Instrumentación subgingival y mantenimiento

En este momento también se deben corregir los factores adicionales retentivos de la placa como las caries, las obturaciones defectuosas y el trauma oclusal, entre otros¹³⁰.

2.3.6.1.1 Higiene personal y control de placa

Se debe llevar a cabo con un cepillo manual o eléctrico al menos dos veces al día. Para la higiene interdental pueden emplearse hilo o cinta dental y cepillos interdetales y

como recursos auxiliares se emplean también irrigadores dentales y raspadores linguales¹⁷⁹.

El dentífrico fluorado es muy efectivo para la prevención de la caries pero para la EP suelen emplearse pastas con agentes químicos, naturales (aceites esenciales, plantas naturales, etc....) o antibacterianos (clorhexidina, triclosán) y/o con formulaciones anticálculo (con pirofosfatos). El control químico de la placa es más práctico con dentífricos que contengan este tipo de agentes pero las formulaciones en colutorio pueden ser interesantes para algunos grupos minoritarios. El agente antimicrobiano más eficaz es la clorhexidina^{96,130,180}.

2.3.6.1.2 Tartrectomía y el raspado y alisado radicular (RAR)

Consiste en eliminar primero la placa y el sarro supragingival con ultrasonidos o curetas y después el subgingival, de la misma forma pero con la zona anestesiada. Luego se hace el alisado radicular con curetas normales o sónicas e instrumentos rotatorios o recíprocos que consiste en eliminar el cemento radicular reblandecido hasta encontrar una superficie dura. Lo más habitual es realizar este tratamiento por cuadrantes^{130,181,182} (Figura 12).

2.3.6.1.3 Terapias coadyuvantes al RAR

Existen múltiples terapias coadyuvantes al RAR con una significación y eficacia variables. En el metaanálisis de Smiley *et al.*¹⁸³ se indica que de todas las formulaciones actualmente aplicadas tras los raspados, sólo presentan una eficacia clínica certera las dosis sistémicas subterapéuticas de doxiciclina, los chips de clorhexidina y la terapia fotodinámica con láser de diodo. Estas aplicaciones tópicas pueden ser interesantes especialmente en las localizaciones refractarias al tratamiento. También los antibióticos sistémicos convencionales pueden ser efectivos para la mejora de la terapia pero deben

de ser empleados con cautela¹⁸⁴. Los probióticos parecen retardar la recolonización de las bolsas, empleados como adyuvantes al RAR¹⁸⁵. Se están testando fármacos para el colesterol¹⁸⁶ y para la artritis reumatoide¹⁸⁷ que podrían emplearse como coadyuvantes para tratar la EPC. La investigación también se centra en nuevos probióticos¹⁸⁸, productos naturales¹⁸⁹ y ciertos alimentos^{190,191}.

2.3.6.2 Terapia correctora. Cirugía periodontal

Se realiza entre uno y seis meses después de la terapia causal y sus objetivos son reducir la profundidad de la bolsa y remodelar la encía para dar accesibilidad a la higiene personal y a la terapia de mantenimiento, regenerar la inserción periodontal y facilitar una correcta terapia restauradora¹⁹².

2.3.6.2.1 Cirugía ósea y de la bolsa periodontal

La cirugía puede limitarse exclusivamente a la encía (gingivectomía, gingivoplastia, etc.) o abordar la bolsa periodontal supra o infraósea. Se instrumenta y acondiciona nuevamente la superficie radicular y en el mismo tiempo quirúrgico se realiza una remodelación ósea si es necesario. Las técnicas de osteoplastia y ostectomía sirven para dotar al periodonto de una anatomía propicia para la cicatrización y el recontorneo de los tejidos blandos^{130,193} (Figura 12).

2.3.6.2.2 Procedimientos regenerativos

Se emplean en periodontitis avanzadas cuando existen defectos intraóseos o de furca después del tratamiento básico. Se pueden emplear injertos de hueso¹⁹³, regeneración tisular guiada con membranas, reabsorbibles o no, con o sin material de injerto, con factores de crecimiento¹⁹⁴ o mediante productos regenerativos como las proteínas derivadas de la matriz del esmalte. Se está evaluando la utilidad de membranas o redes

bioactivas que directamente, sin material de injerto, sirvan para la regeneración tisular y ósea^{195,196}.



Figura 12: Tratamiento de fase correctora finalizado.

2.3.6.3 Terapia de mantenimiento

La terapia de mantenimiento va orientada a prevenir la recidiva de la enfermedad y se diseña en función de las características del paciente¹³⁰. El tratamiento consiste en un examen, reevaluación y diagnóstico nuevo, instrucción y reinstrumentación, tratamiento de los sitios re infectados si los hubiera, pulido dental y aplicación de fluoruros¹³⁰.

2.3.7 Perspectivas futuras

2.3.7.1 Marcadores genéticos y cambios epigenéticos relacionados con el diagnóstico y pronóstico

Se están investigando posibles moléculas diana en el biofilm bacteriano^{197,198}, en los mediadores inflamatorios¹⁹⁹⁻²⁰², en la regulación de la respuesta inmune²⁰³, en los factores de riesgo^{202,204} y en las proteínas salivales^{205,206}. Se han identificado el inflammasoma^{16,207} y el secretoma¹³² relacionados con la EPC.

2.3.7.2 Relacionadas con el tratamiento

Se cree que la administración de determinados microRNA puede llegar a ser un tratamiento prometedor en todo tipo de enfermedades inflamatorias que sea capaz de revolucionar la medicina individualizada²⁰⁸. De hecho la terapia epigenética ya se está probando *in vitro* con inhibidores de la histona deacetilasa que impiden la pérdida ósea en infecciones por *Porphyromonas gingivalis*²⁰².

2.3.7.3 En relación a la regeneración con células madre

Las células provenientes del ligamento periodontal y del folículo dental se postulan como una fuente para la regeneración periodontal. El periodonto también se puede regenerar de cultivos del periostio, de células madre mesenquimales de la médula ósea y de células madre derivadas de células adiposas^{126,202}.

2.4 *Candida* y cavidad oral

Candida es un patógeno oportunista de la cavidad oral que puede causar enfermedad en pacientes con una alteración local o sistémica favorecedora. La presencia de *Candida* no implica que exista enfermedad ya que es un comensal habitual que está presente hasta en el 60% de las personas sanas²⁰⁹⁻²¹³. No está claro el motivo por el cual unas personas están colonizadas por *Candida* y otras no²¹⁴, pero *Candida* es el hongo que más frecuentemente produce patología en la cavidad oral. Aproximadamente 17 especies del género *Candida* se han asociado con la colonización e infección en seres humanos. Estas infecciones pueden ser superficiales o bien sistémicas, poniendo así en riesgo la vida del hospedador. Estas situaciones se dan sobre todo en pacientes con deficiencias inmunológicas^{213,215}.

2.4.1 Género *Candida*

Los hongos son organismos eucariotas que viven como comensales o saprobios asociados a material en descomposición u otros organismos vivos. El reino *Fungi* se divide en dos subreinos, el de los hongos basales y el subreino *Dikarya*, este último agrupa las divisiones *Basidiomycota* y *Ascomycota*, a la cual pertenece el género *Candida* y la mayoría de los hongos patógenos²¹⁶. Todas las especies de este género se multiplican por gemación, son ovals o levaduriformes y pueden desarrollar diversas morfologías como blastoconidia o levaduras, pseudomicelio, micelio y clamidoconidia o clamidospora. La mayoría de las especies de *Candida* forman pseudohifas y *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* son capaces de formar tubos germinales, hifas y clamidoconidias²¹⁷. Existen evidencias que relacionan la virulencia de *Candida albicans* con la capacidad de transformarse de forma reversible entre los diferentes morfotipos para adaptarse al hospedador^{218,219}. *Candida albicans* es la especie fúngica que más

frecuentemente se aísla en la mayoría de los estudios epidemiológicos, pero otras especies de *Candida* como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis* se han aislado de la cavidad oral con distintas prevalencias según la localización geográfica de los estudios realizados^{213,220}.

2.4.2 Etiopatogenia

Candida requiere de un proceso de inmunodepresión del hospedador o una alteración de la microbiota debido a factores del medio ambiente y a unos factores específicos de virulencia para convertirse en patógeno^{209,221}. Hay pocas evidencias de que en un estado de salud normal, la microbiota oral comensal condicione el sobrecrecimiento de *Candida*¹⁸. Se desconocen los mecanismos básicos involucrados aunque se señala que la inmunidad del hospedador^{222,223} y la microbiota regulan el número de hongos presentes en las mucosas al inhibir su adherencia a las células^{224,225} y su crecimiento como blastoconidia²²⁶.

2.4.3 Factores de virulencia.

Candida posee varios factores de virulencia que favorecen la invasión de los tejidos de la cavidad oral y le permite evadir los mecanismos de defensa del hospedador. Entre ellos estarían la diversidad fenotípica-genotípica, la formación de hifas, la hidrofobicidad, la producción de exoenzimas, la coagregación sinérgica o competitiva con bacterias y su gran capacidad de adaptación al medio ambiente del hospedador²²⁷.

2.4.3.1 Adhesión

Es un proceso crucial ya que es el primer paso necesario para la colonización^{214,227} y para evitar que los microorganismos sean eliminados mediante el arrastre de la saliva o el cepillado²¹⁴. *Candida* se adhiere a múltiples ligandos como algunas moléculas de la

superficie de las células del huésped o bacterianas, proteínas de la matriz extracelular²²⁸, moléculas salivales o polímeros inertes (catéteres médicos, prótesis, etc...) mediante interacciones proteína-proteína, proteína-glicoproteína, iónicas o hidrófobas^{5,30}. Algunas adhesinas son inespecíficas y otras son específicas para un ligando particular³⁰. En *Candida albicans* se han identificado varias familias de genes que codifican estos receptores proteicos y están involucrados en la aglutinación (ALS) y la coagregación con bacterias²²⁹⁻²³².

2.4.3.2 Mecanismos de evasión de las defensas del hospedador

El polimorfismo es uno de los mecanismos más relevantes de *Candida albicans*²³¹ y la supresión genética de esta capacidad hace que una cepa se vuelva avirulenta²³³ y su estimulación que promueva un mayor potencial patógeno²³⁴. La capacidad para invadir tejidos en forma de hifa es mayor que en la fase levaduriforme²³⁵ y las hifas de *Candida* se adhieren más eficientemente y son más resistentes a la fagocitosis²³⁶.

El switching o cambio fenotípico es un cambio de la morfología de la colonia. Está desencadenado por diversos factores ambientales como la disponibilidad de oxígeno, de nutrientes, etc. y modula varios factores de virulencia²³⁷. Esta propiedad de *Candida* le permite una correcta adaptación a los diferentes micronichos orales⁵.

2.4.3.3 Invasión y destrucción de los tejidos

La secreción de enzimas hidrolíticas juega un papel importante en la adhesión, en la penetración, invasión y destrucción tisular²³⁸. Las más importantes son las proteinasas aspárticas (SAP) y las fosfolipasas²¹³. Las SAP son responsables de la actividad proteolítica de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida*

dublinsiensis, *Candida parapsilosis* y *Candida guilliermondii*²³⁹⁻²⁴³. La actividad de estas enzimas está directamente relacionada con el potencial patogénico de la levadura²⁴⁴. Estas proteasas actúan en un pH ácido, lo que las hace interesantes en el estudio de *Candida* y la cavidad oral²⁴⁵. Se sabe que el genoma de *Candida albicans* codifica 10 SAP^{246,247}, pero son la SAP-5²⁴⁸ y la SAP-1²⁴⁹ las que participan en la infección por *Candida albicans*.

Las fosfolipasas actúan rompiendo la membrana citoplasmática de las células hospedadoras y bacterianas y están relacionadas con la invasión tisular²⁵⁰ y la autodefensa del hongo²¹³. Su carencia o inhibición disminuye la virulencia de *Candida*, imposibilitando la formación de biopelículas^{251,252}. Aunque varias especies de *Candida* secretan estas enzimas, *Candida albicans* es la mayor productora^{246,253}. Existen siete tipos de fosfolipasas (A, B1, B2, C1, C2, D, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa transacilasa), con diferentes modos de acción y moléculas diana^{213,251,254}. *Candida* también produce otro tipo de enzimas como las hemolisinas, que podrían participar en el desarrollo de las candidiasis invasoras²⁵⁵.

2.4.3.4 Formación de biopelículas

Muchas de las infecciones causadas por *Candida albicans* están asociadas con la producción de biofilms, tanto en los tejidos como sobre dispositivos médicos u odontológicos, como las prótesis dentales^{256,257}. Los biofilms o biopelículas son comunidades celulares organizadas bajo el control de moléculas de señalización y embebidas en una matriz extracelular de ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos que ellas mismas producen²²⁵. Varias especies de *Candida* son capaces de formar biofilms aunque *Candida albicans* es la mayor productora^{258,259}. Las biopelículas pueden ser mono o polimicrobianas, como la placa dental, en la que los microorganismos

interaccionan entre ellos de diferentes formas (sinergia, antagonismo, etc.)^{34,260-263}. Los biofilms facilitan que los microorganismos evadan los mecanismos de defensa del huésped y resistan mejor el efecto de los fármacos antimicrobianos, aunque también pueden estar implicados en mantener la salud modulando el sistema inmune y previniendo la expansión de los microorganismos más patógenos²⁶⁴. Estas interacciones intermicrobianas y los factores reguladores del huésped (dieta, higiene, etc.) son un objetivo para los estudios que se desarrollan sobre el biofilm dental con las actuales técnicas moleculares^{24,43,265}.

2.4.4 Formas clínicas de candidiasis oral

La colonización de la piel y las membranas mucosas por *Candida* se consideran un importante factor de riesgo para desarrollar una infección por este hongo²⁶⁶. Las micosis se clasifican según su localización como superficiales, cutáneas o mucocutáneas, subcutáneas, y profundas o sistémicas²⁶⁷.

La candidiasis oral es la forma más frecuente de infección micótica superficial de la boca²⁶⁷. Se tienen que dar ciertos factores locales o sistémicos favorecedores para el desarrollo de una candidiasis oral. Los factores locales pueden ser la xerostomía, ser portador de prótesis dental removible, el uso de ciertos medicamentos tópicos como corticoides, el tabaco, alteraciones de la barrera mucosa o cambios en el epitelio oral, una pobre higiene oral y una dieta desequilibrada con una alta ingesta de carbohidratos y lácteos. Los factores sistémicos serían la edad, debido a un sistema inmune muy joven inmaduro o debilitado, la malnutrición o déficits vitamínicos, el uso de medicaciones inmunosupresoras o estados de inmunodeficiencia primarios o secundarios, desórdenes endocrinos como la diabetes, ciertas neoplasias y el uso de antibióticos de amplio espectro^{1,31}. La candidiasis oral se ha asociado con mayor frecuencia a las

edades extremas de la vida, aunque la infección por el VIH y el incremento de pacientes tratados con terapias inmunomoduladoras o antineoplásicas han incrementado su presencia en otros grupos etarios³¹.

2.4.4.1 Clasificación

La clasificación clínica de las candidiasis orales más frecuente es la realizada por Axell *et al.*²⁶⁸ y que se describe en la Tabla 3.

Tabla 3: Clasificación de las candidiasis orales (Modificado de Axell²⁶⁸).

Candidiasis Orales Primarias

- Aguda
 - Eritematosa
 - Pseudomembranosa
- Crónica
 - Eritematosa
 - Pseudomembranosa
 - Hiperplásica
 - Nodular
 - En forma de placa
- Lesiones asociadas a *Candida*
 - Queilitis angular
 - Estomatitis protética
 - Glositis rómbica
- Lesiones queratinizadas primarias infectadas por *Candida*
 - Leucoplasia
 - Liquen plano
 - Lupus eritematoso

Candididasis mucocutáneas

- Manifestaciones orales de candidiasis sistémica mucocutánea como resultado de enfermedades
 - Aplasia tímica
 - Candidiasis asociada a síndrome de endocrinopatía

La candidiasis por lo tanto se divide en dos amplias categorías, en primarias y mucocutáneas.

Candidiasis eritematosa (Aguda/Crónica)

Se presenta clínicamente como un área rojiza de bordes mal definidos que puede ser asintomática o producir escozor y que característicamente suele observarse sobre todo en el dorso lingual y en el paladar dando un aspecto “en espejo”³¹. En ocasiones las formas agudas se relacionan con el uso de antibióticos de amplio espectro y las formas crónicas suelen asociarse a inmunosupresión, incluyendo la infección por VIH¹.

Candidiasis pseudomembranosa (aguda y crónica)

También conocida como “muguet”, es más frecuente en la forma aguda y se caracteriza clínicamente por presentar unas placas blanco-amarillentas diseminadas por la mucosa oral que se desprenden al raspado dejando una superficie rojiza al descubierto^{1,31}. Las zonas más frecuentemente involucradas son la mucosa yugal o labial, los laterales de la lengua y la orofaringe, siendo en esta última en la que se produce una mayor sintomatología²⁶⁷.

Candidiasis hiperplásica

Esta forma clínica es controvertida y se presenta como una placa blanca homogénea o como nódulos que no se desprenden al raspado¹. Habitualmente aparece en la zona retrocomisural, en los laterales de la lengua y en el paladar. En estas lesiones *Candida* se encuentra invadiendo la superficie del epitelio, que en ocasiones presenta displasia epitelial^{31,267}.

Queilitis angular

Es la lesión asociada más común, que se caracteriza por un enrojecimiento (a menudo bilateral) de las comisuras labiales, y que aparece sobre todo en pacientes con déficits vitamínicos o de hierro, así como en pacientes edéntulos o con disminución de la

dimensión vertical y/o xerostomía²⁶⁷. En muchas ocasiones se reconoce una infección mixta con bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*³¹.

Estomatitis protética

Se trata de una lesión inflamatoria común asociada a *Candida* cuya extensión se limita a la zona de apoyo de una prótesis dental removible. Se clasifica en distintos estadios según su apariencia clínica en forma de enrojecimiento puntiforme, enrojecimiento masivo liso o con crecimiento hiperplásico³¹. Se trata de un proceso de etiología multifactorial en el que la infección por *Candida* puede estar involucrada, junto a otros factores como el trauma protésico, el uso continuado de las prótesis, la mala higiene, el tabaquismo, la hiposialia, etc.²⁶⁹

2.4.4.2 Tratamiento

El tratamiento de la candidiasis oral se basa en un correcto diagnóstico clínico y en la identificación y cuantificación de *Candida* en las lesiones²⁷⁰. En todos los casos se debe intentar identificar y corregir los factores predisponentes, así como indicar una correcta higiene oral y de las prótesis dentales¹. Finalmente, debe prescribirse una terapia antifúngica adecuada basada en la gravedad de la infección y en la sensibilidad *in vitro* de la especie de *Candida* prevalente si se conoce¹. Existen las guías de práctica clínica que indican las recomendaciones y la evidencia existente para el tratamiento de la candidiasis según la gravedad de la situación¹⁹. Por lo general, se inicia con un tratamiento tópico con nistatina o miconazol en los casos clínicamente sencillos como la candidiasis eritematosa o la queilitis comisural. En los casos más severos como la candidiasis pseudomembranosa en un paciente inmunodeprimido se añade una terapia sistémica vía oral con un azol como el fluconazol³¹.

2.4.5 Fármacos antifúngicos

El tratamiento de las candidiasis orales se basa en el uso de fármacos antifúngicos, sobre todo polienos y azoles, como la anfotericina B (AMB), la nistatina (NYS) o el miconazol (MCZ) en formulación tópica²⁷¹⁻²⁷³. En las situaciones más rebeldes y recalcitrantes, los azoles fluconazol (FLZ) e itraconazol (ITZ) administrados por vía oral son muy eficaces²⁷⁴⁻²⁷⁶. Algunas especies, como *Candida glabrata* y *Candida krusei* son más resistentes a los azoles, hecho que limita las posibilidades de éxito del tratamiento con estos fármacos²⁷⁷. En casos extremos y en las complicaciones esofágicas de las candidiasis orales, pueden utilizarse fármacos antifúngicos por vía intravenosa, como FLZ, voriconazol (VRZ) o posaconazol (PSZ), anidulafungina, caspofungina o micafungina (equinocandinas) o una formulación lipídica de AMB (polienos)^{250,278}.

Existen cuatro grupos principales de fármacos útiles en la terapia de las candidiasis que se clasifican de acuerdo a su modo de acción: mediante la unión al ergosterol y ruptura de la membrana celular fúngica (polienos), inhibición de la síntesis de ergosterol de la membrana citoplasmática (azoles), la inhibición de la síntesis de 1,3-β-D-glucano de la pared celular (equinocandinas), e inhibición o alteración de la síntesis de ácidos nucleicos (5-fluorocitosina) (Figura 12).

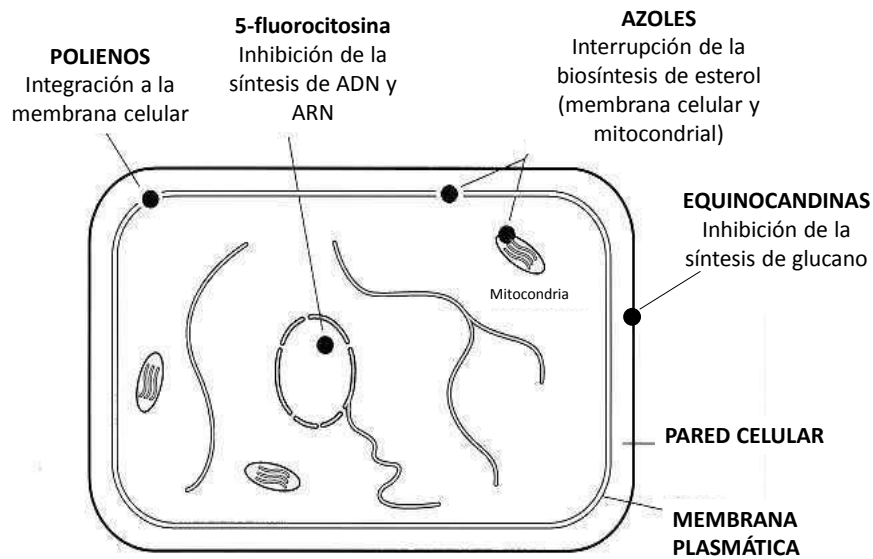


Figura 13: Lugares de acción de los fármacos en la célula fúngica. Modificado de Dixon y Walsh.⁴⁰⁵

2.4.5.1 Polienos

Son fármacos antibióticos que inhiben el crecimiento fúngico al unirse con el ergosterol de la membrana celular y alterar su estructura^{279,280}. La permeabilidad de la membrana celular se ve modificada y se pierde el contenido citoplasmático²⁸¹. Se incluyen en este grupo las diferentes formulaciones de la AMB y la NYS.

2.4.5.1.1 Anfotericina B

Ha sido el fármaco de elección para las micosis sistémicas por hongos dimorfos, hongos filamentosos y levaduras durante mucho tiempo, porque es un fungicida de amplio espectro muy efectivo²⁸¹. La AMB posee una acción contra los biofilms candidiásicos²¹³. Sin embargo, este fármaco presenta una alta nefrotoxicidad que es menor con el empleo de las formulaciones liposómicas²⁵⁷. La AMB está disponible en suspensión oral, cremas y ungüentos, pero su aplicación tópica no es muy habitual²⁸².

2.4.5.1.2 Nistatina

La NYS es el fármaco más empleado para el tratamiento de las candidiasis orales. Se utiliza de forma tópica ya que presenta una alta toxicidad en su uso sistémico²⁸³. Dependiendo de la concentración, la NYS es fungicida o fungistática²⁸². Se puede emplear en suspensión oral acuosa, liposómica^{283,284}, en nanopartículas²⁸⁵, en tabletas mucoadhesivas de liberación prolongada o en microesferas de alginato²⁸⁶. Además, se ha estudiado también incorporada en dentífricos²⁸⁷.

2.4.5.2 Azoles

Son el grupo de fármacos más amplio, actúan inhibiendo la síntesis de ergosterol que es el componente principal de la pared celular. Esta inhibición sucede por el bloqueo de una enzima asociada al citocromo P450-Erg11p²⁸¹. Los azoles son fungistáticos contra *Candida* y los hongos dimorfo, pero actúan como fungicidas contra *Cryptococcus neoformans*²⁷⁹. Los azoles se dividen en dos grupos: imidazoles y triazoles.

2.4.5.2.1 Imidazoles

Los imidazoles producen una toxicidad selectiva mediada por el citocromo P450 y su mecanismo de acción consiste en interferir con las enzimas oxidativas de la célula fúngica y así crear una acumulación letal de peróxido de hidrógeno²⁸². Los más importantes se describen a continuación, aunque también existen otros que se emplean de forma tópica para micosis superficiales como el fenticonazol, isoconazol, etoconazol, sulconazol y econazol²⁸⁸⁻²⁹⁰.

2.4.5.2.1.1 Clotrimazol

Es un fármaco muy empleado de forma tópica en EEUU y que está disponible en tabletas de liberación prolongada. También se está analizando una formulación en barniz^{291,292}.

2.4.5.2.1.2 Miconazol

Es un fármaco de amplio espectro que actúa contra *Candida* y *Staphylococcus*²⁸². Es eficaz para cualquier tipo de candidiasis aunque, dada su toxicidad, sólo se emplea tópicamente en forma de tabletas y geles²⁹¹. Se está estudiando su combinación con otros fármacos para potenciar su efecto²⁹³.

2.4.5.2.1.3 Ketoconazol

Es un fármaco de amplio espectro que se emplea de forma tópica, sobre todo en dermatología, ya que produce toxicidad cuando es empleado de manera sistémica y tiene interacciones con otros fármacos²⁹⁴. El ketoconazol fue uno de los primeros fármacos en mostrar resistencias²⁷⁹.

2.4.5.2.2 Triazoles

Los triazoles son fármacos más activos, con afinidad más específica en la diana que los anteriores, por lo que producen una menor toxicidad y menos efectos secundarios. Los más relevantes son y albaconazol, FLZ, ITZ, PSZ, ravuconazol y VRZ^{279,281,295}.

2.4.5.2.2.1 Itraconazol

El ITZ es un fármaco lipófilo de amplio espectro que puede administrarse por vía oral (solución oral y cápsulas) o intravenosa, siendo una buena alternativa para el tratamiento de las candidiasis causadas por cepas u especies resistentes al FLZ²⁷⁹

aunque se han descrito resistencias cruzadas con este fármaco²⁹⁶. El ITZ es eficaz y cómodo, dada su posología, para el tratamiento de las candidiasis superficiales²⁸⁸.

2.4.5.2.2.2 Fluconazol

El FLZ es un triazol soluble en agua que tiene una actividad fungistática y de amplio espectro, de forma que puede emplearse contra la mayoría de las cepas de *Candida albicans*²⁹⁷. El FLZ es menos activo contra otras especies del género *Candida*, como *Candida glabrata* y *Candida krusei*, a la que es intrínsecamente resistente²⁹⁸. Se puede administrar por vía oral e intravenosa y tiene pocos efectos secundarios. Por ello es el fármaco más empleado para el tratamiento de todo tipo de candidiasis, incluso para prevenir su desarrollo en pacientes con inmunodeficiencias^{297,299}. Los primeros casos de cepas de *Candida* resistentes al FLZ se describieron en los años 1980 en pacientes infectados por el VIH que padecían candidiasis pseudomembranosa^{209,279,299}.

2.4.5.2.2.3 Posaconazol

El PSZ es un triazol lipófilo de amplio espectro que posee una estructura similar al ITZ y es eficaz contra la mayoría de las especies fúngicas²⁸¹. Tiene un efecto fungistático contra *Candida* aunque su absorción por vía oral está limitada por la dosis, la formulación galénica y la ingesta de alimento³⁰⁰. Posee el mismo espectro que el FLZ y desarrolla menos resistencias que este, por lo que es una buena alternativa contra las especies diferentes de *Candida albicans*, especialmente para tratamientos prolongados^{298,301-303}.

2.4.5.2.2.4 Voriconazol

El VRZ es un triazol derivado del FLZ, pero con una mejor actividad *in vitro* contra especies resistentes a este y que además presenta un buen comportamiento en las candidiasis orofaríngeas³⁰⁴. Tiene un efecto fungicida contra hongos filamentosos y

fungistático contra las levaduras³⁰⁵, puede tener interacciones con otros fármacos y se han descrito resistencias cruzadas con el FLZ^{304,306}.

2.4.5.3 Fármacos análogos del ADN

Son compuestos que inhiben la síntesis del ADN y del ARN fúngico³⁰⁷. El fármaco representativo de este grupo es la 5-fluorocitosina o flucitosina, que es fungistático contra *Candida*²⁸⁸ pero que se puede emplear en combinación con otro fármaco antifúngico en el tratamiento de las candidiasis sistémicas, ya que debido a las resistencias que induce, su uso como monoterapia se ha restringido²⁷⁹.

2.4.5.4 Equinocandinas

Este grupo incluye a las últimas incorporaciones al tratamiento antifúngico y todas las especies de *Candida* son sensibles a estos fármacos, incluyendo todas las especies con resistencia a otros fármacos³⁰⁸. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de 1,3- β -D-glucano, componente principal de la pared fúngica^{309,310}. Los fármacos más representativos de este grupo son la anidulafungina, la caspofungina y la micafungina. Se emplean por vía intravenosa en las candidiasis orales refractarias y en las candidiasis invasoras^{293,311}. Además pueden emplearse también en terapia combinada con los azoles³⁰⁷.

2.4.6 Fallos terapéuticos y resistencias a los fármacos antifúngicos.

Las resistencias a los fármacos suponen en la actualidad un importante problema clínico³¹². La resistencia intrínseca se define como la resistencia de todos o casi todos los aislamientos de una especie a un fármaco determinado. La resistencia secundaria se adquiere por una exposición a los fármacos por diferentes mecanismos. Ambas

dependen del microorganismo y se pueden medir en el laboratorio²⁷⁹. En ocasiones se observa una resistencia a múltiples fármacos, a la que llamamos multiresistencia o resistencia cruzada, que es la más problemática³¹³. *Candida glabrata* es la especie que más frecuentemente desarrolla este tipo de resistencias³¹⁴. La resistencia intrínseca a los polienos no es frecuente, pero se ha observado en algunos aislamientos de *Candida lusitanae*, *Candida lipolytica* y *Candida guilliermondii*³¹⁵.

Las resistencias a la 5-fluorocitosina pueden ser también intrínsecas o adquiridas y se han observado en *Candida* y *Aspergillus*²⁷⁹. La resistencia a las equinocandinas en cepas susceptibles siempre es adquirida y se debe principalmente a cambios en la secuencia de aminoácidos de la enzima diana debido a una respuesta celular al estrés³¹⁴. La resistencia en los azoles está ampliamente documentada y puede ser debido a diversos mecanismos. La diana de estos fármacos es el citocromo P450, también llamado Erg11p porque está codificado por el gen *ERG11*²⁷⁹. Las primeras resistencias descritas fueron debidas a la exposición prolongada a MCZ y ketoconazol, aunque posteriormente se han ido describiendo paulatinamente también al FLZ²⁷⁹. Los mecanismos descritos son: a) alteración de los mecanismos de transporte del fármaco, b) alteraciones en la diana celular, c) alteraciones en la biosíntesis del ergosterol. Estos mecanismos se van implantando progresivamente en el hongo a medida que se expone al fármaco y pueden combinarse²⁷⁹. La resistencia de los azoles en varias especies de *Candida* está asociada con la sobre-expresión de proteínas de la membrana plasmática. Estas proteínas actúan como bombas de expulsión y eliminan el fármaco de la célula. Las dos principales bombas de eyección conocidas son las ABC (*ATP-binding cassette*) y la familia de los transportadores MFS (*Major Facilitators Superfamily*)²⁹⁵. Los genes *CDR1* y *CDR2* (*Candida Drug Resistance*) codifican los transportadores ABC, y también se conocen los efectos que su sub o sobre-expresión pueden tener en la

resistencia al fármaco, especialmente en la resistencia de *Candida albicans* a los azoles^{314,316}.

Se han descrito seis genes que se incluyen en la familia de los MFS³¹⁷. *MDR1* es el gen que parece estar sobre expresado en diferentes aislamientos clínicos resistentes³¹⁸. Lettner *et al.*³¹⁹ relacionan estos transportadores con las resistencias cruzadas a varios fármacos en *Candida albicans*.

Se considera que la resistencia debida a los transportadores ABC es más importante que la debida a los MFS³¹⁷. Las resistencias a los azoles también se relacionan con mutaciones del *ERG11*, gen que ha demostrado una altísima variabilidad en sus alelos, cada uno de ellos con diferente número de mutaciones^{279,301,320}. No obstante, también se han descrito mutaciones en otros genes involucrados en la biosíntesis del ergosterol³²¹⁻³²⁴.

2.4.6.1 Mecanismos de resistencia a los fármacos antifúngicos en la biopelícula

Muchas especies fúngicas son capaces de formar biofilms y una de las características de estos es su elevada resistencia a las terapias antimicrobianas²⁹³. Se ha señalado que esta resistencia es multifactorial y que va más allá de los mecanismos de resistencia que el hongo presenta en su forma planctónica³²⁵⁻³²⁷. La mayoría de los hongos en la cavidad oral se encuentran presentes en biofilms mixtos²⁷³, de manera que ofrecen resistencia a la remoción mecánica convencional de la saliva y del líquido crevicular, a la penetración de los fármacos antimicrobianos y a las propias células del sistema inmune^{4,327}. Los propios polisacáridos de la matriz extracelular podrían inhibir la difusión de los fármacos o unirse iónicamente a ellos, reduciendo así la biodisponibilidad de los mismos^{20,327}, además, la matriz extracelular de los biofilms

mixtos es más viscosa¹⁴. Se considera que las células residentes en el biofilm están más inactivas, con un metabolismo de perfil bajo, y que no son capaces de poner en marcha los mecanismos bioquímicos que los fármacos requieren para ejercer su efecto terapéutico³²⁷. Otra posibilidad es que los microorganismos residentes en el biofilm emitan señales internas que provoquen una sobre-expresión de los genes que regulan los mecanismos de resistencia³²⁷. Parece que la resistencia está gobernada por diferentes factores en función de la maduración del biofilm³²⁸.

2.4.7 Metodología para el estudio de las resistencias

Los estudios de sensibilidad *in vitro* a los fármacos antifúngicos se realizan para detectar las resistencias de los microorganismos y permiten establecer la sensibilidad de un aislamiento clínico a un determinado fármaco, facilitando así la elección del tratamiento adecuado a la que debe unirse la predicción de la respuesta más probable al fármaco³²⁹. A partir de estos métodos de estudio se puede cuantificar la actividad del fármaco, expresada como la concentración mínima de fármaco que inhibe el crecimiento del hongo o CMI.

Ha habido falta de consenso en los métodos de evaluación de las resistencias a los fármacos antifúngicos durante mucho tiempo. Finalmente el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) creó un subcomité para el estudio y estandarización de los métodos de determinación de la sensibilidad *in vitro* a los fármacos^{330,331}.

Con el fin de llegar a una mejor correlación *in vitro-in vivo*, se ha propuesto un método de dilución del fármaco en un medio líquido, tratando de establecer así una mayor semejanza con el entorno en el que debe actuar en el paciente. El método consiste en la cuantificación de la inhibición de crecimiento producida por el fármaco comparado con el crecimiento de la levadura en el mismo medio sin fármaco (control de crecimiento).

Las condiciones, el medio de cultivo, el pH, el tampón, el tamaño del inóculo, el tiempo y la temperatura de incubación deben ajustarse a lo recomendado en los documentos del CLSI, ya que cualquier cambio en estos parámetros puede afectar a los resultados. Por otro lado, debido al gran número de factores que pueden influir en la evolución clínica de una infección fúngica, una CMI baja no predice necesariamente el éxito terapéutico, mientras que una CMI alta o resistencia *in vitro* sí que indica una alta probabilidad de fracaso terapéutico³³².

Para el estudio a la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos en las levaduras del género *Candida* se utiliza el método descrito en el documento M27-A3 con el anexo S4 publicado por el CLSI^{330,331}. En este documento se incluyen los puntos de corte interpretativos para el FLZ, ITZ, VRZ, 5-fluorocitosina y las equinocandinas, lo que permite clasificar a las cepas en sensibles, resistentes, o sensibles-dependientes de la dosis. Recientemente se han propuesto modificaciones de los puntos de corte para las equinocandinas, FLZ, VRZ y PSZ específicos para algunas especies concretas de *Candida*^{312,333,334}. El *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST) también ha desarrollado una metodología estandarizada para estudiar la sensibilidad a los fármacos antifúngicos. Está basada en el documento M27-A con modificaciones que pretenden dar datos más objetivos respecto a los puntos de corte^{312,335-337}.

Según el CLSI, el medio de cultivo con la mejor concordancia intra y entre laboratorios, es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) 0,164M y ajustado a pH $7\pm 0,1$. El método de referencia EUCAST emplea el mismo medio, pero con una concentración final de glucosa al 2% y la lectura se realiza igualmente a las 24h. Estos métodos son bastante laboriosos y difíciles de adaptar a un laboratorio clínico³³⁸. Por este motivo han

surgido métodos comerciales que incluyen indicadores colorimétricos u otras ventajas que facilitan la lectura y favorecen su automatización. Los más destacados son Sensititre Yeast One (Trek Diagnostics Systems Ltd, England), ATB Fungus (bioMérieux France) o Etest (AB Biodisk, Sweden)³³⁹⁻³⁴².

3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.

3

3.1 Pacientes

Se ha realizado un estudio casos-control en 190 pacientes que acudieron al Servicio Clínica Odontológica de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). De estos pacientes 95 (50%) eran hombres y 95 eran mujeres, con una media de edad de 43,7 años, en un rango de 18 a 81 años (Tabla 4).

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica y una exploración bucodental por un único examinador. Se les realizó un examen estándar con espejo y sonda dentales y una exploración periodontal con una sonda periodontal graduada (PCP-UNC 15). Específicamente se recogieron los datos de los dientes con caries, obturados o ausentes y la profundidad de bolsa más alta de cuatro medidas de sondaje (mesial y distal por vestibular y por lingual) y la recesión gingival del diente referencia de cada sextante (excluyendo los cordales).

La muestra se dividió de acuerdo a la presencia y gravedad de la patología de caries y de la enfermedad periodontal crónica. Los datos principales se muestran en la Tabla 4 y en los artículos anexados.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación con Seres Humanos de la UPV/EHU (CEISH/23/2010) y todos los pacientes participantes firmaron el consentimiento informado.

Los criterios de inclusión fueron:

- A) Tener más de 18 años de edad en el momento del estudio.
- B) Tener un mínimo de 20 dientes en el momento del estudio.

Los criterios de exclusión del estudio fueron:

- A) Haber recibido fármacos antimicrobianos o terapias inmunosupresoras en el último mes antes de ser examinado.
- B) Presencia de signos de candidiasis oral o de lesiones en los tejidos blandos de la boca en el momento del estudio.
- C) Padecer una enfermedad crónica no controlada, como diabetes mellitus, hipotiroidismo, etc.
- D) Estar embarazada.
- E) Estar infectado por el VIH o presentar otro proceso asociado a déficit inmunológico.

Los pacientes fueron clasificados en dos grupos en relación con la patología cariogénica en base al índice propuesto por la OMS para la caries (índice CAO o suma de dientes careados, ausentes y obturados)^{2,158,343-346}.

Para analizar la enfermedad periodontal crónica se seleccionaron específicamente pacientes con 30 años o más^{140,347-349}. Los pacientes fueron clasificados en relación con la EPC en base al índice propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para clasificar la enfermedad periodontal (CPITN: índice comunitario de necesidad de tratamiento periodontal) y por la American Academy of Periodontology mediante la medición de la pérdida de inserción periodontal (PIP: distancia entre la línea amelocementaria y el fondo de la bolsa o la suma de la recesión gingival más la profundidad de sondaje)^{5,15,129,156,183}.

Los grupos en relación a la caries fueron (Tabla 4):

- **Grupo 0 o con bajo riesgo de caries**, que comprendía a pacientes sin caries o con menos de seis lesiones de caries tratadas (CAO < 6).

- **Grupo I o grupo con alto riesgo de caries**, que incluía a pacientes con más de seis lesiones tratadas o sin tratar ($CAO \geq 6$).

Los pacientes fueron clasificados en tres grupos en relación a la enfermedad periodontal crónica (Tabla 4):

- **Grupo control, pacientes sin EPC** que presentaban un CPITN < 3 y una PIP < 1 .
- **Grupo MCP, pacientes con EPC leve o moderada**: que presentaban un CPITN=3 y/o una PIP entre 2-5.
- **Grupo SCP, pacientes con EPC severa** que presentaban un CPITN=4 y/o una PIP > 5 .

Tabla 4: Datos demográficos de los grupos de pacientes del estudio

Grupo	Caries		Enfermedad Periodontal (EP)				
	Bajo riesgo	Alto riesgo	Total	Sin EP	EP moderada	EP grave	Total
	0	I		Control	MCP	SCP	
N	58	132	190	89	47	19	155
Edad							
Media	34,8	47,6	43,7	44	53,5	55	48,2
Rango	18-68	20-81	18-81	(30-78)	(30-81)	(33-77)	(30-81)
Sexo							
Mujeres (%)	38 (65,5)	57 (43,2)	95 (50)	43(48,3)	20 (42,6)	7 (36,8)	70(45,2)
Hombres (%)	20 (34,5)	75 (56,8)	95 (50)	46(51,7)	27 (57,4)	12(63,2)	85(54,8)

3.2 Obtención de las muestras microbiológicas

Las muestras se obtuvieron mediante enjuague oral (OR) con 25 ml agua destilada estéril durante un minuto. El enjuague fue depositado en tubos Falcon® de 50 ml^{3,25,214,294,350-352}.

Además, se tomaron muestras de las bolsas periodontales (GPP) con puntas estériles de papel que se introducían durante 10 s en el surco gingival de los dientes 1.6 (primer molar superior derecho), 3.6 (primer molar inferior izquierdo) y 4.1 (incisivo central inferior derecho)³⁵³ (Figura 14), donde previamente se había realizado un aislamiento relativo y secado de la zona. La punta de papel se depositaba posteriormente en un tubo con 2,5 ml de agua destilada estéril^{3,15,241,349,354-356}.



Figura 14: Toma de muestra subgingival con una punta de papel estéril con aislamiento relativo en incisivo inferior.

3.3 Cultivo, aislamiento e identificación de *Candida*

Para el aislamiento en cultivo de *Candida*, se sembraron 100 μ l de los OR o 50 μ l del sedimento de las GPP, después del centrifugado de las muestras a 4000 rpm durante 10 min, en placas de agar cromógeno ChromID *Candida* (antes denominado *Candida* ID2; BioMérieux Marcy L'Étoile, Francia) (Figura 15).

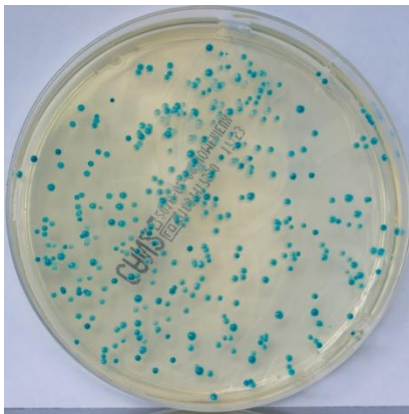


Figura 15. Crecimiento de *Candida* en agar cromógeno ChromID *Candida* . Las colonias de color azul corresponden a *Candida albicans* y/o *Candida dubliniensis*.

Las placas se incubaron a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ y el crecimiento se evaluó a las 24, 48 y 72 horas, mediante la realización del recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) y el estudio de las características morfológicas de las colonias. Estas características nos permiten la identificación presuntiva de las distintas especies de *Candida*^{15,351,352,357-359}

(Figura 15). Las placas se desecharon después de 10 días de incubación si no se observaba crecimiento.

La identificación definitiva de las especies que en el cromógeno no eran azules se realizó mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas con el método API ID 32C (BioMérieux) (Figura16).

La identidad definitiva de las colonias azules (*Candida albicans* o *Candida dubliniensis*) fue confirmada por amplificación del gen *hwp1* por una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional de detección múltiple que distingue entre *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* y *Candida africana* (Figura 17)^{25,351,359,360}.



Figura 16. Asimilación de fuentes de carbono mediante galería de identificación API ID32C.

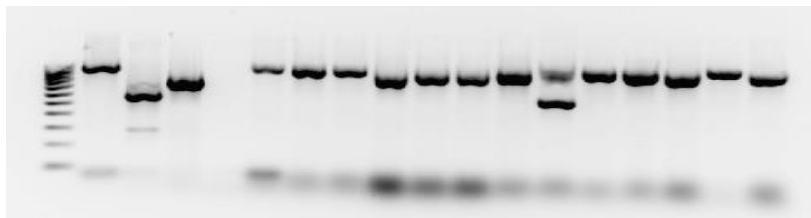


Figura 17. Identificación de *Candida* por amplificación de ADN

3.4 Estudio *in vitro* de la sensibilidad a los fármacos antifúngicos

Se estudió la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos polienos AMB y NYS (Sigma-Aldrich, EEUU) y a los azoles FLZ, ITZ y MCZ (Sigma-Aldrich, EEUU), PSZ (Merck & Co., EEUU) y VRZ (Pfizer SLU, Inglaterra) de 126 aislamientos procedentes de 61 pacientes.

El estudio de la sensibilidad *in vitro* a los fármacos antifúngicos se realizó siguiendo el método estandarizado de microdilución en caldo RPMI (1640) propuesto en el documento M27-A3 del CLSI³³¹, con la validación del tiempo de lectura a las 24 horas y los nuevos puntos de corte clínicos específicos para los diferentes fármacos y especies de *Candida* descritos en el anexo S4 del documento^{312,330}. Los aislamientos analizados se clasificaron según estos puntos de corte interpretativos como se muestra en la tabla 5.

Una descripción más detallada se encuentra en el manuscrito 3 (*In vitro antifungal susceptibility of oral Candida isolates from patients suffering from caries and chronic periodontitis*). Se utilizaron los puntos de corte de *Candida glabrata* para *Candida lipolytica*.

Tabla 5: Puntos de corte clínico sugeridos por el CLSI para los antifúngicos estudiados.

Especies	Fármaco	Puntos de corte clínicos (µg/ml)		
		Sensible	SDD*/ Intermedio	Resistente
<i>Candida albicans</i>	FLZ	≤ 2 µg/ml	4 µg/ml	≥ 8 µg/ml
	ITZ	≤ 0,125 µg/ml	0,25-0,5 µg/ml	≥ 1 µg/ml
	VRZ	≤ 0,125 µg/ml	0,25-0,5 µg/ml	≥ 0,5 µg/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	FLZ	≤ 2 µg/ml,	4 µg/ml	≥ 8 µg/ml
	VRZ	≤ 0,125 µg/ml	0,25-0,5 µg/ml	≥ 1 µg/ml
<i>Candida glabrata/ Candida lipolytica</i>	FLZ		32 µg/ml	≥ 64 µg/ml
<i>Candida tropicalis</i>	FLZ	≤ 2 µg/ml	4 µg/ml	≥ 8 µg/ml
	VRZ	≤ 0,125 µg/ml	0,25-0,5 µg/ml	≥ 0,5 µg/ml
<i>Candida krusei</i>	VRZ	≤ 0,5 µg/ml	1 µg/ml	≥ 2 µg/ml

*SDD: sensible dosis dependiente

Los puntos de corte clínicos específicos para AMB, NYS, MCZ y PSZ no han sido aún definidos, ni tampoco para las especies *Candida dubliniensis* y *Candida guilliermodii*. Para la interpretación de la resistencia a éstos fármacos y especies se emplearon los puntos de corte epidemiológicos, tal y como se describe en otros estudios^{19,312,361} (Tabla 6).

Los puntos de corte epidemiológicos para la NYS y MCZ tampoco han sido establecidos aún, por lo que en este trabajo hemos empleado los mismos puntos de corte que para la AMB. Sin embargo, las CMI de NYS son habitualmente más altas que las de AMB en una o dos diluciones.

Tabla 6: Puntos de corte epidemiológicos sugeridos^{19,312,361} para los antifúngicos estudiados.

Especies	Fármaco	Puntos de corte epidemiológicos (µg/ml)	
		Salvaje	No salvaje
<i>Candida albicans</i>	AMB	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	NYS	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	FLZ	≤ 0,5 µg/ml,	>0,5µg/ml
	ITZ	≤ 0,125 µg/ml	>0,125 µg/ml
	MCZ	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	PSZ	≤0,06 µg/ml	>0,06 µg/ml
	VRZ	≤ 0,03 µg/ml	>0,03 µg/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	AMB	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	NYS	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	FLZ	≤ 2 µg/ml,	>2 µg/ml
	ITZ	≤ 0,5 µg/ml	>0,5 µg/ml
	MCZ	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	PSZ	≤0,25 µg/ml	>0,25 µg/ml
	VRZ	≤ 0,125 µg/ml	>0,125 µg/ml
<i>Candida glabrata/ Candida lipolytica</i>	AMB	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	NYS	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	FLZ	≤ 32 µg/ml	>32 µg/ml
	ITZ	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	MCZ	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	PSZ	≤2 µg/ml	>2 µg/ml
	VRZ	≤ 0,5 µg/ml	>0,5 µg/ml
<i>Candida tropicalis</i>	AMB	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	NYS	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	FLZ	≤ 2 µg/ml	≥ 4 µg/ml
	ITZ	≤ 0,5 µg/ml	>0,5 µg/ml
	MCZ	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	PSZ	≤ 0,125 µg/ml	>0,125 µg/ml
	VRZ	≤ 0,06 µg/ml	>0,06 µg/ml

Tabla 6 (Cont): Puntos de corte epidemiológicos sugeridos^{19,312,361} para los antifúngicos estudiados.

Especies	Fármaco	Puntos de corte epidemiológicos (µg/ml)	
		Salvaje	No salvaje
<i>Candida krusei</i>	AMB	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	NYS	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	FLZ	≤ 64 µg/ml	>64 µg/ml
	ITZ	≤ 1 µg/ml	>1 µg/ml
	MCZ	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	PSZ	≤ 0,5 µg/ml	>0,5 µg/ml
	VRZ	≤ 0,5 µg/ml	≥ 2 µg/ml
<i>Candida dubliniensis</i>	AMB	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	NYS	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	FLZ	≤ 0,5 µg/ml	>0,5 µg/ml
	ITZ	≤ 0,25 µg/ml	>0,25 µg/ml
	MCZ	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	PSZ	≤ 0,125 µg/ml	>0,125 µg/ml
	VRZ	≤ 0,03 µg/ml	>0,03 µg/ml
<i>Candida guilliermondii</i>	AMB	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	NYS	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	FLZ	≤ 8 µg/ml	>8 µg/ml
	ITZ	≤ 1 µg/ml	>1 µg/ml
	MCZ	≤ 2 µg/ml	>2 µg/ml
	PSZ	≤ 0,5 µg/ml	>0,5 µg/ml
	VRZ	≤ 0,25 µg/ml	>0,25 µg/ml

3.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa SPSS versión 15.0. y 22.0.

Para ver si las variables continuas se ajustaban a la distribución normal se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las diferencias de medias entre los diferentes grupos se efectuaron mediante la t de student y ANOVA para variables paramétricas, mientras

que para las variables no paramétricas se empleó la Chi², la U de Mann Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis.

Las variables categóricas se compararon mediante el test exacto de Fisher y la correlación entre variables continuas se analizó mediante la prueba de correlación de Pearson (paramétricos) o Spearman (no paramétricos). Los Odds ratio se calcularon mediante regresión logística binaria, ajustando los datos por sexo y edad. El estudio de la diversidad de especies de hongos presentes en las muestras clínicas se realizó calculando el índice de diversidad de Simpson^{3,362}. En todos los métodos estadísticos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

3.6 Búsqueda bibliográfica

Se han realizado búsquedas bibliográficas en las bases de datos disponibles en Internet como Medline, Science Direct, Scopus, Cochrane Library y National Library of Medicine (Pub Med) entre los años 2010 y 2016. Las palabras clave sobre el tema objeto fueron: *Candida*, candidiasis oral, caries, enfermedad periodontal, biofilm, antifúngicos, resistencia *in vitro*, placa dental, microbiota oral, microbiota subgingival, colonización oral, diversidad de especies y factores de virulencia (*Candida*, oral candidosis, caries, periodontitis, biofilm, antifungal, *in vitro* resistance, dental plaque, oral microbiota, subgingival microbiota, oral colonisation, species diversity and factores virulence factors). Las búsquedas arrojaron miles de resultados de los que después de leídos el título y el resumen se preseleccionaron 620 artículos, muchos de los cuales se han relacionado directamente con este trabajo. La bibliografía ha sido ordenada mediante el programa informático RefWorks con el estilo American Medical Association 10^a Ed.

4 RESULTADOS

Los resultados de esta Tesis doctoral se describen en base a los tres estudios principales realizados. De esta forma, se han tratado por separado la relación entre la colonización por *Candida* y la caries, la colonización por *Candida* y la enfermedad periodontal crónica y, finalmente, la sensibilidad *in vitro* de los aislamientos orales de *Candida* a los fármacos antifúngicos y su relación con ambas patologías.

-ESTUDIO 1-

Caries y colonización por *Candida* en pacientes adultos en el País Vasco (España)

(Mycoses 2016; 59: 234-240)

Se observó una colonización por *Candida* en 92 de los 190 pacientes estudiados (48,4%). La colonización por *Candida* era significativamente mayor ($p < 0,001$) en el grupo de pacientes con caries (56,1%) que en el grupo de pacientes control (31%) (Tabla 1 del manuscrito). Los pacientes con colonización por *Candida* tenían un mayor número de lesiones de caries que los pacientes no colonizados (Odds ratio 3,1, 95% CI 1,53-5,48). La media de UFC aisladas en el grupo de pacientes con caries (962 UFC/ml) fue mayor ($p=0,011$) que en el grupo control (331 UFC/ml) (Tabla 4 del manuscrito).

En las muestras orales del grupo control se aislaron siete especies fúngicas diferentes de 18 pacientes. Sin embargo, fueron 16 las especies aisladas de los 74 pacientes del grupo con caries. *Candida albicans* era la especie predominante en ambos grupos. En el grupo de pacientes con caries también se aislaron con relativa frecuencia las especies *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* y *Candida krusei* (Tablas 2 y 3 del manuscrito).

Candida albicans se aisló en cultivo puro de 54 pacientes (28,4%) y en cultivo mixto con otra especie fúngica en otros 10 pacientes (5%). *Candida albicans* se encontró presente en el 22,4% de las muestras orales de los pacientes control y en el 38,8% de las muestras de los pacientes con caries.

Además, otras 11 especies de *Candida* se aislaron en cultivo puro de 23 pacientes (12,1%), siendo las más habituales *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* y *Candida guilliermondii*. Los pacientes con caries estuvieron más frecuentemente colonizados ($p = 0,006$) por especies de *Candida* no *C. albicans* que los pacientes incluidos en el grupo control (Tabla 2 del manuscrito).

En base al número de UFC aisladas por especie se calculó el índice de diversidad de especies de Simpson (I) para los distintos grupos del estudio. El grupo de pacientes con

caries tuvo una mayor diversidad de especies ($I=0,491$) que el grupo control ($I=0,234$) (Tablas 2 y 3 del manuscrito).



Caries and *Candida* colonisation in adult patients in Basque Country (Spain)

Janire De-la-Torre,^{1,2} Xabier Marichalar-Mendia,² Aketza Varona-Barquin,¹ Cristina Marcos-Arias,¹ Elena Eraso,¹ José Manuel Aguirre-Urizar² and Guillermo Quindós¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Unidad de Formación e Investigación multidisciplinar «Microbios y Salud» (UR 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain and ²Departamento de Estomatología II, Unidad de Formación e Investigación multidisciplinar «Microbios y Salud» (UR 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain

Summary

Candida albicans is one of the most frequent pathogens of the oral cavity, as a major cause of opportunistic disease. Moreover, *Candida* could be a cofactor of common oral diseases, such as dental caries. The aim of this study was to analyse the oral yeast colonisation in adults with dental caries and to evaluate its relationship with this clinical entity. We studied 190 patients distributed into controls (58 patients) and patients with caries (132 patients). Oral samples were collected by oral rinse and cultured in a chromogenic agar. *C. albicans* was the most prevalent species isolated from oral specimens in both groups. Patients with caries had a greater *Candida* colonisation (74 patients, 56.1%), than persons without caries (18 patients, 31%, $P < 0.01$). Patients with caries were significantly more colonised by non-*C. albicans* species than individuals without caries ($P = 0.006$). Moreover, the diversity of *Candida* species was richer in patients suffering from caries. The odds ratio of the colonisation of patients with caries was 3.144 (95% CI 1.525–5.478). There is a significant clinical correlation between dental caries and oral *Candida* colonisation in adults.

Correspondence: Dr Guillermo Quindós MD, PhD, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología (UR 11/25 «Microbios y Salud»), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Apartado 699, E-48080 Bilbao, Spain.

Tel.: +34 94 601 2854. Fax: +34 94 601 3495.

E-mail: guillermo.quindos@ehu.eus

Submitted for publication 3 September 2015

Revised 20 November 2015

Accepted for publication 3 December 2015

doi:10.1111/myc.12453

Caries and *Candida* colonization in adult patients in Basque Country (Spain)

Janire De-la-Torre^{1,2}, Xabier Marichalar-Mendia², Aketza Varona-Barquin¹, Cristina Marcos-Arias¹, Elena Eraso¹, José Manuel Aguirre-Urizar² and Guillermo Quindós^{1*}

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, and ²Departamento de Estomatología II, Unidad de Formación e Investigación multidisciplinar «Microbios y Salud» (UFI 11/25), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain

Short title: *Candida* and caries in adults

Corresponding author: Dr. Guillermo Quindós MD, PhD, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología (UFI 11/25 «Microbios y Salud»), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Apartado 699, E-48080 Bilbao, Spain. Tel.:+34 94 601 2854; Fax: +34 94 601 3495; E-mail: guillermo.quindos@ehu.eus

Summary

Candida albicans is one of the most frequent pathogens of the oral cavity, as a major cause of opportunistic. Moreover, *Candida* could be a cofactor of common oral diseases, such as dental caries. The aim of this study was to analyze the oral yeast colonization in adults with dental caries and to evaluate its relationship with this clinical entity. We studied 190 patients distributed into controls (58 patients) and patients with caries (132 patients). Oral samples were collected by oral rinse and cultured in a chromogenic agar. *Candida albicans* was the most prevalent species isolated from oral specimens in both groups. Patients with caries had a greater *Candida* colonization (74 patients, 56.1%), than persons without caries (18 patients, 31%, $p < 0.01$). Patients with caries were significantly more colonized by non-*Candida albicans* species than individuals without caries ($p = 0.006$). Moreover, the diversity of *Candida* species was richer in patients suffering from caries. The odds ratio of the colonization of patients with caries was 3.144 (95% CI 1.525-5.478), which infers a higher risk of caries in people colonized by *Candida*. There is a significant clinical correlation between dental caries and oral *Candida* colonization in adults.

Keywords: Caries, Adults, Basque Country, *Candida*, Colonization, Yeasts

Introduction.

Dental caries remains among the most common human diseases, second only to common cold. Caries is chronic disease that slowly progresses to localized and irreversible destruction of the tooth with an important controversy about its evasive and multiple etiologies.^{1,2} Local production of acids from microbial fermentation of carbohydrates is necessary for caries development³. A dynamic biofilm or dental plaque is developed, consisting of microorganisms of different species and kingdoms, attached between and embedded in a microbial extracellular matrix and salivary polymers.^{4,5} The role of the microbiota of the tooth surfaces in the etiology and pathogenesis of caries is still not well elucidated. *Streptococcus mutans* are major cariogenic microorganisms with ability to produce glucans and acids in large quantities.² However, the hypothesis of an altered ecology of the microbial dental plaque that encourages the development of caries seems as consistent as the hypothesis on a dental plaque with a specific microbial composition, dominated by *Streptococcus mutans*, *Actinomyces*, *Aggregatibacter*, *Lactobacillus* o *Prevotella*.^{1,6} An ecologically altered microbiota would be able to produce acids from carbohydrates in the diet, causing an imbalance in the cycle of dental demineralization-remineralization which would alter the tooth surface and allow the formation of cavities.⁷

Candida albicans is an opportunistic fungus and a common component of the oral microbiota in many people. *Candida albicans* could be a partner in dental caries development by actively participating in its pathogenesis, taking advantage of the altered composition of dental plaque and proliferating. *Candida* has been isolated from supragingival dental plaque along with other cariogenic microorganisms⁸. The coadhesion or coaggregation between *Candida albicans* and oral bacteria, such as *Streptococcus mutans*, is crucial for fungal adhesion, colonization and persistence in dental surfaces. Moreover, *Candida albicans* colonization or isolation from carious lesions, especially in children, adolescents and young adults has been described.⁹⁻¹⁴ However, this yeast could be also a simple indicator of the most optimal conditions for the development of caries, or even could be only a structural component of the dental plaque.¹⁵

There are few studies in adults, a susceptible population to caries in Basque Country. The aim of the current study was to analyze the oral *Candida* colonization in adults with caries, to assess the prevalence of different *Candida* species and evaluate their relationship with the severity of the disease.

Patients and Methods

Patients and study design. This prospective observational analytical study randomly recruited 190 patients (95 women and 95 men) attending the Unit of Oral Medicine of the Dental Clinic Service at the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) in Bilbao (Spain). A complete oral examination of each patient was performed and a clinical history registered. The inclusion criteria were that the patient was over 18 years old and gave written consent after being informed about the characteristics and objectives of the study. Exclusion criteria included that the patient had been treated with antimicrobial, antiretroviral or immunosuppressive therapies in the last month prior to sampling, the absence of more than 10 teeth, the presence of signs of oral candidiasis or compatible with this infection, suffering from a chronic uncontrolled disease or pregnancy. This study was approved, with the reference CEISH/23/2010, by the Ethics Committee for Research with Humans of the UPV/EHU.

Patients were classified into two groups according to the presence of caries on the basis of the Decayed, Missing, Filled (DMF) index proposed by WHO for oral health surveys.^{1,16,17} Control group (group 0) comprised patients without cavities or with less than 6 dental injuries treated or untreated (DMF < 6). Group I included patients suffering from caries showing 6 or more than 6 injuries (DMF ≥ 6).

Clinical specimens. Oral samples from all patients were obtained by vigorous oral rinse with 25 ml of distilled water for 1 min, which was deposited in 50 ml polystyrene tubes with screw cap.^{18,19}

Culture, isolation and identification of *Candida*. One hundred microliters of oral rinse were plated onto ChromID *Candida* chromogenic agar plates (formerly *Candida* ID2; BioMérieux,

Marcy L' Étoile, France) and incubated at 36 ± 1 °C. Growth was evaluated at 24 h, 48 h and 72 h, by counting the number of colony forming units (CFU) and by analyzing the morphologic characteristics of the colonies (color, shape and texture) which allowed a presumptive identification of fungal isolates. Plates were discarded after 10 days of incubation if no growth was observed. Definitive identification of the colonies was performed using biochemical and physiological tests with the method API ID 32 C (BioMérieux).²⁰ The final identification of blue colonies, whose presumptive identity could be *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*, was confirmed by amplification of the *hwp1* gene by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) that allows to distinguish between *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana*.²¹

Statistics. Statistical analyses were conducted using SPSS software v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Categorical variables were compared using Chi Square test and the quantitative variables with Mann Whitney U test. Additionally, Odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI), adjusted by age and sex were calculated using binary logistic regression analysis. A value of $p < 0.05$ was considered significant. The study of the diversity of fungal species present in clinical specimens was performed by calculating the Simpson diversity index.^{22,23}

Results

Characteristics of the 190 patients are shown in table 1. There were significant differences ($p < 0.01$) in the distribution according to the gender between groups. Women predominated in group 0 and men in group I. Regarding to the age, group I was significantly older ($p < 0.01$) than the group 0. Oral *Candida* colonization was observed in half of the patients, being isolated in oral rinses from 92 out of 190 patients (48.4%). However, this colonization varied significantly between group 0 and I (31% and 56.1% respectively. $p < 0.001$) (Table 2).

In the *Candida* colonization group, a predominance of men was observed ($p = 0.02$) and the DMF index was significantly higher ($p < 0.001$) than in the colonization group. The risk of caries was greater when there was an oral colonization by yeasts (Odds ratio 3.1, 95% CI 1.53-

5.48) (Table 2). CFUs were significantly higher in oral rinses from group I (average of 962 CFU/ml) with respect to the controls (average 331 CFU/ml, $p = 0.011$) (Data not shown).

Seven different fungal species were isolated from 18 persons in the group 0 and 16 species from 86 patients of the group I. *Candida albicans* was the predominant species in both groups. Moreover, in group I other four species were frequently isolated: *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* and *Candida krusei* (Tables 3 and 4).

Candida albicans was isolated in oral rinses from 54 patients (28.4%) as pure culture and in 10 patients (5%) in a mixed culture with other fungal species. *Candida albicans* was present in the oral specimens from 13 patients of group 0 (22.4%) and 51 of the group I (38.8%). In addition, 11 non-*Candida albicans* species were isolated in pure culture from oral rinses of 23 patients (12.1%). The most frequent species were *Candida parapsilosis* (from 7 patients -3.7%-, 6 from group I and 1 from group 0), *Candida dubliniensis* (from 6 patients -3.2%-, 5 from group I and 1 from group 0) and *Candida guilliermondii* (from 3 patients -1.6%-, 1 from group I and 2 from group 0). Other yeasts species, such as *Candida colliculosa*, *Candida glabrata*, *Candida inconspicua*-*Candida norvegensis*, *Candida krusei*, *Candida lipolytica*, *Candida quercitrusa*, *Candida rugosa* and *Candida tropicalis* were isolated from oral specimens of 12 patients. Patients included in group I were significantly more colonized by non-*Candida albicans* species than patients in the group 0 ($p = 0.006$) (Table 3). When the Simpson diversity index was calculated and the most predominant species determined on the basis of the number of CFU/ml, species diversity was higher in patients from group I (0.491) than from control group (0.234). Patients with greater DMF index showed a greater fungal diversity in their oral cavity (Tables 4 and 5).

Discussion

The etiology of caries appears to be multifaceted remaining a source of controversy, primarily associated with the limited knowledge of the complexity of oral microbiota and their interactions with dental microniches. Caries seems to be the result from an imbalance between

the metabolic activities of the microbial plaque. *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter*, *Lactobacillus* or *Prevotella* have been linked to the development of dental caries but their role in dental plaque and caries production is not completely clarified. Under severe and prolonged acidic conditions these bacteria become predominant but also aciduric non-*Streptococcus mutans* streptococci, *Actinomyces*, bifidobacteria and *Candida* are present.^{1,6,24} Differences in populations of patients studied and the circumstances that can alter the composition of the microbiota have failed to address these concerns.

The current study is the first to evaluate the relationship between *Candida* and presence of caries in adults in our country. Although the selection of patients was conducted rigorously randomized and sampling was standardized, age and sex differences between both groups of patients were evident since caries is very common and inevitably accumulates over the years. Then, patients included in the control group were not completely free from decay or fillings since it is very difficult to find adults without decay in our midst.

Candida has been isolated from the primary supragingival dental plaque along with other cariogenic microorganisms, such as *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* and *Lactobacillus*.⁸ Presence of oral *Candida* colonization in people with caries, especially of children, adolescents and young adults has been widely described, and *Candida albicans* has been isolated from lesions of caries.⁹⁻¹⁴ In addition, some studies in rats have shown that *Candida* can cause caries on the occlusal surface of teeth.²⁵ In the present study, *Candida* was isolated from the oral cavity of almost half of the people, in similar proportion (30 to 60%) than on other studies using a similar methodology.^{10,14,23,26} However, there was not a higher oral colonization related to the age of the patients, as reported by Kleinegger *et al.*²⁷ Those patients with more caries lesions presented a significantly greater *Candida* burden and a higher diversity of fungal species than the control group. This fact is in concordance with the reported by Raja *et al.*¹⁴ and Moreira *et al.*²⁸ that cultures from patients showing more than 400 CFU/ml of *Candida albicans* were related to a greater cariogenic activity. In the current study, average CFU/ml was 962 in oral cultures from patients with caries and related to a higher DMF index, similarly as reported by

Moalic *et al.*¹⁰ However, in the current study, 18 of 42 patients with DMF ≥ 15 had less than 400 CFU/ml in their cultures and, conversely, 15 patients without *Candida* colonization suffered from a significant number of caries lesions.

Candida albicans was the predominant fungal species and it was isolated from 33.4% of oral rinses in comparison with 19.6% colonized by other yeasts. These findings are very similar to those described previously.^{10,14} This oral predominance of *Candida albicans* is related to its high pathogenic potential which includes several adhesins, its ability to switch the morphology from yeast to mycelium, or to develop recalcitrant biofilms, alone or in combination with other microorganisms.^{2,5,29-31} *Candida albicans* has a great capacity to colonize collagen, enamel, dentin, dental cement and hydroxyapatite, and adhere to proteins adsorbed to the tooth enamel and to some species of *Streptococcus* and *Staphylococcus*.³²⁻³⁴ Furthermore, *Candida albicans* can produce lipases, proteases and hemolysins favoring the development and maintenance of the lesions in the oral tissues.³⁵ This enzymatic action can be lytical for collagen and also damage hydroxyapatite, especially in the dental roots, promoting the production of root caries, more common in adults.³⁴ Moreover, *Candida albicans* can produce acid in concentrations and at similar speeds to the *Lactobacillus* in the presence of glucose and dissolve the hydroxyapatite as extensively as *Streptococcus mutans*.^{5,7}

Dental plaque is a complex structure composed by different microorganisms. O'Sullivan *et al.*³² found a strong cell adhesion between *Candida albicans* and *Streptococcus gordonii* but not with *Streptococcus oralis*. This inter-kingdoms coaggregation has also been described for *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*.^{5,31,36,37} The association between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* could cause the enhancement of plaque biofilm virulence. *Candida albicans* increases the production of exopolysaccharides, such as 1,3- β -glucans and the cospecies biofilm grows in biomass and harbors more *Streptococcus mutans* microcolonies. *Candida* mannans and glucans provide sites for streptococcal glucosyltransferases binding and to produce more exopolysaccharides.^{2,5} Union between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* could also be established through protein Als3p located in the hyphae of *Candida albicans*.³⁸ This protein

Als3p, with great antigenic capacity, is the basis of a vaccine anti-*Candida albicans* which is in phase I clinical trials after having proven its utility in animal models of oral and vaginal candidiasis.³⁹ *Candida albicans* could develop a role as an interkingdoms bridge that would associate different bacterial microcolonies within dental plaque giving protection to these bacteria from the saliva drag force.^{31,40} This coaggregation also exerts a protective role from the action of antibiotics, antimicrobial molecules present in toothpastes and the immune system. Falsetta *et al.*⁵ also reported that rats orally coinfecting with *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* displayed higher degrees of infection and microbial burden in oral plaques than rats infected with either species separately. This synergistic microbial association led to an aggressive onset of caries.

Other species isolated from one larger number of patients in the current study were *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* and *Candida guilliermondii*. In other studies in children, adolescents and young adults, species such as *Candida tropicalis* and *Candida krusei* predominated, but *Candida dubliniensis* was not isolated from the oral cavity of these patients.^{10,12} Urzúa *et al.*²³ reported a higher presence of *Candida glabrata* and they also isolated *Candida dubliniensis* from oral specimens. *Candida dubliniensis* is very close phylogenetically to *Candida albicans* with an important capacity to develop resistance to antifungal drugs, especially to fluconazole and other azoles.^{41,42} *Candida dubliniensis* is well adapted to the oral niche for its potential ability to adhere to buccal cells and abiotic surfaces, such as dentures, and developing biofilms in them.³⁰ In addition, this species produces extracellular enzymes, such as proteases and phospholipases, which facilitate the colonization of oral tissues.³⁵ These factors provide advantages to survive in the oral cavity in patients who have been treated with antifungal drugs.⁴²⁻⁴⁴

In the case of *Candida parapsilosis*, its high capacity of adhesion to dentures, prostheses and catheters make this emergent species an important and frequent pathogenic nosocomial cause of invasive candidiasis.⁴⁵ Interestingly, the sensitivity of *Candida parapsilosis* to the new antifungal drugs, called echinocandins, is lower than that of other species.⁴⁶⁻⁴⁸

The use of a chromogenic agar for oral cultures, in which the color and the texture of the colonies of different *Candida* species can be easily differentiated, makes it useful to check the great diversity of species present in the oral cavity.^{19,20} These chromogenic media can be simple tools for the study of the oral fungal ecology. In the current study, the use of these media proved that there is an association between the frequency, quantity and the variety of species of *Candida* with carious lesions in adults, a fact already observed in children.¹²

In the current study, there was observed a similar association between *Candida albicans* and dental caries in adults as has been previously described for children, adolescents and young people.^{7,9,10,49} *Candida albicans* with its great potential pathogenicity by means of adherence to dental surfaces, biofilm development and a powerful enzymatic potential, could be a crucial partner in the ecological imbalance within dental plaque that leads to an acidic environment suitable for the development of caries in adults. Although further studies should be necessary, the present findings suggest that a topical antifungal preventive therapy could be helpful for avoiding the progression of carious lesions in adults.

Acknowledgements

Elena Eraso and Guillermo Quindós have received grant support from Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (S-PR12UN002, S-PE13UN121) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI11/00203), and UPV/EHU (UFI 11/25).

In the past 5 years, Elena Eraso has received grant support from Astellas Pharma, and Pfizer SLU. Guillermo Quindós has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Pfizer SLU, Schering Plough and Merck Sharp and Dohme. He has been an advisor/consultant to Merck Sharp and Dohme, and has been paid for talks on behalf of Abbvie, Astellas Pharma, Esteve Hospital, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer SLU, and Schering Plough. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

1. Yang F, Zeng X, Ning K, Liu K, Lo C, Wang W, Chen J, Wang D, Huang R, Chang X, Chain PS, Xie G, Ling J, Xu J: Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *The ISME Journal* 2012;6:1-10.
2. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA: *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathogens* 2013;9:e1003616.
3. Russell RR: Changing concepts in caries microbiology. *American Journal of Dentistry* 2009;22:304-310.
4. Shen S, Samaranayake LP, Yip HK: Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. *Archives of Oral Biology* 2005;50:23-32.
5. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, Gonzalez-Begne M, Watson G, Krysan DJ, Bowen WH, Koo H: Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infection and Immunity* 2014;82:1968-1981.
6. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D: Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Research* 2013;47:89-102.
7. Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W: Acid production by oral strains of *Candida albicans* and Lactobacilli. *Caries Research* 2009;43:83-91.
8. Zijng V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One* 2010;5:e9321.
9. Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, Banoczy J: Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Research* 1999;33:191-195.

10. Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM: The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Research* 2001;35:149-155.
11. Shen S, Samaranayake LP, Yip HK, Dyson JE: Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly, ethnic chinese. *Oral Diseases* 2002;8:207-217.
12. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM: Presence of *Mutans streptococci* and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Archives of Oral Biology* 2006;51:1024-1028.
13. Signoretto C, Burlacchini G, Faccioni F, Zanderigo M, Bozzola N, Canepari P: Support for the role of *Candida* spp. in extensive caries lesions of children. *New Microbiologica* 2009;32:101-7.
14. Raja M, Hannan A, Ali K: Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Research* 2010;44:272-276.
15. Maijala M, Rautemaa R, Jarvensivu A, Richardson M, Salo T, Tjaderhane L: *Candida albicans* does not invade carious human dentine. *Oral Diseases* 2007;13:279-284.
16. Becker T, Levin L, Shochat T, Einy S: How much does the DMFT index underestimate the need for restorative care? *Journal of Dental Education* 2007;71:677-681.
17. Ito A, Hayashi M, Hamasaki T, Ebisu S: Risk assessment of dental caries by using classification and regression trees. *Journal of Dentistry* 2011;39:457-463.
18. Williams DW, Lewis MA: Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Diseases* 2000;6:3-11.
19. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, Aguirre JM, Eraso E, Quindós G: Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Archives of Oral Biology* 2009;54:127-131

20. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, Quindós G: Evaluation of the new chromogenic medium Candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:3340-3345.
21. Romeo O, Criseo G: First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using *hwp1* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008;62:230-233.
22. Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 1988;26:2465-2466.
23. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, Coccola C, Cifuentes V: Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Medical Mycology* 2008;46:783-793.
24. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2005;10 (Supl 1):E27-E39.
25. Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T: Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Research* 2011;45:100-106.
26. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G: The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiology and Immunology* 2007;22:175-181.

27. Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR: Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34:2246-2254.
28. Moreira D, Spolidorio DM, Rodrigues JA, Boriollo MF, Pereira CV, Rosa EA, Hofling JF: *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba-SP, Brazil. *Pesquisa Odontológica Brasileira = Brazilian Oral Research* 2001;15:187-195.
29. Cannon RD, Chaffin WL: Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ* 2001;65:785-787.
30. Villar-Vidal M, Marcos-Arias C, Eraso E, Quindós G: Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2011;29:660-665.
31. Koo H, Bowen WH: *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. *Future Microbiology* 2014;9:1295-1297.
32. O'Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD: Adhesion of *Candida albicans* to oral Streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology* 2000;146:41-48.
33. Makihira S, Nikawa H, Tamagami M, Hamada T, Nishimura H, Ishida K, Yamashiro H: Bacterial and *Candida* adhesion to intact and denatured collagen in vitro. *Mycoses* 2002;45:389-392.
34. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, Setijanto D, Hamada T: In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003;46:471-478.
35. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindós G: Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses* 2011;54:e10-e16.

36. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, Crielaard W: The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Archives of Oral Biology* 2008;53:755-764.
37. Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryotic Cell* 2009;8:1658-1664.
38. Peters BM, Ovchinnikova ES, Krom BP, Schlecht LM, Zhou H, Hoyer LL, Busscher HJ, van der Mei HC, Jabra-Rizk MA, Shirtliff ME: *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology* 2012;158:2975-2986.
39. Moragues MD, Rementeria A, Sevilla MJ, Eraso E, Quindós G: *Candida* antigens and immune responses: Implications for a vaccine. *Expert Review of Vaccines* 2014;13:1001-1012.
40. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM: *Candida* and other fungal species: Forgotten players of healthy oral microbiota. *Journal of Dental Research* 2014;93:445-451.
41. Quindós G, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP, Salgado J, Alonso-Vargas R, Rodrigo JM, Ruesga MT, Valverde A, Pemán J, Cantón E, Martín-Mazuelos E, Pontón J: In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. *Chemotherapy* 2000;46:395-401.
42. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, Coleman DC: Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research* 2004;4:369-376.
43. Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G: *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *Journal of Basic Microbiology* 2002;42:207-227.
44. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G: In vitro activities of new triazole antifungal agents, posaconazole and voriconazole, against oral *Candida* isolates from patients suffering from denture stomatitis. *Mycopathologia* 2012;173:35-46.

45. Quindós G: Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. Rev Iberoam Micol. 2014;31:42-48
46. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Alvarez M, Merino P, Campos-Herrero I, Marco F, de la Pedrosa EG, Yagüe G, Guna R, Rubio C, Miranda C, Pazos C, Velasco D; FUNGEMYCA Study Group: Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2011;55:5590-5596.
47. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, Quindós G: Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2011;66:2315-2322
48. Singaravelu K, Gácsér A, Nosanchuk JD: Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. Revista Iberoamericana de Micología 2014;31:16-21.
49. Beighton D: The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. Community Dentistry and Oral Epidemiology 2005;33:248-255.

Table 1. Demographic characteristics of patients.

	Group 0 (n=58)	Group I (n=132)	Total (n=190)
Age (years)	34.8 ± 11.8 (18-68)	47.6 ± 13.5 (20-81)	43.7 ± 14.5 (18-81)
Female n (%)	38 (65.5%)	57 (43.2%)	95 (50%)
Male n (%)	20 (34.5%)	75 (56.8%)	95 (50%)

Table 2. Yeast colonization of patients according to age, sex and DMF.

	Group 0				Group I				Total					OR (95% CI)
	n (%)	Age (years)	Males n (%)	Females n (%)	n (%)	Age (years)	Males n (%)	Females n (%)	n (%)	Age (years)	DMF Index	Males n (%)	Females n (%)	
<i>Candida</i> colonization	18 (31)	36 ± 14	9 (50)	9 (50)	74 (56.1)	46.4 ± 13.3	45 (60.8)	29 (39.2)	92 (48.4)	44.4 ± 14.2	11.2 ± 6.1	54 (58.7)	38 (41.3)	3.1 (1.53-5.48)
No colonization	40 (69)	34.3 ± 12.4	11 (27.5)	29 (72.5)	58 (43.9)	49.2 ± 13.3	30 (51.7)	28 (48.3)	98 (51.6)	43.1 ± 14.8	7.9 ± 5.6	41 (41.7)	57 (58.2)	1

Group 0 (DMF < 6) & group I (DMF ≥ 6)

Table 3. Yeasts recovered from patients.

Species	Group 0 (n 58)	Group I (n 132)	Total (n 190)
No growth	40 (69%)	58 (43.9%)	98 (51.6%)
<i>Candida albicans</i>	12 (20.7%)	42 (31.8%)	54 (28.4%)
<i>Candida albicans</i> + other <i>Candida</i> *	1 (1.7%)	8 (6.2%)	9 (4.5%)
<i>Candida albicans</i> + other fungal species	-	1 (0.8%)	1 (0.5%)
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (1.7%)	5 (3.8%)	6 (3.2%)
<i>Candida parapsilosis</i> + other <i>Candida</i>	-	1 (0.8%)	1 (0.5%)
<i>Candida guilliermondii</i>	2 (3.4%)	1 (0.8%)	3 (1.5%)
<i>Candida dubliniensis</i>	1 (1.7%)	5 (3.8%)	6 (3.2%)
Other species of <i>Candida</i> **	-	7 (5.4%)	7 (3.6%)
Other fungi***	1 (1.7%)	4 (3%)	5 (2.6%)
Mixed cultures (%)	2 (3.4%)	9 (7%)	11 (5.5%)

Group 0 (DMF < 6) & group I (DMF ≥ 6)

**Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica*, *Candida colicullosa*,
Candida glabrata and *Candida krusei*

***Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida rugosa*, *Candida quercitrusa*,
Candida lipolytica, *Candida krusei* and *Candida inconspicua*-*Candida norvegensis*

****Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*,
Aureobasidium pullulans and *Cryptococcus albidus*

Table 4. Total CFU/ml (%) recovered of yeasts from patients.

Species	Total CFU/ml (%)		
	Group 0 (n 18)	Group I (n 86)	Total (n 104)
<i>Candida albicans</i>	5180 (87)	46490 (68)	51670 (71.4)
<i>Candida parapsilosis</i>	30 (0.5)	6260 (9.4)	6290 (8.7)
<i>Candida tropicalis</i>	–	700 (1)	700 (1)
<i>Candida glabrata</i>	–	2770 (4.2)	2770 (3.8)
<i>Candida rugosa</i>	–	10 (0.015)	10 (0.01)
<i>Candida quercitrusa</i>	–	10 (0.015)	10 (0.01)
<i>Candida guilliermondii</i>	250 (4)	70 (0.1)	320 (0.4)
<i>Candida lipolytica</i>	70 (1.2)	420 (0.63)	490 (0.7)
<i>Candida dubliniensis</i>	60 (1)	2790 (4.2)	2850 (3.9)
<i>Candida inconspicua-norvegensis</i>	–	50 (0.08)	50 (0.07)
<i>Candida krusei</i>	–	5550 (8.4)	5550 (7.7)
<i>Candida colliculosa</i>	–	70 (0.1)	70 (0.1)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	–	390 (0.6)	390 (0.5)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	–	600 (0.9)	600 (0.8)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	40 (0.1)	40 (0.05)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	320 (5.4)	–	320 (0.4)
<i>Cryptococcus albidus</i>	40 (0.7)	250 (0.4)	290 (0.4)
Total CFU	5950 (100)	66470 (100)	72420 (100)

Group 0 (DMF < 6) & group I (DMF ≥ 6)

Table 5. Fungal diversity in oral specimens from patients.

	Group 0	Group I
CFU/ml (mean ± SD)	330,6 ± 660,693	962,1 ± 1691,13 UFC/ml
No. of species (diversity index*)	7 (0.234)	16 (0.491)

Group 0 (DMF < 6) & group I (DMF ≥ 6)

*Simpson's diversity index: $I=1 - \sum_i^S \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)}$ where S corresponds to species, n_i to de I species frequency and N is the total number of isolates.

-ESTUDIO 2-

Colonización oral por *Candida* en pacientes con enfermedad periodontal crónica en el País Vasco.

(Journal of Periodontal Research.2016: enviado)

En las muestras del estudio de los pacientes del grupo control y de los pacientes con enfermedad periodontal crónica se aisló *Candida* en 77 de las 155 muestras (49,5%) obtenidas por enjuague bucal y en 56 de los 155 pacientes (36%) de los que se obtuvieron muestras de la bolsa periodontal ($p < 0.01$) (Tabla 1 del manuscrito). El aislamiento de *Candida* y otras levaduras fue similar en los tres grupos estudiados, aunque la colonización fue relativamente mayor en los pacientes con enfermedad periodontal grave ($p = 0,065$) (Tabla 1 del manuscrito).

La media de UFC de *Candida* en los enjuagues fue significativamente mayor que la obtenida en las bolsas periodontales ($p < 0,01$) (Tabla 2). La media de UFC de *Candida* en el grupo con enfermedad periodontal grave fue mayor, aunque no estadísticamente significativa, que la de los otros dos grupos de pacientes estudiados ($p = 0,3$) (Tabla 2 del manuscrito).

Candida albicans se aisló en los OR tanto en cultivo puro como en cultivo mixto junto con *Candida parapsilosis*, *Candida lipolytica*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* o *Candida colicullosa*. Además, fueron aisladas en cultivo puro de los enjuagues otras 9 especies de *Candida*, siendo las más frecuentes *Candida parapsilosis* y *Candida dubliniensis*. También se aislaron otros géneros fúngicos (Tablas 3 y 4 del manuscrito).

En las bolsas periodontales se aisló *Candida albicans* en 38 de los 56 pacientes (67,8%) con colonización en las bolsas, encontrándose en cultivo mixto en 5 de los 56 pacientes (8,9%) (Tabla 3 del manuscrito). Las especies aisladas junto a *Candida albicans* fueron *Candida parapsilosis*, *Candida lipolytica*, *Candida glabrata*, *Candida famata* y *Candida tropicalis*. Además, se aislaron de las bolsas periodontales en cultivo puro siete especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* y seis especies de otros hongos (Tablas 3 y 4 del manuscrito).

El índice de biodiversidad de Simpson fue de 0,53 para el grupo control, 0,55 para el grupo con enfermedad periodontal leve-moderada y 0,17 para el grupo con enfermedad periodontal grave en las muestras de los enjuagues y de 0,72 en el grupo control, 0,33 en el grupo con enfermedad periodontal leve-moderada y 0,094 en el grupo con enfermedad periodontal grave en las muestras de la bolsa periodontal.

Oral *Candida* colonization in patients suffering from chronic periodontitis in the Basque Country

Janire De-la-Torre^{*,†}, Guillermo Quindós^{*}, Cristina Marcos-Arias^{*}, Xabier Marichalar-Mendia[†],
María Luisa Gainza[‡], Elena Eraso^{*}, Amelia Acha-Sagredo[†], José Manuel Aguirre-Urizar[†].

^{*} Department of Immunology, Microbiology and Parasitology. Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25). Faculty of Medicine and Dentistry. University of the Basque Country/Euskal Herriko Unibertsitatea. Leioa, Spain.

[†] Department of Stomatology II. Unidad de formación e investigación multidisciplinar “Microbios y Salud” (UFI 11/25). Faculty of Medicine and Dentistry. University of the Basque Country/Euskal Herriko Unibertsitatea. Leioa, Spain.

[‡] Department of Dental Surgery, Faculty of Dental Surgery, University of Malta, Malta.

Correspondence address: Dr. José Manuel Aguirre-Urizar. Departamento de Estomatología II, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/ EHU. Barrio Sarriena sn. Leioa 48940. España.

Tel: +34946012924/2917

E-mail: josemanuel.aguirre@ehu.eus

Keywords: chronic periodontitis; *Candida*; oral colonization; oral rinse; paper points; Basque Country.

ABSTRACT

Background

To analyze the oral *Candida* carriage in patients from the Basque Country suffering from chronic periodontitis (CP) and its correlation with the severity of this condition.

Methods

Microbiological samples were taken from 155 patients using the oral rinse (OR) technique and by using paper points in the periodontal pockets (GPP). These patients were divided into 3 groups: 89 patients without CP (control), 47 with moderate and 19 with severe CP. Samples were cultured in a *Candida* chromogenic agar for *Candida*. Species were identified by microbiological and molecular methods.

Results

Candida was isolated in the ORs of 45 (50.6%), 21 (44.7%) and 11 (57.9%) patients and in the GPPs of 32 (36%), 14 (29.2%) and 10 (42.6%) patients from the control, moderate CP and severe CP groups, respectively. *Candida* was isolated more frequently and in a heavier burden in ORs than in GPPs ($p < 0.01$). *Candida albicans* was the most prevalent species. GPPs of patients with CP presented a poor fungal biodiversity ($p < 0.01$).

Conclusions

The presence of *Candida* in the GPP is not correlated with the CP or its severity. Nonetheless, patients with severe CP have a higher rate of *Candida* colonization, especially by *C. albicans*.

INTRODUCTION

Chronic periodontitis (CP) is a frequent inflammatory process of the periodontal connective tissue associated with an insertion loss of the periodontal ligament and the reabsorption of the alveolar bone ¹. CP is diagnosed clinically by assessing the clinical attachment loss (CAL) and the presence of periodontal pockets ². CP can lead to tooth loss and is a risk factor for the development of systemic diseases ³. CP may be localized or generalized and is more common in adults ⁴. In Spain, severe CP is present in 31.5% of the people over 65 years of age ⁵.

Although some key periodontopathogens have been identified, CP occurs due to a complex interaction between the subgingival microbiota (aerobic and anaerobic bacteria and yeasts), the host susceptibility and environmental factors ^{6,7}.

Candida can colonize and infect the oral cavity ⁸, especially in patients with facilitating local and systemic factors ^{7,9-11} such as the presence of periodontal pockets in CP, oral niches that favour *Candida* colonization and multiplication ^{7,9}.

Sardi *et al.* ¹¹ suggest the potential implication of *Candida* in the inflammatory and destructive process in the CP. Oral *Candida albicans* has been isolated in 5 to 47% of the patients with CP, although its exact role in this disease is yet unknown ^{7,10,12-17}.

Considering that in Spain, studies on the possible participation and association of *Candida* with the CP are lacking, the main objective of this study has been to analyze the oral *Candida* carriage in adult patients with CP in our environment and its correlation with the severity of this important oral disease.

MATERIAL AND METHODS

Patients

A case-control study was performed on 155 consecutive patients that attended a check-up or review appointment at the Dental Clinic Service of the University of the Basque Country. The study was approved by the Ethics Committee of the UPV/EHU (CEISH/23/2010). Study sample consisted of 70 females (45.2%) and 85 males (54.8%) with a mean age of 48.2 years (age range between 30 and 81 years).

A minimum age of 30 years was required to be included in the study; while those patients undergoing treatment with antimicrobial agents, immunosuppressant drugs or chemotherapy during the previous month were excluded, as well as patients with loss of more than 10 teeth or presenting oral candidiasis or other oral soft tissue conditions, suffering from a chronic uncontrolled disease (diabetes, hypothyroidism, etc.) or, in the case of the female patients, being pregnant. A medical history and a complete periodontal examination with a graded periodontal probe (PCP-UNC 15 Hu Friedy Mfg. Co., Frankfurt, Germany) were performed in all cases.

Patients were classified according to the diagnosis and severity of CP based on the clinical periodontal index for treatment needs (CPITN index) proposed by the World Health Organization and the CAL index of the American Academy of Periodontology^{1,4,18}.

Based on these indexes, the patients were classified in the following three groups:

A) Control group (CG) with 89 patients without CP, 43 females (48.3%) and 46 males (51.7%), a mean age of 43.9 years (range 30-78), and with a CPITN < 3 and a CAL < 1.

B) Moderate CP group (MCP) with 47 patients, 20 females (42.6%) and 27 males (57.4%), a mean age of 53.5 years (range 30-81), and a CPITN = 3 and/or a CAL between 2 and 5.

C) Severe CP group (SCP) with 19 patients, 7 females (36.8%) and 12 males (63.2%), with a mean age of 55 years (range 33-77), and a CPITN of 4 and/or a CAL > 5.

Clinical specimens

Two oral samples were gathered for the microbiological study, a general sample of the oral cavity obtained through a thorough oral rinse (OR) with 25 ml of distilled water for 1 minute and placed in 50 ml polystyrene tubes^{14,19,20}, and a periodontal pocket sample (gingival paper point: GPP) obtained with a sterile paper point introduced in the gingival sulcus for 10 seconds, after previously securing relative isolation and drying the tooth. The GPP was then deposited in a tube containing 2.5 ml of sterile distilled water^{9,10,14,16} (Figure 1A). GPPs were taken from the following teeth: 3, 19 and 25²¹.

Culture, isolation and identification of *Candida*

After centrifugation at 4000 rpm for 10 minutes, 100 µl of the sediment of the OR or 50 µl of the GPPs were cultured on ChromID *Candida* chromogenic agar plates (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France) and incubated at 36 ± 1 °C. The growth after 24, 48 and 72 hours was recorded by counting the number of colony forming units (CFUs) and by studying the morphological characteristics of the colonies (colour, shape and texture) in order to give a presumptive identification of the species of *Candida* present^{20,22,23} (Figure 1B). Negative growth was considered after 10 days of incubation when the cultures were discarded.

The yeasts were identified with the API ID 32C (BioMérieux) that performs the analysis by doing biochemical and physiological tests. The final differentiation between *C. albicans* and *Candida dubliniensis*, observed in ChromID *Candida* agar as blue colonies, was performed through a conventional multi-detection PCR by amplifying the *hwp1* gene that differentiates *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *Candida africana*^{20,24,25}.

Statistical analysis

The data were analyzed with statistic software (SPSS 15.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). For the continuous variables, the normal distribution was measured with the Kolmogórov-Smirnov test. The mean differences were analyzed with the student t-test and the ANOVA test for parametric samples, and the U Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests for

non-parametric samples. The categorical variables were compared using the Fisher's exact test and the correlation between continuous variables was performed with the Pearson correlation test (parametric) or Spearman test (non-parametric). Significance was considered when $p < 0.05$. The biodiversity of the yeast species in the samples was calculated with the Simpson's

diversity index $[I = 1 - \sum_i \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}]^{14,26}$.

RESULTS

Gender distribution showed no differences among the studied groups of patients; however, differences were observed in relation to the mean age, lower in the control group ($p < 0.01$).

Candida was isolated in half of the samples obtained by OR and in one-third of those obtained by GPP ($p < 0.01$) (Table 1). This was similar among the three groups of study, although slightly higher in patients from the SCP group ($p = 0.065$) (Table 1).

The mean CFUs obtained with the ORs was significantly higher than with the GPPs ($p < 0.01$) (Table 2). The SCP group had a higher mean of *Candida* CFUs, although statistically non-significant, than the other two groups of study ($p = 0.3$) (Table 2).

C. albicans was isolated both in pure culture and in mixed cultures from the ORs with *Candida parapsilosis*, *Candida lipolytica*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Candida colicullosa*. Furthermore, other 9 *Candida* species were isolated in pure cultures in the ORs, the most significant being *C. parapsilosis* and *C. dubliniensis*. Other fungal genera were also isolated but in a lower frequency (Tables 3 and 4).

C. albicans was isolated from GPPs in 67.8% of the patients, 8.9% of which were mixed cultures (Table 3). The species isolated with *C. albicans* were *C. parapsilosis*, *C. lipolytica*, *C. glabrata*, *Candida famata* and *C. tropicalis*. Also, 7 non-*C. albicans* and 6 other fungal species were isolated from the GPPs (Tables 3 and 4).

The Simpson's biodiversity index scored 0.53 for CG, 0.55 for MCP and 0.17 for SCP in OR samples and 0.72 for CG, 0.33 for MCP and 0.094 for SCP in GPP samples ($p < 0.01$).

DISCUSSION

The relationship between *Candida* colonization and CP is controversial, although a high burden of yeasts in the periodontal pockets is considered to worsen the disease^{27,28}. Furthermore, our study fails to distinguish, based on oral *Candida* colonization, between patients with and without CP, although CP patients showed a higher colonization. Colonization was observed in

more than half of our patients with deep pockets (SCP), compared to the 26.4% of the patients reported by Barros et al. ⁹. In addition, only the periodontal pockets were colonized in several patients, justifying taking general (OR) and specific (GPP) oral samples to assess the implication of *Candida* in CP ^{14,28}. According to other studies ^{9,14}, *Candida* was more frequently isolated in ORs than in GPPs, differing from the observations of McManus et al. ²⁸. Moreover, the entire sample of our patients showed a higher colonization than Urzua et al ¹⁴, with higher percentages of colonization in the SCP group although the differences were not significant, in contrast with the study of McManus et al. ²⁸. This might correlate with the different populations of study, where control patients may show a lower colonization by *Candida*. Furthermore, the group distribution and the methodology are different, resulting in a complex comparative analysis. In the same line, we observed high percentages of colonization of the periodontal pockets, especially in the SCP group. Other studies ^{9,16,29} have shown very variable percentages (3-47%) of colonization of the periodontal pockets in patients with SCP.

We were unable to confirm the statistically significant relation between the colonization of *Candida* and the severity of CP, described by Canabarro et al.¹⁶, or its use as a predictor of the severity of CP. Nonetheless, based on the number of CFUs, the severity of CP correlated with a heavier fungal burden and, as described by Urzua et al. ¹⁴, the number of CFUs/ml in samples of patients with SCP was higher. However, the number of CFUs in the periodontal pockets was lower than in the ORs, in contrast with the results described by Barros et al. ⁹ and McManus et al. ²⁸.

In our study, 19 different fungal species were isolated, with a lower biodiversity in SCP group, in agreement with Urzua et al. ¹⁴, but disagreeing with Canabarro et al. ¹⁶ that observed a higher variety of species in deep periodontal pockets. Nonetheless, other studies, such as Krom et al. and Cho et al. ^{6,30} describe a decrease in the microbial diversity in the established disease. This lower diversity of fungal species in SCP might be due to selection and persistence of better adapted species to the oral niche such as *C. albicans*, a species that was isolated particularly in patients with CP, showing similar results to other studies ^{9,21}. The non-*C. albicans* species of

Candida most frequently isolated were *C. parapsilosis* and *C. dubliniensis*, corresponding to what has been described in other similar studies ^{14,21}.

Jewtuchowicz et al.²¹ and McManus et al. ²⁸ described *C. dubliniensis* in patients with CP. However, in our study, *C. dubliniensis* was more frequent in the CG than in CP group.

The presence of *C. parapsilosis* in the periodontal pockets of our patients with CP differs from a study performed in Argentina by Jewtuchowicz et al ²¹. We consider that these differences might be related to geographical differences, as the different aetiology of some fungal infections have been recognized according to the geographic location and the infectious niche ^{31,32}. Furthermore, we consider of importance to emphasize on the isolation of *C. glabrata* and *C. krusei* in these patients as they are acknowledged emergent oral pathogens resistant to fluconazole and other antifungal drugs ^{8,11}.

Without a doubt, *C. albicans* is the species with the highest pathogenic potential due to its different properties and virulence factors that allow them to remain in periodontal pockets and to resist its elimination through hygiene ³³⁻³⁵. Several authors ^{7,17} have observed hyphae on the border of the sulcular epithelium and in the subepithelial connective tissue which favour the adhesion and the tissue invasion, as well as the coaggregation with other microbial species and the progression of the CP. This coaggregation with some bacteria may act as a barrier and hinder the access of the antimicrobial molecules or even the immunoglobulins present in the oral cavity and might reduce or block the therapeutic action of the antibiotics ^{36,37}. The ability of *C. albicans* to grow in aerobic and anaerobic environments enables its adaptation to the microenvironment of the periodontal pocket and the crevicular fluid ^{7,11,18,38}.

The ability of *C. albicans* to coaggregate with bacteria forming mixed biofilms and enhancing adhesion ^{11,35,39}, as occurs in supra and subgingival dental plaque ⁸, stands out among the characteristics that make *C. albicans* an active participant of the inflammatory and destructive process of chronic periodontal disease ¹⁸. Symbiosis, antagonism and commensalism among the different microorganisms of the dental plaque are phenomena observed in CP ^{40,41}, particularly between *Candida* and some anaerobic bacteria (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella*

intermedia and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), crucial in the evolution of this disease¹⁷.

Candida has the ability of adapting to different niches of the oral cavity by expressing different phenotypes and virulence factors in relation to the pH, presence of oxygen, of polysaccharides, etc.^{11,18}. *Candida* segregates different proteinases that release toxic or antigenic agents that can perpetuate tissue inflammation and activate the immunologic response^{7,9,11,42}, similar to what happens with certain proteases of *Porphyromonas gingivalis* considered crucial in the pathogenesis of CP⁷. *Candida* is also capable of segregating phospholipases that facilitate its adhesion to tissues and degrade cellular membranes enabling cytolysis^{11,18}.

Scaling and root planning, together with a correct plaque control with good oral hygiene, is the standard treatment for CP⁴³. Nonetheless, some patients do not respond to this conventional treatment and must take more aggressive therapies, such as broad spectrum antibiotics, that can potentiate a superinfection by *Candida*, thus worsening the CP⁴². This situation may be aggravated if there is a previous oral colonization of *Candida*. This circumstance may be an important reason to assess oral *Candida* in patients diagnosed with CP, especially in those severe and/or recalcitrant-to-standard treatment cases, in order to include antifungal drugs in their therapeutic protocol of CP in those cases where there is an active growth⁴². Nowadays, there are several contributing therapies for CP such as laser and photodynamic application or toothpastes containing antifungal drugs that may eliminate *Candida*⁴⁴⁻⁴⁶ or probiotic therapies that prevent fungal overgrowth⁴⁷.

Future research directions

According to our results we consider that the investigation should continue to expand the sample of de SCP group in order to collect a statistically potential number of patients, and as possible to follow their treatment. It can also be interesting to try antifungal therapy in those patients with important *Candida* growth. The standardization of the sampling methods and the

criteria for establishing the groups in this type of studies is interesting so that the comparison between different experiments could be easier.

Conclusions

Half of our patients with CP were colonized by *Candida*, being more frequent and more numerous in the general oral colonization than in the periodontal pockets. Although we were unable to determine a direct relation between the presence of *Candida* and the severity of CP, our results indicate that the patients with severe disease show colonization by *Candida* more frequently and in a higher quantity. *C. albicans* is the most common species in these patients and is recognized as the most pathogenic, showing some properties and virulence factors that make it the candidate to play a role in pathogenesis, progression and maintenance of CP lesions. The frequent fungal colonization of the periodontal pockets justifies the need to consider it in the therapeutic protocol of these patients.

Acknowledgment(s) and conflict of interest

Cristina Marcos-Arias is recipient of a grant from Fundación ONCE («Oportunidad al Talento»). Elena Eraso and Guillermo Quindós have received grant support from Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (S-PR12UN002, S-PE13UN121) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI11/00203), and UPV/EHU (UFI 11/25).

In the past 5 years, Elena Eraso has received grant support from Astellas Pharma, and Pfizer SLU. Guillermo Quindós has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Pfizer SLU, Schering Plough and Merck Sharp and Dohme. He has been an advisor/consultant to Merck Sharp and Dohme, and has been paid for talks on behalf of Abbvie, Astellas Pharma, Esteve Hospital, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer SLU, and Schering Plough. Xabier Marichalar-Mendia, Amelia Acha-Sagredo and Jose Manuel Aguirre-Urizar are supported by a grant from Research Groups from the Government of the Basque Country (IT-809-13).

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

1. Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *J Clin Periodontol*. 2009;36(6):458-467.
2. Armitage GC. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 2003;74(8):1237-1247.
3. Gangula P, Ravella K, Chukkapalli S, et al. Polybacterial periodontal pathogens alter vascular and gut BH4/nNOS/NRF2-phase II enzyme expression. *Plos One*. 2015;10(6):e0129885. doi: 10.1371/journal.pone.0129885.
4. Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, et al. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the joint EU/USA periodontal epidemiology working group. *J Clin Periodontol*. 2015;42(5):407-412.
5. Bravo Pérez M, Casals Peidró E, Cortés Martinicorena FJ, Llodra Calvo JC. Encuesta de salud oral en españa 2005. *RCOE*. 2006; 11:409-456..
6. Cho T, Nagao J, Imayoshi R, Tanaka Y. Importance of diversity in the oral microbiota including *Candida* species revealed by high-throughput technologies. *Int J Dent*. 2014;2014:454391. doi: 10.1155/2014/454391.
7. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis*. 2004;10(2):106-112.
8. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 1):10-24.

9. Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Goncalves RB, Hofling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of brazilian periodontal patients. *Arch Oral Biol.* 2008;53(12):1172-1178.
10. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 2001;28(9):860-864.
11. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Hofling JF, Goncalves RB. *Candida spp.* in periodontal disease: A brief review. *J Oral Sci.* 2010;52(2):177-185.
12. Rams TE, Flynn MJ, Slots J. Subgingival microbial associations in severe human periodontitis. *Clin Infect Dis.* 1997;25 Suppl 2:S224-6.
13. Daniluk T, Tokajuk G, Cylwik-Rokicka D, Rozkiewicz D, Zaremba ML, Stokowska W. Aerobic and anaerobic bacteria in subgingival and supragingival plaques of adult patients with periodontal disease. *Adv Med Sci.* 2006;51 Suppl 1:81-85.
14. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol.* 2008;46(8):783-793.
15. Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Natri ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus spp* and *Candida spp* in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam.* 2010;23(1):20-26.
16. Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013;48(4):428-432.

17. Rubio NA, Puia S, Toranzo S, Brusca MI. Fungal invasion of connective tissue in patients with gingival-periodontal disease. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(1):20-24. doi: 10.1016/j.riam.2012.07.002.
18. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Marques MR, Hofling JF, Goncalves RB. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. *Med Mycol.* 2012;50(1):43-49. doi: 10.3109/13693786.2011.586133.
19. Williams DW, Lewis MA. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000;6(1):3-11.
20. Byadarahally Raju S, Rajappa S. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *ISRN Dent.* 2011:487921. doi: 10.5402/2011/487921.
21. Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, et al. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(6):505-509.
22. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, et al. Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3340-3345.
23. Pravin Charles MV, Kali A, Joseph NM. Performance of chromogenic media for *Candida* in rapid presumptive identification of *Candida* species from clinical materials. *Pharmacognosy Res.* 2015;7(Suppl 1):S69-73. doi: 10.4103/0974-8490.150528.
24. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(2):230-233.

25. Monteiro-da-Silva F, Araujo R, Sampaio-Maia B. Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. *Med Mycol.* 2014;52(5):498-505.
26. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988;26(11):2465-2466.
27. Mun MS, Yap T, Alnuaimi AD, Adams GG, McCullough MJ. Oral candidal carriage in asymptomatic patients. *Aust Dent J.* 2015. doi: 10.1111/adj.12335.
28. McManus BA, Maguire R, Cashin PJ, et al. Enrichment of multilocus sequence typing clade 1 with oral *Candida albicans* isolates in patients with untreated periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2012;50(10):3335-3344.
29. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999;26(3):143-152.
30. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: Forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res.* 2014;93(5):445-451.
31. Kamikawa Y, Mori Y, Nagayama T, et al. Frequency of clinically isolated strains of oral *Candida* species at Kagoshima university hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2006-2007 and 2012-2013. *BMC Oral Health.* 2014;14:14-6831-14-14. doi: 10.1186/1472-6831-14-14.
32. Pfaller MA, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Antifungal susceptibilities of *Candida*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* from the Asia and Western Pacific region: Data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010-2012). *J Antibiot (Tokyo).* 2015. doi: 10.1038/ja.2015.29 [doi].

33. Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ.* 2001;65(8):785-787.
34. Villar-Vidal M, Marcos-Arias C, Eraso E, Quindos G. Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(9):660-665.
35. Machado AG, Komiyama EY, Santos SS, Jorge AO, Brighenti FL, Koga-Ito CY. In vitro adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(4):384-387.
36. Edwards JE, Jr. Fungal cell wall vaccines: An update. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 7):895-903.
37. Moragues MD, Rementeria A, Sevilla MJ, Eraso E, Quindos G. *Candida* antigens and immune responses: Implications for a vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(8):1001-1012.
38. Pizzo G, Barchiesi F, Falconi Di Francesco L, et al. Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival *Candida albicans* isolates. *Arch Oral Biol.* 2002;47(3):189-196.
39. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: A sticky situation. *Plos Pathog.* 2013;9(10):e1003616. doi: 10.1371/journal.ppat.1003616.
40. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *Plos Pathog.* 2010;6(4):e1000886. doi: 10.1371/journal.ppat.1000886.
41. Guo Y, Wei C, Liu C, et al. Inhibitory effects of oral *Actinomyces* on the proliferation, virulence and biofilm formation of *Candida albicans*. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1368-1374.

42. Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites-a brief review. *Arch Oral Biol.* 2011;56(10):951-959.
43. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Periodontología clínica e implantología odontológica.* 4 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005: 435-448.
44. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, et al. Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc.* 2015;146(7):525-535.
45. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using photodithazine(R) against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14(7):1319-1328.
46. Reis CP, Roque LV, Baptista M, Rijo P. Innovative formulation of nystatin particulate systems in toothpaste for candidiasis treatment. *Pharm Dev Technol.* 2015:1-6. doi: 10.3109/10837450.2014.999783.
47. Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2015;6(1):29-39.

Figure 1A. Oral microbiological sampling of the periodontal pocket of a lower incisor using a sterile paper point.



Figure1B. *Candida* growth in *Candida* chromogenic agar.

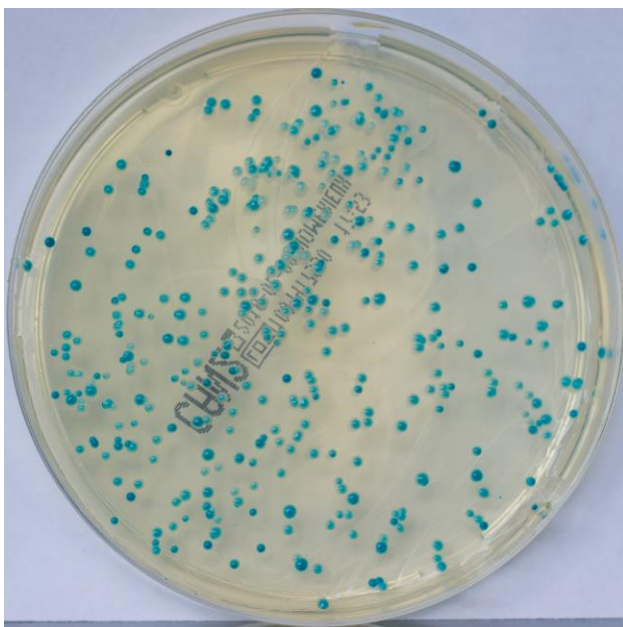


Table 1. Positive *Candida* colonization according to the groups and the sampling method.

GROUP				
Sampling method	CONTROL (89)	MCP (47)	SCP (19)	TOTAL (155)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
OR	45 (50.6)	21 (44.7)	11 (57.9)	77 (49.6)
GPP	32 (36)	14 (29.2)	10 (42.6)	56 (36)
OR + GPP	30 (33.7)	12 (25)	10 (52.36)	52 (33.3)

*MCP= moderate chronic periodontitis, SCP= severe chronic periodontitis, OR= oral rinse, GPP= gingival paper point

Table 2. Mean CFUs/ml for each group of study and sampling method.

Sampling method	GROUP			
	CONTROL(n=89)	MCP (n=47)	SCP (n=19)	TOTAL (n=155)
	mean CFUs/ml ± SD	mean CFUs/ml ± SD	mean CFUs/ml ± SD	mean CFUs/ml ± SD
OR	416.5 ± 1205.3	282.9 ± 892	886.8±177.1	432.7±1209.5
GPP	148.5 ± 552.9	124 ± 390.2	371.4±829.7	166.8±551.25

MCP= moderate chronic periodontitis, SCP= severe chronic periodontitis, OR= oral rinse,
GPP= gingival paper point.

Table 3. Fungal species according to group of patients and sampling method.

Species	GROUP					
	CONTROL		MCP		SCP	
	OR	GPP	OR	GPP	OR	GPP
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>C. albicans</i>	33 (73.3)	22 (68.7)	16 (76.2)	10 (71.4)	8 (72.7)	6 (60)
Non- <i>C. albicans</i> ¹	12 (26.6)	9 (28.1)	6 (28.6)	4 (28.6)	3 (27.3)	3 (30)
Other yeasts ²	4 (8)	2 (6.2)	1 (4.7)	–	1 (9)	2 (20)
Mixed colonization ³	7 (15)	4 (12.5)	2 (9.5)	–	2 (18.2)	1 (10)

MCP= moderate chronic periodontitis, SCP= severe chronic periodontitis, OR= oral rinse, GPP= gingival paper point.

1. *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, *C. quercitrusa*, *C. lipolytica*, and *C. krusei*.
2. *Debariomyces hansemii*, *Filobasidium unigutulatum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus*, *Aureobasidium pullulans* and *Zygosaccaromyces* spp.
3. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. colicullosa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula*.

Table 4. Number of CFUs/ml isolated according to species, group of patients and sampling method.

Species	GROUP					
	Control		MCP		SCP	
	OR*	GPP*	OR*	GPP*	OR*	GPP*
	CFUs/ml (%)	CFUs/ml (%)	CFUs/ml (%)	CFUs/ml (%)	CFUs/ml (%)	CFUs/ml (%)
<i>C. albicans</i>	24430 (66)	18080 (46.5)	7740 (55.8)	13060 (79.7)	15050 (91)	18040 (95.15)
<i>C. parapsilosis</i>	470 (1.3)	6200 (16)	5500 (39.6)	3060 (18.7)	280 (1.7)	20 (0.1)
<i>C. krusei</i>	5550 (15)	5040 (13)	–	–	–	–
<i>C. glabrata</i>	2750 (7.4)	2800 (7.2)	20 (0.14)	20 (0.12)	–	–
<i>C. dubliniensis</i>	2640 (7.1)	1540 (4)	10 (0.07)	20 (0.12)	80 (0.5)	100 (0.53)
<i>C. tropicalis</i>	–	–	450 (3.2)	220 (1.3)	250 (1.5)	180 (0.9)
<i>C. lipolytica</i>	170 (0.46)	20 (0.05)	70 (0.5)	–	250 (1.5)	240 (1.3)
<i>C. guilliermondii</i>	70 (0.2)	20 (0.05)	–	–	–	–
<i>C. colliculosa</i>	–	–	70 (0.5)	–	–	–
<i>C. rugosa</i>	–	–	10 (0.07)	–	–	–
<i>C. quercitrusa</i>	–	–	10 (0.07)	–	–	–
Others¹	990 (2.67)	180 (0.46)	–	–	640 (3.86)	380 (2)

*MCP= moderate chronic periodontitis, SCP= severe chronic periodontitis, OR= oral rinse, GPP= gingival paper point.

1. *Debariomyces hansemii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Zygosaccaromyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Filobasidium unigutulatum*, *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*.

-ESTUDIO 3-

Actividad *in vitro* de fármacos antifúngicos contra aislamientos orales de *Candida* de pacientes con caries y/o enfermedad periodontal crónica.

(Mycopathologia 2016: enviado)

Se estudió la sensibilidad *in vitro* a los fármacos antifúngicos polienos AMB y NYS (Sigma-Aldrich, EEUU) y a los azoles FLZ, ITZ y MCZ (Sigma-Aldrich, EEUU), PSZ (Merck & Co., EEUU) y VRZ (Pfizer SLU, Inglaterra) de 126 aislamientos procedentes de 61 pacientes, 24 mujeres (39,3%, media edad 47,25 años 19-66) y 37 hombres (60,7%, media edad 48, 20-77) que incluían 75 *Candida albicans*, 18 *Candida parapsilosis*, 11 *Candida dubliniensis*, 6 *Candida guilliermondii*, 5 *Candida lipolytica*, 5 *Candida glabrata*, 4 *Candida tropicalis* y dos aislamientos de *Candida krusei*.

La mayoría de los fármacos resultaron ser muy efectivos contra los aislamientos orales de *Candida* con una tasa de resistencia inferior al 5%. Los datos de la sensibilidad *in vitro* y de los porcentajes de resistencia se muestran de forma más detallada en las tablas 1-4 del manuscrito 3.

El MCZ resultó ser el fármaco antifúngico más efectivo, ya que 124 de los 126 aislamientos estudiados fueron sensibles o considerados salvajes en su comportamiento de sensibilidad a este fármaco. El FLZ también fue muy efectivo, con sólo 4 aislamientos resistentes (3,2%). Dos de los 75 aislamientos de *Candida albicans* (2,7%) fueron resistentes al FLZ y los dos aislamientos de *Candida krusei*, especie a la que se considera intrínsecamente resistente.

Dos aislamientos de *Candida albicans* y uno de los 5 de *Candida glabrata* estudiados se categorizaron como no salvajes para la AMB según los puntos de corte epidemiológicos, lo que indica una posible presencia de mecanismos de resistencia a este fármaco poliénico en estos aislamientos.

De los 126 aislamientos procesados, 122 (96,8%) fueron sensibles tanto a ITZ como a PSZ, aunque los cuatro (3,2%) aislamientos de *Candida albicans* fueron clasificados como sensibles dependientes de la dosis para ITZ. Cuatro aislamientos fueron

clasificados como no salvajes para PSZ: dos *Candida albicans* (2,7%) y dos *Candida tropicalis* (50%). Tres aislamientos de *Candida albicans* (2,4%) fueron categorizados como no salvajes para el VRZ, pero no se clasificaron como resistentes según los puntos de corte clínico establecidos para este fármaco. La NYS fue el fármaco antifúngico con peor actividad in vitro en el estudio ya que 36 de los 126 aislamientos clínicos analizados (28,6%) se categorizaron como no salvajes según los puntos de corte epidemiológicos. Estas cepas incluyeron 18 *Candida albicans* (8%), 4 *Candida parapsilosis* (22,2%), 4 *Candida tropicalis* (100%), 3 *Candida glabrata* (60%), 2 *Candida dubliniensis* (18,2%), 2 *Candida lipolytica* (40%), y una *Candida guilliermondii* (16,7%).

Hubo varios aislamientos que mostraron resistencias cruzadas o una combinación de resistencias y cepas no salvajes para diversos fármacos antifúngicos. Uno de los aislamientos de *Candida albicans* fue resistente al FLZ y no salvaje para la NYS, mientras que otro fue no salvaje para NYS y VRZ y además sensible dosis dependiente para el ITZ. Dos de los aislamientos considerados no salvajes para FLZ mostraron también una menor sensibilidad a otro fármaco antifúngico (NYS, ITZ o PSZ).

Finalmente, una cepa de *Candida glabrata* resultó ser resistente para AMB y no salvaje para NYS mientras que dos de las cepas de *Candida tropicalis* se consideraron no salvajes para NYS y PSZ.

La tasa global de resistencias no fue diferente entre los distintos grupos desde el punto de vista estadístico, ni tampoco entre los enjuagues y las muestras de las puntas de papel. No hubo relación entre la gravedad o la presencia o la ausencia de caries ni de enfermedad periodontal de las cepas orales colonizadoras de *Candida* con la sensibilidad a los fármacos antifúngicos.

In vitro antifungal susceptibility of oral *Candida* isolates from patients suffering from caries and chronic periodontitis

Janire De-la-Torre^{1,2}, María Esther Ortiz-Samperio¹, Cristina Marcos-Arias¹, Xabier Marichalar-Mendia², Elena Eraso¹, María Ángeles Echebarria-Goicouria², José Manuel Aguirre-Urizar², and Guillermo Quindós^{1*}

¹Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, UFI 11/25, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain.

²Unidad de Medicina Bucal, Servicio Clínica Odontológica, Departamento de Estomatología II, UFI 11/25, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain.

*Corresponding author: Dr. Guillermo Quindós, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Apartado 699, E-48080 Bilbao, Spain. Tel.:+34 94 601 2854; Fax: +34 94 601 3495; E-mail: guillermo.quindos@ehu.eus

Abstract

Caries and chronic periodontitis are common oral diseases where a higher *Candida* colonization is reported. Antifungal agents could be adjuvant drugs for the therapy of both clinical conditions. The aim of the current study has been to evaluate the in vitro activities of conventional and new antifungal drugs against oral *Candida* isolates from patients suffering from caries and/or chronic periodontitis. In vitro activities of amphotericin B, fluconazole, itraconazole, miconazole, nystatin, posaconazole and voriconazole against 126 oral *Candida* isolates (75 *Candida albicans*, 18 *Candida parapsilosis*, 11 *Candida dubliniensis*, six *Candida guilliermondii*, five *Candida lipolytica*, five *Candida glabrata*, four *Candida tropicalis* and two *Candida krusei*.) from 61 patients were tested by the CLSI M27-A3 method. Most antifungal drugs were highly active and resistance was observed in less than 5% of tested isolates. Miconazole was the most active antifungal drug, being more than 98% of isolates susceptible. Fluconazole, itraconazole, and the new triazoles, posaconazole and voriconazole were also very active. Miconazole, fluconazole and voriconazole have excellent in vitro activities against all *Candida* isolates and could represent suitable treatment for a hypothetically adjunctive therapy of caries and chronic periodontitis.

Introduction

Caries and chronic periodontitis are common oral pathologies^{1,2} where an altered ecology of the oral microbiota could play an important etiological role³⁻⁵. A higher oral *Candida* colonization in patients suffering from caries suggests that could play a role in dental caries development⁶⁻⁸. Moreover, *Candida* has been isolated from supragingival and subgingival dental plaques⁹⁻¹¹ and it could influence on the inflammatory and destructive processes of chronic periodontitis¹². An adjuvant treatment with topical or oral antifungal agents may be beneficial for halting the progress of these chronic oral diseases or even improve their clinical evolution in certain situations¹³. For these reasons, the aim of this study has been to evaluate the in vitro activities of current and new antifungal drugs against oral *Candida* isolates from patients suffering from caries and/or chronic periodontitis.

Patients, materials and methods

Microorganisms

A total of 126 oral yeast isolates from 61 patients recruited in a prospective observational analytical study at the Unit of Oral Medicine of the Dental Clinic Service of the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) approved by the Ethics Committee for Research with Humans (reference CEISH/23/2010) were tested⁷. Samples were yielded from two types of oral specimens (oral rinses and gingival sulcus with a sterile paper point)^{9,14-17}. Isolates included 75 *Candida albicans*, 18 *Candida parapsilosis*, 11 *Candida dubliniensis*, 6 *Candida guilliermondii*, 5 *Candida lipolytica*,

5 *Candida glabrata*, 4 *Candida tropicalis* and 2 isolates of *Candida krusei*. Oral isolates identification was performed by physiological and molecular tests as previously described¹⁸⁻²¹. For caries categorization the DMF index (Decayed, Missing, Filled) proposed by WHO for oral health surveys was used²²⁻²⁵. For chronic periodontitis the clinical periodontal index for treatment needs index (CPITN) proposed by WHO, and the clinical attachment loss index (CAL: distance between cement-enamel line and gingival margin) proposed by the American Academy of Periodontology²⁶⁻²⁹ were used.

Isolates were classified into three groups according to the disease: Group 0 included isolates from patients without chronic periodontitis and without carious lesions (DMF < 6, CPITN < 3 and CAL < 1), group I included isolates from patients suffering from caries and without chronic periodontitis (CPITN =3, PIP 2-5 and DMF ≥ 6) and the group II included those patients with caries and chronic periodontitis (DMF ≥ 6, CPITN=4 y CAL > 5).

Antifungal susceptibility testing

Candida isolates were tested for in vitro susceptibility to amphotericin B (AMB), fluconazole (FLZ), itraconazole (ITZ), miconazole (MCZ), nystatin (NYS) (Sigma-Aldrich, USA), posaconazole (PSZ) (Merck & Co., USA), and voriconazole (VRZ) (Pfizer, UK). Stock solutions of all antifungal agents were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the final range of concentrations tested were 0.03-16 µg/ml for AMB, ITZ, MCZ, NYS, PSZ and VRZ, and 0.12-64 µg/ml for FLZ. Clinical Laboratory

Standards Institute (CLSI) broth microdilution testing was performed and interpreted as described in documents M27-A3 and M27-S4^{30,31} by using round bottom 96-well plates with RPMI 1640 medium supplemented with 0.2% glucose, and inocula adjusted to $1-5 \times 10^3$ cells/ml. Plates were incubated at 37 °C in a non-CO₂ microbiological incubator, and MIC values were determined visually after 24 h. MIC endpoint criteria was the lowest concentration that caused a significant inhibition of growth (MIC₂ inhibition $\geq 50\%$) related to that of the control growth. However, polyenes MICs corresponded to the lowest concentration that showed no growth (MIC₀: 100% reduction in growth).

Classification of isolates in terms of their susceptibilities to these antifungal drugs was based on clinical breakpoints (CBP) recommended in the documents M27-A3 and M27-S4³⁰⁻³³ as following:

For FLZ and *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, the MIC for susceptibility was ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, the MIC for susceptible-dose dependent was 4 $\mu\text{g/ml}$, and the MIC for resistance was ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. For FLZ and *C. glabrata*, the MIC for susceptible-dose dependent was 32 $\mu\text{g/ml}$ and the MIC for resistance was ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$. For VRZ and *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, the MIC for susceptibility was ≤ 0.125 $\mu\text{g/ml}$, the MIC for susceptible-intermediate was 0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$, and the MIC for resistance was ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$. For VRZ and *C. krusei*, the MIC for susceptibility was ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$, the MIC for susceptible-intermediate was 1 $\mu\text{g/ml}$, and the MIC for resistance was ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$. For ITZ and *C. albicans*, the MIC for susceptibility was ≤ 0.125 $\mu\text{g/ml}$, the MIC for susceptible-dose dependent was 0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$, and the MIC for resistance was ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$.

Interpretation criteria for resistance to AMB and PSZ have been not yet defined. For these drugs interpretation was done according to epidemiological cutoff values (ECV) as following: For PSZ the MIC to separate non wild type isolates was 0.06 µg/ml for *C. albicans*, 0.125 µg/ml for *C. tropicalis*, 0.25 µg/ml for *C. parapsilosis*, 0.5 µg/ml for *C. krusei* and 2 µg/ml for *C. glabrata* and *C. lipolytica*. The MICs to classify non wild type isolates for AMB was ≥ 2 µg/ml for all species.

CBPs or ECVs have not been defined for NYS and MCZ, so for the purpose of facilitating comparisons with other antifungal drugs, ECVs of AMB were selected for both.

CBPs for *C. dubliniensis* and *C. guilliermondii* have not been described yet, so we used de ECVs as described above³²⁻³⁴. *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as quality controls.

Data and statistical analysis

Data obtained were analyzed using the SPSS 22.0 program. The MIC₅₀, MIC₉₀ and range were calculated. The MIC₅₀ and MIC₉₀ were determined as the concentrations of antifungal agents that were able to inhibit 50% and 90% of the isolates, respectively. To compare differences among the MICs isolates from patients with disease and control patients, a Student's t-test was used and to compare the resistance rates between groups the Chi Square and the U-Mann Whitney tests were performed. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

Results

In vitro activities of the antifungal agents and the percentages of in vitro resistance are shown in tables 1-4. Most drugs were highly active against oral *Candida* isolates: resistance was observed in less than 5% of isolates. MCZ was the most active antifungal drug, as 124 out of 126 isolates (98.4%) were susceptible. MCZ MIC₅₀ was 0.030 µg/ml for *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* and *C. lipolytica* and 0.25 µg/ml for *C. guilliermondii* and *C. tropicalis*. FLZ was also very active and only 4 out of 126 isolates (3.2%) were resistant, 2 *C. albicans* and *C. krusei* isolates. Two isolates out of 75 *C. albicans* (2.7%) and one isolate out of 5 *C. glabrata* isolates were non-WT strains when AMB in vitro susceptibility was evaluated. One hundred and twenty two out of 126 (96.8%) isolates were susceptible to ITZ and PSZ. However, four isolates of *C. albicans* (3.2%) were SDD to ITZ. Moreover, 2 *C. albicans* (2.7%) and 2 *C. tropicalis* (50%) were categorized as non-WT for posaconazole. Three *C. albicans* isolates were non-WT strains for VRZ (2.4%), although they were not considered resistant to this drug based on the CBPs. NYS showed the lowest activity in vitro as 36 isolates (28.6%) were categorized as non-WT strains including 18 *C. albicans* (8%), 4 *C. parapsilosis* (22.2%), 4 *C. tropicalis*(100%), 3 *C. glabrata*(60%), 2 *C. dubliniensis*(18.2%), 2 *C. lipolytica* (40%), 2 *C. krusei*(100%), and 1 *C. guilliermondii*(16.7%). Several isolates showed cross-resistance or a combination of resistance and the category of non-WT strain: one *C. albicans* isolate was resistant to FLZ and non-WT for NYS, and another one to NYS, SDD to ITZ and non-WT to VRZ. Two *C. albicans* were non-WT for NYS and SDD to ITZ. There were 2 non-WT *C. albicans* strains for FLZ which also showed resistance to another drug (NYS, ITZ

or PSZ). Finally, one *C. glabrata* isolate was resistant to AMB and non-WT for NYS and two *C. tropicalis* were considered non-WT strains for NYS and PSZ.

There were no significant differences between the total resistance isolates rates in the different groups of patients, neither between the origin of the oral isolates (oral rinse – OR-or samples taken from gingival sulcus using sterile paper points –GPP-) in the mouth or the severity of caries and/or chronic periodontitis (Tables 2-4).

Discussion

In the hypothetical situation that antifungal drugs should be used for treating caries or chronic periodontitis, these drugs should be very active against *Candida* isolated from patients suffering from these diseases. Topical treatment with AMB, NYS or MCZ is common for the initial episodes of oral candidiasis, but immunocompromised patients suffering from recurrent episodes of candidiasis or from severe episodes are managed with oral FLZ, ITZ, PSZ, VRZ or even echinocandins^{33,35}. Moreover, the potential problem of antifungal resistance selection and emergence in species of *Candida* with different susceptibility profiles in the oral cavity of these patients can influence in the treatment and outcome of these diseases ³⁶.

In the current study, all antifungal drugs but NYS showed an excellent *in vitro* activity. The poorer activity of NYS is surprising as this antifungal drug is very efficacious in the treatment of oral candidiasis. There are not clinical breakpoints defined for NYS and the lack of standardization makes difficult to interpret the *in vitro* results. The low resistance to MCZ has been described by Waltimo et al.³⁷, but in the current study MCZ

presented a better activity than the reported by Kamikawa et al.³⁸. MCZ has long been used for the topical treatment of mucosal candidiasis³⁹, and the resistance rates remain low, although some studies could indicate that the repeated use of MCZ could be a risk of azole-resistant strains selection^{36,40}. Moreover, MCZ appears to have a potent antibiofilm effect⁴¹, and this activity could be very relevant for treating all those plaque-dependent oral diseases. Nowadays, there are several formulations of MCZ that permit to achieving very high MCZ concentrations in the oral mucosa^{39,42-44}.

FLZ is a widely used systemic antifungal agent that is well tolerated, with low toxicity and mild side effects; although in elderly patients with hyposialia there is a risk of low drug levels in the oral cavity⁴⁵. This drug is recommended as first option in moderate and severe oral candidiasis³³. Two *C. albicans* isolates were resistant to FLZ (1,6%). This resistance rate was lower than those rates reported in other studies^{35,38}. However, Razzagui et al.⁴⁶ found similar resistance rates. Four *C. albicans* were categorized as non-WT for FLZ. Other authors have not reported FLZ resistance in *Candida* isolates from patients suffering from periodontitis^{47,48}. Surprisingly, in the current study, the higher rate of resistance was observed in the control group, while Koga Ito et al.⁴⁹ described higher MICs in isolates from patients suffering from periodontitis than in isolates for controls, although the differences were no significant. Conversely to the described in other studies, we did not find FLZ resistance in the rest of the species of *Candida*. This FLZ resistance ranged from 14 to 17% for the emerging species *C. tropicalis*^{38,49}, *C. dubliniensis*^{47,50} and *C. glabrata*^{35,38}. Off than expected, two *C. krusei* isolates were susceptible to FLZ, this result matches with those of Kamikawa et al.³⁸;

however, according to CLSI guidelines, all *C. krusei* isolates are resistant to FLZ with independence of *in vitro* results^{30,31}.

In the current study, VRZ, PSZ, and in lesser extent ITZ, were very active against *Candida* isolates. These activities are similar to those described previously by other authors⁴⁶. VRZ and PSZ should be effective against FLZ resistant oral disease³³.

Kamikawa et al.³⁸ found a higher number of resistant and SDD *C. albicans* and *C. glabrata* in Japan.

Cross-resistance was found in 7 *C. albicans* isolates (9.3%), in one *C. glabrata* and one *C. tropicalis* (3.9% of the non-*C. albicans* isolates). These results are similar of those found by Marcos-Arias et al.⁵¹ studying *Candida* isolates from patients suffering from denture stomatitis. However, Patil et al.³⁶, reported a higher cross-resistance in non-*C. albicans* isolates than in *C. albicans* ones. Other authors pointed that cross resistance to different azoles is emerging^{37,52} mainly among *C. glabrata* and other non-*C. albicans* isolates.

However, in the current study only two ITZ-SDD *C. albicans* were cross-resistant to PSZ or VRZ. Pfaller et al.⁵³ surrogated the PSZ resistance to FLZ resistance. In the current study, as in the report of Marcos-Arias et al.⁵¹, a low *in vitro* susceptibility to VRZ or ITZ correlated to a lower susceptibility to other azole drugs. However, as described by Isham et al.⁵⁴ there was no cross-resistance between FLZ and MCZ.

Two *C. albicans* and one *C. glabrata* isolates from patients suffering from caries were categorized as non-WT for AMB. This low rate of AMB resistance has been widely described: Smiline et al.⁵⁵ isolated three AMB-resistant *C. albicans* directly from carious lesions and Kamikawa et al. found very low resistance rates in *Candida*³⁸. There are not previous reports of AMB resistance in *Candida* isolated from periodontitis samples^{37,49}.

Surprisingly, non-WT *Candida* isolates for NYS ranged from 18% to 100% for *C. krusei* and *C. tropicalis*. We should consider that there are not CBPs or ECVs for NYS, and we chose those ECVs marked for AMB, due to their similar mechanisms of action⁵¹. NYS MICs ranged between 1-4 µg/ml that are even lower than those MICs reported in other studies (1-8 µg/ml)^{48,54}. These MICs do not appear to correlate with the described notable clinical efficacy of NYS for treating mucosal and superficial candidiasis⁵⁶⁻⁵⁸. Moreover, NYS has recently been recommended as a first line antifungal drug for treating mild oral candidiasis^{33,36}.

In conclusion, according to their in vitro activities, most available topical and oral antifungal drugs are suitable for an hypothetically adjunctive treatment of caries and chronic periodontitis if this is required, as global antifungal resistance is very low (<5%) and cross-resistance extremely rare.

Acknowledgments

Cristina Marcos-Arias is recipient of a grant from Fundación ONCE («Oportunidad al Talento») and FEDER. Elena Eraso and Guillermo Quindós have received grant support from Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12 210-IT-696-13 and GIC12 210-IT-809-13) and Departamento de Industria, Comercio y Turismo (S-PE13UN121) of Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI11/00203), and UPV/EHU (UFI 11/25).

Conflict of interests

In the past 5 years, Elena Eraso has received grant support from Astellas Pharma, and Pfizer SLU. Guillermo Quindós has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Pfizer SLU, Schering Plough and Merck Sharp and Dohme. He has been an advisor/consultant to Merck Sharp and Dohme, and has been paid for talks on behalf of Abbvie, Astellas Pharma, Esteve Hospital, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer SLU, and Schering Plough. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

1. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: A sticky situation. *Plos Pathog.* 2013; 9:e1003616.
2. Gangula P, Ravella K, Chukkapalli S. Polybacterial periodontal pathogens alter vascular and gut BH4/nNOS/NRF2-phase II enzyme expression. *Plos One.* 2015; 10:e0129885.
3. Yang F, Zeng X, Ning K. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J.* 2012; 6:1-10.
4. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *Plos One.* 2013; 8:e65520.

5. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: Forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res.* 2014; 93:445-451.
6. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res.* 2010; 44:272-276.
7. De-la-Torre J, Marichalar-Mendia X, Varona-Barquin A, Marcos-Arias C, Eraso E, Aguirre-Urizar JM, Quindós G. Caries and *Candida* colonisation in adult patients in Basque Country (Spain). *Mycoses.* 2016; 59: 234-240.
8. Meurman JH, Parnanen P, Seneviratne CJ, Samaranayake LP, Saarinen AM, Kari K. Prevalence and antifungal drug sensitivity of non-*albicans* *Candida* in oral rinse samples of self-caring elderly. *Gerodontology.* 2011; 28:246-252.
9. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol.* 2008; 46:783-793.
10. Zijne V, van Leeuwen MB, Degener JE. Oral biofilm architecture on natural teeth. *Plos One.* 2010; 5:e9321.
11. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Marques MR, Hofling JF, Goncalves RB. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. *Med Mycol.* 2012; 50:43-49.
12. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Hofling JF, Goncalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: A brief review. *J Oral Sci.* 2010; 52:177-185.

13. Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites--a brief review. *Arch Oral Biol.* 2011; 56:951-959.
14. Williams DW, Lewis MA. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000; 6:3-11.
15. Byadarahally Raju S, Rajappa S. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *ISRN Dent.* 2011; 2011:487921.
16. Premkumar J, Ramani P, Chandrasekar T, Natesan A, Premkumar P. Detection of species diversity in oral *Candida* colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. *J Nat Sci Biol Med.* 2014; 5:148-154.
17. Matic Petrovic S, Cimbaljevic M, Radunovic M, Kuzmanovic Pfcicer J, Jotic A, Pucar A. Detection and sampling methods for isolation of *Candida* spp. from oral cavities in diabetics and non-diabetics. *Braz Oral Res.* 2015; 29. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0077.
18. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, Quindós G. Evaluation of the new chromogenic medium Candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3340-3345.
19. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 62:230-233.

20. Pravin Charles MV, Kali A, Joseph NM. Performance of chromogenic media for *Candida* in rapid presumptive identification of *Candida* species from clinical materials. *Pharmacognosy Res.* 2015; 7(Suppl 1):S69-S73.
21. Blignaut E, van Heerden WF. Molecular and histological association between *Candida albicans* from oral soft tissue and carious dentine of HIV-positive children. *Mycopathologia.* 2015; 180:193-201.
22. Bravo Pérez M, Casals Peidró E, Cortés Marticorena FJ, Llodra Calvo JC. Encuesta de salud oral en España 2005. *RCOE.* 2006; 11:409-456.
23. Becker T, Levin L, Shochat T, Einy S. How much does the DMFT index underestimate the need for restorative care? *J Dent Educ.* 2007; 71:677-681.
24. Jiang Q, Yu M, Min Z, Yi A, Chen D, Zhang Q. AP-PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in caries-free and caries-active subjects. *Mol Cell Biochem.* 2012; 365:159-164.
25. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: A systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015; 94:650-658.
26. Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *J Clin Periodontol.* 2009; 36:458-467.
27. Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013; 48:428-432.

28. Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the joint EU/USA periodontal epidemiology working group. *J Clin Periodontol*. 2015; 42:407-412.
29. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, Michalowicz BS, John MT, Gunsolley J, Cobb CM, Rossmann J, Harrel SK, Forrest JL, Hujoel PP, Noraian KW, Greenwell H, Frantsve-Hawley J, Estrich C, Hanson N. Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc*. 2015; 146:525-535.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and laboratory standards institute. reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts; approved standard, 3rd edition. CLSI document M27-S3. 2008.
31. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts, fourth informational supplement. CLSI document M27-S4. 2012.
32. Pfaller MA, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Antifungal susceptibilities of *Candida*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* from the Asia and Western Pacific region: Data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010-2012). *J Antibiot*. 2015; 68:556-61.
33. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America.. *Clin Infect Dis*. 2016; 62:e1-e50.

34. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:2846-2856.
35. Sanchez Vargas LO, Eraso E, Carrillo-Munoz AJ, Aguirre JM, Gaitan-Cepeda LA, Quindos G. In vitro activity of voriconazole against Mexican oral yeast isolates. *Mycoses.* 2010; 53:200-203.
36. Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol.* 2015; 6:1391.
37. Waltimo TM, Orstavik D, Meurman JH, Samaranayake LP, Haapasalo MP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* isolates from apical and marginal periodontitis to common antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15:245-248.
38. Kamikawa Y, Mori Y, Nagayama T. Frequency of clinically isolated strains of oral *Candida* species at Kagoshima University Hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2006-2007 and 2012-2013. *BMC Oral Health.* 2014; 14:14-6831-14-14.
39. Isham N, Ghannoum MA. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. *Mycoses.* 2010; 53:434-437.
40. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol.* 2011; 37:328-336.
41. Bensadoun RJ, Daoud J, El Gueddari B. Comparison of the efficacy and safety of miconazole 50-mg mucoadhesive buccal tablets with miconazole 500-mg gel in the treatment of oropharyngeal candidiasis: A prospective, randomized, single-blind,

multicenter, comparative, phase III trial in patients treated with radiotherapy for head and neck cancer. *Cancer*. 2008; 112:204-211.

42. Collins CD, Cookinham S, Smith J. Management of oropharyngeal candidiasis with localized oral miconazole therapy: Efficacy, safety, and patient acceptability. *Patient Prefer Adherence*. 2011; 5:369-374.

43. De Cremer K, Lanckacker E, Cools TL. Artemisinins, new miconazole potentiators resulting in increased activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:421-426.

44. Aljaeid BM, Hosny KM. Miconazole-loaded solid lipid nanoparticles: Formulation and evaluation of a novel formula with high bioavailability and antifungal activity. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11:441-447.

45. Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite J, Rautemaa R. Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 41:65-69.

46. Razzaghi-Abyaneh M, Sadeghi G, Zeinali E. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *J Mycol Med*. 2014; 24:e43-50.

47. Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT. Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta Odontol Latinoam*. 2007; 20:17-22.

48. Brito GN, Inocencio AC, Querido SM, Jorge AO, Koga-Ito CY. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individuals. *Braz Oral Res.* 2011; 25:28-33.
49. Ito CY, de Paiva Martins CA, Loberto JC, dos Santos SS, Jorge AO. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from patients with chronic periodontitis and from control patients. *Braz Oral Res.* 2004; 18:80-84.
50. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:617-623.
51. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Carrillo-Muñoz AJ, Quindos G. *In vitro* activities of new triazole antifungal agents, posaconazole and voriconazole, against oral *Candida* isolates from patients suffering from denture stomatitis. *Mycopathologia.* 2012; 173:35-46.
52. Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: Temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 82:303-313.
53. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: Results from a global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(2):551-559.

54. Isham N, Ghannoum MA. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. *Mycoses*. 2010; 53:434-437.
55. Smiline GA, Pandi SK, Hariprasad P, Raguraman R. A preliminary study on the screening of emerging drug resistance among the caries pathogens isolated from carious dentine. *Indian J Dent Res*. 2012; 23:26-30.
56. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*. 2010; 98:15-25.
57. Arikian S, Ostrosky-Zeichner L, Lozano-Chiu M. In vitro activity of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical *Candida* isolates. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:1406-1412.
58. Quindós G, Carrillo-Muñoz AJ, Ruesga MT, Alonso-Vargas R, Miranda Y, Tur-Tur C, Rubio M, Wallace TL, Cossum PA, Martín-Mazuelos E, Cisterna R, Pontón J. In vitro activity of a new liposomal nystatin formulation against opportunistic fungal pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19:645-648.

Table 1. In vitro activities of amphotericin B, nystatin, fluconazole, itraconazole, miconazole, posaconazole and voriconazole against oral *Candida* isolates.

Species (n)	Antifungal agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			ECV ($\mu\text{g/ml}$)		CBP ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	WT/%	NWT/%	S/%	SDD-I/%	R/%
<i>Candida albicans</i> (75)	Amphotericin B	0.5-4	1	2	73/97.3	2/2.7	.	.	.
	Nystatin	2-4	2	4	57/76	18/24			
	Fluconazole	0.12-64	0.12	0.5	69/92	6/8	73/97.3	0	2/2.7
	Itraconazole	0.03-0.25	0.03	0.06	71/94.7	4/5.3	71/94.7	4/5.3	0
	Miconazole	0.03-4	0.03	0.12	73/97.3	2/2.7			
	Posaconazole	0.03-0.25	0.03	0.06	73/97.3	2/2.7	.	.	.
	Voriconazole	0.03-0.06	0.03	0.03	72/96.	3/4.	75/100	0	0
<i>Candida parapsilosis</i> (18)	Amphotericin B	0.5-2	1	2	18/100	0			
	Nystatin	2-4	2	4	14/77.8	4/22.2			
	Fluconazole	0.12-1	0.25	0.5	18/100	0	18/100	0	0
	Itraconazole	0.03-0.12	0.03	0.12	18/100	0			
	Miconazole	0.03-0.25	0.03	0.12	18/100	0			
	Posaconazole	0.03-0.12	0.06	0.12	18/100	0			
	Voriconazole	0.03	0.03	0.03	18/100	0	18/100	0	0
<i>Candida dubliniensis</i> (11)	Amphotericin B	0.5-2	1	2	11/100	0			
	Nystatin	2-4	2	4	9/81.8	2/18.2			
	Fluconazole	0.12-0.25	0.12	0.12	11/100	0			
	Itraconazole	0.03-0.12	0.03	0.06	11/100	0			
	Miconazole	0.03	0.03	0.03	11/100	0			
	Posaconazole	0.03-0.06	0.03	0.06	11/100	0			
	Voriconazole	0.03	0.03	0.03	11/100	0			
	Amphotericin B	0.5-2	1	-	6/100	0			
	Nystatin	2-4	2	-	5/83.3	1/16.7			

<i>Candida guilliermondii</i> (6)	Fluconazole	1-8	2	-	6/100	0			
	Itraconazole	0.03-0.5	0.5	-	6/100	0			
	Miconazole	0.03-1	0.25	-	6/100	0			
	Posaconazole	0.06-0.5	0.25	-	6/100	0			
	Voriconazole	0.03-0.12	0.06	-	6/100	0			
<i>Candida glabrata</i> (5)	Amphotericin B	1-4	2	-	4/80	1/20			
	Nystatin	2-4	4	-	2/40	3/60			
	Fluconazole	0.5-16	4	-	5/100	0	5/100	0	0
	Itraconazole	0.5-2	0.5	-	5/100	0			
	Miconazole	0.03	0.03	-	5/100	0			
<i>Candida lipolytica</i> (5)	Posaconazole	0.12-0.5	0.5	-	5/100	0			
	Voriconazole	0.03-0.12	0.12	-	5/100	0	5/100	0	0
	Amphotericin B	1-2	1	-	5/100	0			
	Nystatin	2-4	2	-	3/60	2/40			
	Fluconazole	0.5-2	1	-	5/100	0	5/100	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (4)	Itraconazole	0.03-0.06	0.03	-	5/100	0			
	Miconazole	0.03	0.03	-	5/100	0			
	Posaconazole	0.03-0.25	0.06	-	5/100	0			
	Voriconazole	0.03	0.03	-	5/100	0	5/100	0	0
	Amphotericin B	1-2	1	-	4/100	0			
<i>Candida tropicalis</i> (4)	Nystatin	4	4	-	0	4/100			
	Fluconazole	0.5-2	1	-	4/100	0	4/100	0	0
	Itraconazole	0.06-0.25	0.12	-	4/100	0	4/100	0	0
	Miconazole	0.03-1	0.25	-	4/100	0			
	Posaconazole	0.03-0.25	0.06	-	2/50	2/50			
	Voriconazole	0.03-0.06	0.06		4/100	0	4/100	0	0

<i>Candida krusei</i> (2)	Amphotericin B	2	-	-	2/100	0			
	Nystatin	4	-	-	0	2/100			
	Fluconazole	16	-	-	2/100	0			
	Itraconazole	0.5	-	-	2/100	0			
	Miconazole	0.5	-	-	2/100	0			
	Posaconazole	0.25	-	-	2/100	0			
	Voriconazole	0.12	-	-	2/100	0	2/100	0	0
TOTAL (126)	Amphotericin B	0.5-4	1	2	123/97.6.	3/2.4.	.	.	.
	Nystatin	1-4	2	4	90/71.4	36/28.6			
	Fluconazole	0.12-64	0.12	2	120/95.2	6/4.8	122/96.8		4/3.2
	Itraconazole	0.03-2	0.03	0.25	122/96.8	4/3.2	122/96.8	4/3.2	0
	Miconazole	0.03-4	0.03	0.25	124/98.4.	2/1.6.	.	.	.
	Posaconazole	0.03-0.5	0.03	0.25	122/96.8	4/3.2	.	.	.
	Voriconazole	0.03-0.12	0.03	0.06	123/97.6.	3/2.4.	126/100	0	0

CBP: Clinical break points. ECV: Epidemiological cutoff values. WT: Wild type strains.
NWT: Non-wild type strains.

Table 2. In vitro activities of amphotericin B, nystatin, fluconazole, itraconazole, miconazole, posaconazole and voriconazole against oral *Candida* isolates from oral cavities of patients without disease (Group 0) determined by 24h CLSI broth microdilution methods.

Species (no.tested/sa mple)	Antifungal agent	% by category							
		MIC (µg/ml)			CBP			ECV	
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	S	SDD/I	R	WT	NWT
<i>C. albicans</i> (5) OR	Amphotericin B	1-2	1	-				5	0
	Nystatin	2-4	2	-				4	1
	Fluconazole	0.12-16	0.5	-	4	0	1	3	2
	Itraconazole	0.03-0.12	0.03	-	5	0	0	5	0
	Miconazole	0.03	0.03	-				5	0
	Posaconazole	0.03-0.06	0.03	-				5	0
	Voriconazole	0.03	0.03	-	5	0	0	5	0
<i>C. albicans</i> (4) GPP	Amphotericin B	1	1	-				4	0
	Nystatin	2	2	-				4	0
	Fluconazole	0.12-1	0.12	-	4	0	0	3	1
	Itraconazole	0.03-0.25	0.03	-	3	1	0	3	1
	Miconazole	0.03-0.25	0.03	-				4	0
	Posaconazole	0.03-0.25	0.03	-				3	1
	Voriconazole	0.03	0.03	-	4	0	0	4	0
<i>C. parapsilosis</i> (1) GPP	Amphotericin B	0.5	0.5	-				1	0
	Nystatin	2	2	-				1	0
	Fluconazole	0.12	0.12	-	1	0	0	1	0
	Itraconazole	0.03	0.03	-				1	0
	Miconazole	0.03	0.03	-				1	0
	Posaconazole	0.03	0.03	-				1	0
	Voriconazole	0.03	0.03	-	1	0	0	1	0
<i>C. dubliniensis</i>	Amphotericin B	2	2	-				2	0
	Nystatin	2	2	-				2	0

(2)	Fluconazole	0.12	0.12	-	2	0
OR	Itraconazole	0.03	0.03	-	2	0
	Miconazole	0.03	0.03	-	2	0
	Posaconazole	0.03	0.03	-	2	0
	Voriconazole	0.03	0.03	-	2	0
	Amphotericin B	1	1	-	1	0
	Nystatin	2	2	-	1	0
C. <i>dubliniensis</i> (1)	Fluconazole	0.5	0.5	-	1	0
	Itraconazole	0.03	0.03	-	1	0
GPP	Miconazole	0.03	0.03	-	1	0
	Posaconazole	0.03	0.03	-	1	0
	Voriconazole	0.03	0.03	-	1	0
	Amphotericin B	1-2	1	-	2	0
	Nystatin	2-4	2	-	1	1
C. <i>guilliermondii</i> (2)	Fluconazole	0.5-8	0.5	-	2	0
	Itraconazole	0.5	0.5	-	2	0
OR	Miconazole	0.03-0.5	0.03	-	2	0
	Posaconazole	0.06-0.5	0.06	-	2	0
	Voriconazole	0.06-0.12	0.06	-	2	0
	Amphotericin B	1-2	1	-	2	0
	Nystatin	2	2	-	2	0
C. <i>guilliermondii</i> (2)	Fluconazole	2-8	2	-	2	0
	Itraconazole	0.03-0.5	0.03	-	2	0
GPP	Miconazole	0.03-1	0.03	-	2	0
	Posaconazole	0.25-0.5	0.25	-	2	0
	Voriconazole	0.06-0.12	0.06	-	2	0

CBP: Clinical break points. ECV: Epidemiological cutoff values. WT: Wild type strains.
NWT: Non-wild type strains. OR: Oral rinse. GPP: Gingival paper point.

Table 3. In vitro activities of amphotericin B, nystatin, fluconazole, itraconazole, miconazole, posaconazole and voriconazole against oral *Candida* isolates from oral cavities of patients with caries (Group I) determined by 24h CLSI broth microdilution methods.

Species (no.tested/sa mple)	Antifungal agent	% by category							
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)			CBP			ECV	
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	S	SDD/I	R	WT	NWT
<i>C. albicans</i> (14) OR	Amphotericin B	1-4	1	2				13	1
	Nystatin	2-4	2	4				9	5
	Fluconazole	0.12-64	0.12	0.5	13	0	1	13	1
	Itraconazole	0.03-0.25	0.03	0.12	13	1	0	13	1
	Miconazole	0.03-4	0.03	0.25				13	1
	Posaconazole	0.03-0.06	0.03	0.06				14	0
	Voriconazole	0.03-0.06	0.03	0.03	14	0	0	14	0
<i>C. albicans</i> (24) GPP	Amphotericin B	0.5-4	1	2				23	1
	Nystatin	2-4	2	4				16	8
	Fluconazole	0.12-1	0.12	0.25	24	0	0	22	2
	Itraconazole	0.03-0.25	0.03	0.06	22	2	0	22	2
	Miconazole	0.03-4	0.03	0.03				23	1
	Posaconazole	0.03-0.06	0.03	0.06				24	0
	Voriconazole	0.03-0.06	0.03	0.03	24	0	0	23	1
<i>C. parapsilosis</i> (7) OR	Amphotericin B	1-2	1	-				7	0
	Nystatin	2-4	2	-				5	2
	Fluconazole	0.25-1	0.25	-	7	0	0	7	0
	Itraconazole	0.03-0.06	0.03	-				7	0
	Miconazole	0.03-0.25	0.03	-				7	0
	Posaconazole	0.03-0.12	0.06	-				7	0
	Voriconazole	0.03	0.03	-	7	0	0	7	0
<i>C. parapsilosis</i>	Amphotericin B	1-2	2	-				6	0

(6)	Nystatin	2-4	2	-				4	2
GPP	Fluconazole	0.12-0.5	0.25	-	6	0	0	6	0
	Itraconazole	0.03-0.12	0.03	-				6	0
	Miconazole	0.03-0.25	0.03	-				6	0
	Posaconazole	0.03-0.12	0.03	-				6	0
	Voriconazole	0.03	0.03	-	6		0	6	0
<hr/>									
	Amphotericin B	0.5	0.5	-				2	0
	Nystatin	1-2	1	-				2	0
C. <i>dubliniensis</i> (2)	Fluconazole	0.12	0.12	-				2	0
	Itraconazole	0.03	0.03	-				2	0
OR	Miconazole	0.03	0.03	-				2	0
	Posaconazole	0.03	0.03	-				2	0
	Voriconazole	0.03	0.03	-				2	0
	Amphotericin B	0.5-2	0.5	-				3	0
	Nystatin	1-4	2	-				2	1
C. <i>dubliniensis</i> (3)	Fluconazole	0.12	0.12	-				3	0
	Itraconazole	0.03-0.06	0.03	-				3	0
GPP	Miconazole	0.03	0.03	-				3	0
	Posaconazole	0.03-0.06	0.03	-				3	0
	Voriconazole	0.03	0.03	-				3	0
<hr/>									
	Amphotericin B	0.5	-	-				1	0
	Nystatin	2	-	-				1	0
C. <i>guilliermondii</i> (1)	Fluconazole	1	-	-				1	0
	Itraconazole	0.5	-	-				1	0
OR	Miconazole	0.25	-	-				1	0
	Posaconazole	0.25	-	-				1	0
	Voriconazole	0.06	-	-				1	0
C.	Amphotericin B	0.5	-	-				1	0

<i>guilliermondii</i> (1) GPP	Nystatin	2	-	-				1	0
	Fluconazole	1	-	-				1	0
	Itraconazole	0.5	-	-				1	0
	Miconazole	0.25	-	-				1	0
	Posaconazole	0.25	-	-				1	0
	Voriconazole	0.03	-	-				1	0
<hr/>									
<i>C. glabrata</i> (1) OR	Amphotericin B	2	-	-				1	0
	Nystatin	4	-	-				0	1
	Fluconazole	0.5	-	-	1	0	0	1	0
	Itraconazole	0.5	-	-				1	0
	Miconazole	0.03	-	-				1	0
	Posaconazole	0.12	-	-				1	0
Voriconazole	0.03	-	-				1	0	
<hr/>									
<i>C. glabrata</i> (2) GPP	Amphotericin B	2-4	-	-				1	1
	Nystatin	4	-	-				0	2
	Fluconazole	4-16	-	-	2	0	0	2	0
	Itraconazole	0.5-1	-	-				2	0
	Miconazole	0.03	-	-				2	0
	Posaconazole	0.5	-	-				2	0
Voriconazole	0.06-0.12	-	-				2	0	
<hr/>									
<i>C. lipolytica</i> (1) OR	Amphotericin B	1	-	-				1	0
	Nystatin	2	-	-				1	0
	Fluconazole	0.5	-	-	1	0	0	1	0
	Itraconazole	0.03	-	-				1	0
	Miconazole	0.03	-	-				1	0
	Posaconazole	0.03	-	-				1	0
Voriconazole	0.03	-	-				1	0	
<hr/>									
<i>C. lipolytica</i> (2)	Amphotericin B	1	-	-				2	0
	Nystatin	2-4	-	-				1	1

GPP	Fluconazole	1-2	-	-	2	0	0	2	0
	Itraconazole	0.03	-	-				2	0
	Miconazole	0.03	-	-				2	0
	Posaconazole	0.03	-	-				2	0
	Voriconazole	0.03	-	-				2	0
<hr/>									
C. krusei (1) OR	Amphotericin B	2	-	-				1	0
	Nystatin	4	-	-				0	1
	Fluconazole	16	-	-				1	0
	Itraconazole	0.5	-	-				1	0
	Miconazole	0.5	-	-				1	0
	Posaconazole	0.25	-	-				1	0
	Voriconazole	0.12	-	-	1	0	0	1	0
C. krusei (1) GPP	Amphotericin B	2	-	-				1	0
	Nystatin	4	-	-				0	1
	Fluconazole	16	-	-				1	0
	Itraconazole	0.5	-	-				1	0
	Miconazole	0.5	-	-				1	0
	Posaconazole	0.25	-	-				1	0
	Voriconazole	0.12	-	-	1	0	0	1	0

CBP: Clinical break points. ECV: Epidemiological cutoff values. WT: Wild type strains.
NWT: Non-wild type strains. OR: Oral rinse. GPP: Gingival paper point.

Table 4. In vitro activities of amphotericin B, nystatin, fluconazole, itraconazole, miconazole, posaconazole and voriconazole against oral *Candida* isolates from oral cavities of patients with chronic periodontitis (Group II) determined by 24h CLSI broth microdilution methods.

Species (no.tested/sa mple)	Antifungal agent	% by category							
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)			CLSI			ECV	
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	S	SDD/I	R	WT	NWT
<i>C. albicans</i> (11) OR	Amphotericin B	1-2	1	2				11	0
	Nystatin	2-4	2	4				9	2
	Fluconazole	0.12-0.25	0.12	0.25	11	0	0	11	0
	Itraconazole	0.03-0.06	0.03	0.06	11	0	0	11	0
	Miconazole	0.03-0.25	0.03	0.06				11	0
	Posaconazole	0.03-0.06	0.03	0.06				11	0
	Voriconazole	0.03			11	0	0	11	0
<i>C. albicans</i> (17) GPP	Amphotericin B	0.5-2	1	2				17	0
	Nystatin	2-4	2	4				15	2
	Fluconazole	0.12-0.25	0.12	0.25	17	0	0	17	0
	Itraconazole	0.03-0.06	0.03	0.06	17	0	0	17	0
	Miconazole	0.03-1	0.03	0.5				17	0
	Posaconazole	0.03-0.25	0.03	0.06				16	1
	Voriconazole	0.03-0.06	0.03	0.06	17	0	0	15	2
<i>C. parapsilosis</i> (2) OR	Amphotericin B	2	-	-				2	0
	Nystatin	0.5-1	-	-				2	0
	Fluconazole	0.25	-	-	2	0	0	2	0
	Itraconazole	0.03-0.06	-	-				2	0
	Miconazole	0.03-0.12	-	-				2	0
	Posaconazole	0.06-0.12	-	-				2	0
	Voriconazole	0.03	-	-	2	0	0	2	0
<i>C. parapsilosis</i>	Amphotericin B	0.5-1	-	-				2	0

(2)	Nystatin	2	-	-				2	0
GPP	Fluconazole	0.25	-	-	2	0	0	2	0
	Itraconazole	0.12	-	-				2	0
	Miconazole	0.03-0.12	-	-				2	0
	Posaconazole	0.03-0.12	-	-				2	0
	Voriconazole	0.03	-	-	2	0	0	2	0
<hr/>									
	Amphotericin B	1	-	-				1	0
	Nystatin	2	-	-				1	0
C. <i>dubliniensis</i> (1)	Fluconazole	0.12	-	-				1	0
	Itraconazole	0.06	-	-				1	0
OR	Miconazole	0.03	-	-				1	0
	Posaconazole	0.06	-	-				1	0
	Voriconazole	0.03	-	-				1	0
	Amphotericin B	1	-	-				2	0
	Nystatin	1-4	-	-				1	1
C. <i>dubliniensis</i> (2)	Fluconazole	0.12	-	-				2	0
	Itraconazole	0.06-0.12	-	-				2	0
GPP	Miconazole	0.03	-	-				2	0
	Posaconazole	0.06	-	-				2	0
	Voriconazole	0.03	-	-				2	0
<hr/>									
	Amphotericin B	2	-	-				1	0
	Nystatin	2	-	-				1	0
C. <i>glabrata</i> (1)	Fluconazole	2	-	-	1	0	0	1	0
	Itraconazole	0.5	-	-				1	0
OR	Miconazole	0.03	-	-				1	0
	Posaconazole	0.5	-	-				1	0
	Voriconazole	0.12	-	-				1	0
C. <i>glabrata</i> (1)	Amphotericin B	1	-	-				1	0
GPP	Nystatin	2	-	-				1	0

	Fluconazole	8	-	-	1	0	0	1	0
	Itraconazole	2	-	-				1	0
	Miconazole	0.03	-	-				1	0
	Posaconazole	0.25	-	-				1	0
	Voriconazole	0.12	-	-				1	0
<hr/>									
	Amphotericin B	2	-	-				1	0
	Nystatin	4	-	-				0	1
<i>C. lipolytica</i> (1)	Fluconazole	1	-	-	1	0	0	1	0
	Itraconazole	0.06	-	-				1	0
OR	Miconazole	0.03	-	-				1	0
	Posaconazole	0.25	-	-				1	0
	Voriconazole	0.03	-	-				1	0
<hr/>									
	Amphotericin B	2	-	-				1	0
	Nystatin	2	-	-				1	0
<i>C. lipolytica</i> (1)	Fluconazole	1	-	-	1	0	0	1	0
	Itraconazole	0.06	-	-				1	0
GPP	Miconazole	0.03	-	-				1	0
	Posaconazole	0.06	-	-				1	0
	Voriconazole	0.03	-	-				1	0
<hr/>									
	Amphotericin B	1	-	-				2	0
	Nystatin	4	-	-				0	2
<i>C. tropicalis</i> (2)	Fluconazole	1-2	-	-	2	0	0	2	0
	Itraconazole	0.06-0.25	-	-				2	0
OR	Miconazole	0.03-1	-	-				2	0
	Posaconazole	0.06-0.25	-	-				1	1
	Voriconazole	0.03-0.06	-	-	2	0	0	2	0
<hr/>									
<i>C. tropicalis</i> (2)	Amphotericin B	1-2	-	-	2			2	0
	Nystatin	4	-	-				0	2
GPP	Fluconazole	0.5-1	-	-	2	0	0	2	0

Itraconazole	0.12-0.5	-	-				2	0
Miconazole	0.25-1	-	-				2	0
Posaconazole	0.03-0.25	-	-				1	1
Voriconazole	0.06	-	-	2	0	0	2	0

CBP: Clinical break points. ECV: Epidemiological cutoff values. WT: Wild type strains.
NWT: Non-wild type strains. OR: Oral rinse. GPP: Gingival paper point.

5. DISCUSIÓN

La caries y la EPC son patologías muy prevalentes en los adultos y relacionadas con la presencia de placa dental^{12,13,140}. En aproximadamente el 50% de las personas *Candida* forma parte de los microorganismos presentes en dicha placa³⁻⁵. Por este motivo, se ha tratado de relacionar *Candida* con la caries⁶⁻¹¹ y con las formas más graves de la EPC^{14,15}. Sin embargo, aún no se conoce el papel exacto que *Candida* tiene en el desarrollo y/o mantenimiento de estas enfermedades¹⁸.

Se han desarrollado múltiples metodologías para la toma de muestras micológicas en la cavidad oral^{350,351}. En nuestro estudio, debido a las patologías que se iban a evaluar y a la sencillez de los métodos a emplear se escogieron dos tipos de toma de muestra, una mediante un OR con agua destilada estéril^{3,25,214,294,352,363} y otra mediante GPP para el muestreo de las bolsas periodontales^{3,15,241,349,353-355,363} (Figura 14). Para el estudio de la caries se emplearon únicamente los datos de los OR, pero para el estudio de la enfermedad periodontal se analizaron los datos de ambas muestras, de manera que hubo pacientes que sólo mostraron colonización en la mucosa (OR) y otros, en menor cantidad, que tenían crecimiento en la bolsa periodontal (GPP) exclusivamente. Estos resultados apoyan que las muestras se tomen tanto de enjuagues como de las bolsas periodontales en cada paciente, especialmente de los que padecen EPC, ya que de ese modo podemos obtener resultados más completos de la microbiota oral y de su relación con la EPC^{3,363}. Además, nos sirve como elemento comparativo entre las cepas de los distintos nichos orales y con lo que ocurre en otras enfermedades orales^{3,363}. Por ejemplo, más de la mitad de los pacientes con enfermedad periodontal grave de nuestro estudio estaban colonizados en ambas localizaciones, mientras que sólo el 26,4% de los pacientes con EPC del estudio de Barros *et al.*²⁴¹ lo estaban.

En nuestro estudio, las muestras de los OR estuvieron colonizadas con mayor frecuencia que las de las GPP, lo cual está en concordancia con algunos estudios^{3,241}, pero en

discrepancia con lo descrito por McManus *et al.*³⁶³. En nuestro estudio, se aisló *Candida* de la cavidad oral en los OR de casi la mitad de las personas estudiadas. La colonización oral descrita en otros estudios que empleaban la misma metodología u otras similares ha sido del 30 al 60%^{7,363,364}. Estos valores están directamente relacionados con la edad de los pacientes y con la técnica empleada para tomar la muestra. Si la muestra se tomaba con torundas, Urzúa *et al.*³ hallaban un 100% de colonización en adultos, mientras que Moalic *et al.*⁷ describían un 58,6% en adultos jóvenes y Raja *et al.*¹¹ un 60%, en niños. Cuando se tomaban mediante OR, Hintao *et al.*³⁶⁴ describieron un 30,1% y McManus *et al.*³⁶³ un 36,6% de colonización en adultos. En las bolsas periodontales, el 36% de los pacientes de nuestro estudio mostraban colonización candidiásica, lo que supera el 26% obtenido por Urzúa *et al.*³ con la misma metodología. Por el contrario, otro estudio en el que se tomó la muestra con cureta señaló una colonización del 42%³⁵³. McManus *et al.*³⁶³ emplearon ambos métodos obteniendo porcentajes de colonización similares y Matic *et al.*³⁵⁶, que emplearon ambos métodos, resaltaron que la toma de muestra con cureta resultaba más precisa. Estos datos demuestran que es importante estandarizar los métodos de muestreo de la bolsa periodontal para poder comparar correctamente los diferentes estudios y así concretar la epidemiología de la colonización por *Candida* en esta localización.

La utilización de un medio de cultivo cromógeno, en el que se pueden diferenciar el color y la textura de las colonias de las diferentes especies de *Candida*, facilita la comprobación de la gran diversidad de especies fúngicas presentes en la cavidad oral. Estos medios de cultivo cromógenos pueden ser una herramienta sencilla para un estudio de la ecología fúngica oral^{9,357,358}.

La selección de nuestros pacientes se ha realizado de forma aleatoria y la toma de las muestras fue estandarizada, hechos que no han evitado las diferencias de edad y género entre los grupos de pacientes debido a que las lesiones de caries son muy frecuentes en todas las personas e inevitablemente se acumulan con la edad. Por este motivo, los pacientes incluidos en el grupo de control de caries no están completamente libres de obturaciones, ya que es muy difícil encontrar adultos sin caries en el País Vasco. Así mismo, y aunque la edad no es directamente un factor causante de enfermedad periodontal, los grupos con EPC también presentaron una media de edad superior al grupo control. En el análisis de la EP se seleccionaron los pacientes mayores de 30 años con el objetivo de que presentasen EP Crónica y no otro tipo de EP. Estas circunstancias condicionantes en la selección de la población de estudio son frecuentes y se señalan en varios estudios^{3,15}.

Aunque clásicamente se ha asociado una mayor colonización oral por *Candida* con la edad³⁶⁵, en nuestro estudio esta correlación fue muy baja, y no fue posible atribuir las diferencias en la colonización entre los grupos al factor edad, pero sí a la patología en función a la que se establecieron los grupos de estudio.

Nuestro estudio es el primero en valorar la relación entre *Candida* y la presencia de caries en adultos en nuestro medio. Sin embargo, en estudios realizados en otros países, *Candida* se ha aislado de la placa dental supragingival primaria junto con otros microorganismos cariógenos, como *Streptococcus*, *Actinomyces* y *Lactobacillus*⁴ y se ha observado la presencia de una mayor colonización candidiásica en la boca de las personas con caries, aislando *Candida* de las lesiones de caries⁶⁻¹¹. Además, algunos estudios experimentales en animales, como los realizados en ratas, han observado que *Candida* puede causar lesiones de caries en la superficie oclusal de los dientes³⁶⁶.

En nuestro estudio hemos reconocido, en el grupo de los pacientes con caries (grupo I), la existencia de más pacientes colonizados por *Candida*. Además, la intensidad de la colonización fue significativamente mayor (número de UFC/ml más alto) que en el grupo control y también lo fue la diversidad de especies aisladas. Raja *et al.*¹¹ y Moreira-Pesqui *et al.*³⁶⁷ han considerado que los cultivos con más de 400 UFC/ml podrían indicar una actividad cariogena. En nuestro estudio la media de UFC/ml en los OR de los pacientes con caries fue de 962 UFC/ml, pero algunos pacientes que mostraron una colonización baja o incluso sin colonización presentaban un número importante de lesiones de caries y viceversa. Se observaba un incremento de la colonización oral por *Candida*, tanto un aumento del número de UFC/ml como del número de pacientes colonizados relacionado con un incremento del índice CAO en nuestro estudio. En este sentido Moalic *et al.*⁷ encontraron la misma relación cuando *Candida albicans* estaba presente, aunque no cuando era más abundante.

La especie colonizadora predominante en nuestro estudio fue *Candida albicans* que se aisló del 33,4% de las muestras de OR, mientras que otras especies fúngicas se aislaban del 19,6% de las mismas. Otros autores^{7,11} también han descrito este claro predominio de *C. albicans* en la cavidad oral hasta el 39% o incluso en proporciones más elevadas (55%). En los pacientes con caries (grupo I) la frecuencia de aislamiento de *Candida albicans* y de otras especies de hongos de interés clínico fue mayor que en el grupo control. Además, se obtuvieron más cultivos mixtos con mayor frecuencia que en el grupo control. Otras especies de *Candida* aisladas con relativa frecuencia fueron *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* y *Candida guilliermondii*. Estos hallazgos contrastan con otros estudios^{7,9} realizados en niños, adolescentes y adultos jóvenes con caries, en los que predominaban otras especies como *Candida tropicalis* y *Candida krusei* y no se aislaba *Candida dubliniensis*. Sin embargo, Urzúa *et al.*³ que han descrito

una mayor prevalencia de *Candida glabrata* y que emplearon adultos en su estudio, sí aislaron *Candida dubliniensis*. Consideramos que estas diferencias pudieran deberse a factores como la edad o la procedencia geográfica de las muestras.

Ningún estudio ha establecido una relación significativa entre la colonización oral por *Candida* y la EPC^{352,363}, aunque la presencia de una alta carga fúngica de este hongo en las bolsas periodontales se considera que puede agravar esta enfermedad³⁶³. Los resultados de nuestro estudio no nos permiten distinguir entre pacientes con EPC o pacientes sanos. No obstante, el análisis comparativo entre los estudios^{241,368} es complicado ya que no se distribuye a los pacientes en los mismos grupos, ni la metodología es concordante.

La mitad de nuestros pacientes mostraba colonización oral por *Candida* cuando se cultivaban los OR, que es algo más elevada que la obtenida por Urzua *et al.*³ (32,6%). La distribución fue bastante similar entre los diferentes grupos estudiados. Prestando atención tan solo a los grupos de pacientes con EPC, los porcentajes de colonización fueron algo superiores a los obtenidos en otros estudios que oscilaron entre el 37,7 y el 42,7%^{241,368}. Aunque nuestro grupo de pacientes con EPC grave presentó los mayores porcentajes de colonización (58%), las diferencias no fueron significativas, probablemente debido al reducido tamaño de la muestra en este grupo.

Las bolsas periodontales del 36% de los 190 pacientes estaban colonizadas, lo que supera el 26% obtenido por Urzua *et al.*³ Otros estudios^{15,241,347} han encontrado porcentajes muy variables (5-47%) de colonización de las bolsas periodontales en los pacientes con SCP. Aunque en nuestro estudio el mayor porcentaje de colonización de las bolsas aparece en el grupo SCP, las diferencias no fueron significativas. Consideramos que la ampliación de nuestra muestra en este grupo de SCP serviría para que nuestros resultados tuvieran un mayor potencial estadístico. Otros estudios con

metodología similar^{353,368} hallaron una gran diferencia entre los pacientes sanos y los que padecían EPC. Es probable que en esas poblaciones, la colonización oral en sujetos sanos sea menos frecuente que en la nuestra.

No hemos podido corroborar en nuestro estudio una relación estadísticamente significativa entre la colonización por *Candida* y la gravedad de la EPC, descrita por Canabarro *et al.*¹⁵, ni su utilidad como factor predictivo de la gravedad de la EPC. Sin embargo, en base al número de UFC que hemos observado, si podemos señalar que cuanto mayor es la gravedad de la EPC la colonización es más intensa, y apoyando los resultados de Urzua *et al.*¹⁵, el número de UFC/ml de las muestras de pacientes con SCP fue el más elevado. El menor número de UFC que hemos obtenido en las bolsas periodontales respecto de los OR, contrasta con los resultados descritos por Barros *et al.*²⁴¹ y McManus *et al.*³⁶³, que aislaron más UFC de las muestras de las GPP que de las de la mucosa.

La biodiversidad fúngica en la cavidad oral es un hecho variable por diferentes razones, una de ellas está en relación con su presencia en las patologías orales frecuentes²⁵⁰. En nuestro estudio observamos 19 especies diferentes de levaduras. El índice de Simpson mostraba una diversidad menor en el grupo SCP, con unos valores similares a los descritos por Urzua *et al.*³ Algunos estudios^{225,369} han señalado que la diversidad microbiana desciende en caso de enfermedad. Esta menor diversidad se relaciona con que una especie predomina claramente sobre las demás con una selección y una persistencia de aquellas más resistentes o patógenas, como *Candida albicans*.

Candida albicans era más frecuente en los OR del grupo SCP, con unos resultados muy similares a los descritos en otros estudios²⁴¹. También *Candida albicans* era más frecuente en las GPP de los pacientes con EPC, con frecuencias similares a los trabajos de Barros²⁴¹ y Jewtuchowicz *et al.*³⁵³.

La cantidad de UFC/ml de *Candida albicans* en los grupos con enfermedad periodontal fue muy superior a la media y al grupo control. Otros estudios³⁷⁰ encontraron también un 81,8% de aislamientos de *Candida albicans* de las bolsas de pacientes con EP.

Aunque la especie más frecuente fue *Candida albicans* también se han hallado otras especies de levaduras en las muestras orales de todos los grupos con y sin EPC. Las especies más frecuentes fueron *Candida parapsilosis* y *Candida dubliniensis*, al igual que en el trabajo de Jewtuchowicz *et al*³⁵³. Las especies con mayor número de UFC en el trabajo de Urzúa *et al*³ fueron *Candida dubliniensis* y *Candida glabrata* que coinciden con algunas de las más abundantes también en nuestro trabajo.

Canabarro *et al*.¹⁵ señalan que las bolsas periodontales profundas son los nichos que muestran una mayor variedad de especies fúngicas, formando una comunidad más compleja de levaduras a mayor profundidad de sondaje que incluía la presencia de cultivos mixtos con *Candida albicans*. En nuestro estudio la variedad de especies en las bolsas de los pacientes con EPC fue menor que en los que no padecían esta enfermedad. *Candida albicans* fue la levadura más frecuentemente aislada en los cultivos mixtos y la más frecuente en las bolsas profundas.

Otras especies frecuentemente aisladas en nuestro estudio en relación a la EPC fueron *Candida dubliniensis* y *Candida parapsilosis*. *Candida dubliniensis*, se aislaba del 2,5% de los OR y del 2,6% de las GPP de estos pacientes, mientras que Jewtuchowicz *et al*.³⁵³ en Argentina describen un 4,4% de prevalencia de *Candida dubliniensis* en las bolsas periodontales. Estos autores observaron una colonización más frecuente por *Candida dubliniensis* en los pacientes con EPC mientras que en nuestro estudio se aislaba con más frecuencia en los pacientes del grupo control. Creemos que la distinta localización geográfica es la causa más probable de estas diferencias.

Se aisló *Candida parapsilosis* en un 18,7% de las bolsas periodontales de los pacientes con MCP, datos superiores al 7,3% de los pacientes con EPC del estudio de Jewtuchowicz *et al.*³⁵³, realizado en Argentina. Muchos tipos de infecciones fúngicas tienen predilección por una u otra especie según el punto geográfico y el nicho infeccioso^{220,371}.

Las células de *Candida* muestran diferentes características biológicas que las hacen candidatas para participar de forma activa en el proceso inflamatorio y destructivo presente en la EPC⁵. *Candida albicans* posee una gran capacidad para colonizar el colágeno, el esmalte, la dentina, el cemento dental y la hidroxiapatita^{228,372,373}, que le facilitaría desarrollar un papel activo en la etiopatogenia de la caries. Además, estos hongos poseen diferentes factores de virulencia que favorecen la invasión de los tejidos de la cavidad oral y la evasión de los mecanismos de defensa del huésped²²⁷. Destacan su variedad fenotípica y genotípica, la transformación de levadura en hifa y viceversa, la filamentación y el desarrollo de un micelio guiado por un tigmotropismo, la hidrofobicidad, la producción de exoenzimas, la coagregación sinérgica o competitiva con diferentes especies de bacterias y su gran capacidad de adaptación a los diferentes medioambientes del huésped²²⁷.

Candida albicans presenta varias adhesinas en su pared celular que le permiten interaccionar con las superficies celulares y abióticas, y transformarse de un hongo unicelular en una morfología pluricelular como el micelio, y también desarrollar biopelículas mono y polimicrobianas adheridas al diente^{30,374}.

Se han identificado hifas y pseudohifas en el borde del epitelio sulcular y en el tejido conectivo subyacente, que parecen ser importantes en la adhesión y posterior invasión tisular, en la coagregación con otras especies y en el progreso de la EPC³⁴⁸.

Candida albicans se halla en las capas externas de la placa y podría ser una barrera entre el sistema inmune y el resto de las capas de la placa dental^{227,348}. Esta biopelícula puede ser recalcitrante tanto a la limpieza producida por el arrastre de la saliva como al efecto de las moléculas antimicrobianas presentes en los dentífricos²³.

Las proteinasas, lipasas y hemolisinas de *Candida albicans* podrían favorecer el desarrollo y mantenimiento de las lesiones en los tejidos bucales³⁷⁵. Esta acción enzimática puede ser colagenolítica, sobre todo en las raíces dentales donde promueven la producción de caries radicular y puede dañar la hidroxiapatita³⁷³.

Las proteinasas degradan las proteínas de la matriz extracelular, las inmunoglobulinas, como la IgA salival, y la fibronectina²²⁷. Esta proteólisis libera moléculas que van a perpetuar la inflamación tisular y activar la respuesta inmune^{227,241,348,376}. Además las proteinasas también inhiben la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, que es un factor fundamental para el establecimiento de lesiones infecciosas e inflamatorias crónicas³⁴⁸. Estas enzimas actuarían de forma similar a las proteasas expresadas por aquellas bacterias que son cruciales en la patogenia de la EPC, como *Porphyromonas gingivalis*³⁴⁸. Las fosfolipasas candidiásicas facilitan la adhesión a los tejidos y la degradación de las membranas celulares, facilitando su citolisis^{5,227}.

Otra característica de estas levaduras es su hidrofobicidad. *Candida* expresa proteínas hidrófobas que potencian su adhesividad y su capacidad de invasión tisular, especialmente en células epiteliales orales⁵.

Candida es también capaz de coagregarse con bacterias formando un biofilm mixto o polimicrobiano y así adherirse con una mayor eficacia a células y superficies abióticas, lo que constituye el primer paso en la colonización^{43,214,227,229,377}.

Una gran mayoría de las enfermedades orales están asociadas con la perturbación del equilibrio de las comunidades microbianas^{369,378} y se ha sugerido que la mayoría de la

patogenia producida por *Candida* está en relación con los biofilms, como por ejemplo la placa dental supra y subgingival²¹³. Según Krom *et al.*²²⁵ *Candida albicans* sería un microorganismo puente que uniría diferentes microcolonias bacterianas dentro de la placa dental y protegería a las bacterias de la fuerza de arrastre de la saliva. Esta coagregación microbiana ha sido ampliamente descrita para *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*^{379,380}. Esta unión entre *Streptococcus* y *Candida* se establecería a través de la proteína Als3p presente en las hifas de *Candida albicans*²³⁰. En la EPC también se observan fenómenos de simbiosis, antagonismo y comensalismo entre los diferentes microorganismos de la placa dental como la que se ha observado entre *Candida* y algunas bacterias anaerobias (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) de gran importancia en el desarrollo de la EPC^{17,262,381}.

Se ha sugerido que *Candida* cuando se encuentra en los biofilms mixtos puede modular la sensibilidad a los antibióticos y que a su vez las bacterias pueden afectar a la actividad de los fármacos antifúngicos³⁶⁸. La coagregación con bacterias también ejercería un papel protector frente la acción de los antibióticos, de las moléculas antimicrobianas presentes en los dentífricos y del sistema inmune al dificultar su acceso^{382,383}

Otra capacidad de esta levadura es la de adaptarse a los distintos nichos, lo que les permite expresar en cada localización distintos fenotipos y factores de virulencia (pH, presencia de oxígeno y polisacáridos)^{5,227}. Esta propiedad puede ser fundamental tanto en el caso de la EPC como de las caries ya que se requiere una gran versatilidad para sobrevivir en las distintas profundidades de las bolsas periodontales, amoldarse a los cambios en la composición de la placa dental y sobrevivir en circunstancias de pH muy bajo^{5,49,227}. *Candida* sobrevive en pH ácido y es un microorganismo acidógeno capaz de

producir ácidos en concentraciones y a velocidades similares a las de *Lactobacillus* en presencia de glucosa³⁸⁴, y así disolver la hidroxiapatita de forma más extensa que *Streptococcus mutans*³⁷³. *Candida albicans* crece tanto en aerobiosis como anaerobiosis^{5,227}. Por lo que la bolsa periodontal y el líquido crevicular son medioambientes favorables para la germinación y crecimiento de hifas^{5,227,348,385}.

Candida dubliniensis es una especie filogenéticamente muy cercana a *Candida albicans* con una capacidad importante para desarrollar resistencia a los fármacos antifúngicos, especialmente a FLZ y a otros azoles³⁸⁶. Esta especie fúngica está bien adaptada al nicho oral por su capacidad de adhesión a las células bucales y a las superficies abióticas, como las de las prótesis dentales, desarrollando biopelículas³⁷⁴. Además, *Candida dubliniensis* produce enzimas extracelulares, proteasas y fosfolipasas, que le facilitan la invasión de los tejidos²⁴². Estos factores le proporcionarían una ventaja sobre *Candida albicans* para sobrevivir en la cavidad oral en pacientes que han sido tratados con fármacos antifúngicos³⁸⁷.

Candida parapsilosis es en realidad un complejo formado por tres especies, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis*. Este complejo muestra una alta capacidad de adhesión a células, prótesis y catéteres que la convierten en un importante y frecuente patógeno nosocomial^{213,388}. Además, la sensibilidad de esta especie a los nuevos fármacos antifúngicos denominados equinocandinas es menor que la de otras especies de *Candida*³⁸⁹.

Candida glabrata y *Candida krusei* se consideran también patógenos emergentes. Las infecciones causadas por esta especie resultan problemáticas por presentar importantes resistencias a diversos fármacos antifúngicos, sobre todo azoles^{213,227}.

La caries se trata mediante terapias remineralizadoras y restauradoras⁴² y se previene con un adecuado control dietético⁸⁶⁻⁸⁸, la aplicación de fluoruros⁷⁴ y una adecuada

higiene dental⁸⁹. Mientras algunos pacientes se encuentran completamente libres de caries, otros padecen varias lesiones por año, en este tipo de pacientes de alto riesgo es en los que consideramos que sería interesante la evaluación de la colonización por *Candida* y la valoración un tratamiento antifúngico dependiendo de la intensidad de esta.

El tratamiento estándar de la enfermedad periodontal es el raspado y alisado radicular (SRP, *Scaling and Root Planning*) y un correcto control de placa mediante una buena higiene oral¹³⁰. Sin embargo, algunos pacientes no responden al tratamiento convencional y deben recibir terapias más agresivas y tratamiento con antibióticos de amplio espectro, que pueden potenciar la sobreinfección por *Candida*³⁷⁶. Por esto creemos que puede ser interesante evaluar la presencia de *Candida* en los pacientes con EPC.

En la hipotética situación de que decidiéramos tratar a estos pacientes con fármacos antifúngicos, disponemos de varias opciones terapéuticas. Inicialmente los pacientes con candidiasis oral se suelen tratar con formulaciones tópicas de AMB, NYS o MCZ y sólo en el caso de infecciones recurrentes o en situaciones de inmunodepresión del paciente, pueden tratarse con FLZ, ITZ, PSZ o VRZ por vía oral, e incluso con equinocandinas, por vía intravenosa^{19,276}. Patil *et al.*¹ consideran que la aparición de resistencias a los fármacos antifúngicos y la presencia de especies de *Candida* emergentes con perfiles de sensibilidad más bajos para algunos de estos fármacos pueden ser factores influyentes en la elección del tratamiento. En nuestro estudio, se aislaron varias de las especies consideradas emergentes en las muestras de los pacientes estudiados y se realizaron pruebas de sensibilidad *in vitro*. Con excepción de la NYS, todos los demás fármacos antifúngicos mostraron una excelente actividad *in vitro*. El porcentaje de cepas no salvajes para la NYS varió en un rango del 18% al 100%, en el

caso de *Candida krusei*. Este dato sorprende y debemos interpretarlo con cautela, ya que la ausencia de puntos de corte clínicos para la NYS hace difícil extrapolar los resultados del laboratorio a la clínica. De hecho éste es un fármaco con una dilatada y demostrada eficacia clínica^{273,283,284} que se recomienda como primera y segunda línea de tratamiento tópico en las últimas guías terapéuticas del manejo de infecciones candidiásicas para infecciones leves y moderadas por este hongo^{1,19}. Los puntos de corte que empleamos para el estudio fueron los puntos de corte epidemiológicos establecidos para la AMB, dada su similitud en los mecanismos de acción³⁹⁰ y familia farmacológica. Las CMI para la NYS estuvieron entre 1-4 µg/ml, es decir más bajas incluso que en otros estudios, que refirieron rangos de 1-8 µg/ml^{294,391}. La AMB es también un fármaco antifúngico disponible para aplicación tópica y con una baja tasa de resistencias. En nuestro estudio tan sólo dos aislamientos de *Candida albicans* y uno de *Candida glabrata* fueron no salvajes para AMB. Smiline *et al.*³⁹² aislaron *Candida albicans* directamente de lesiones de caries y Kamikawa *et al.*²²⁰ de la mucosa oral, encontrando ambos también muy pocas resistencias. De hecho no hemos encontrado informes previos de cepas de *Candida* de origen periodontal con resistencia a este fármaco antifúngico^{393,394}.

El MCZ fue el fármaco antifúngico que demostró mejores resultados *in vitro*, coincidiendo con lo publicado por Waltimo *et al.*³⁹³, y a diferencia de lo observado por Kamikawa *et al.*²²⁰. El MCZ se emplea de forma tópica para el tratamiento de candidiasis oral³⁹¹ y sus tasas de resistencia permanecen bajas, aunque algunos estudios^{1,395} consideran que el uso prolongado de este fármaco puede implicar un riesgo de desarrollar cepas con resistencias cruzadas a otros azoles. Sin embargo, en nuestro estudio, al igual que en el de Isham *et al.*³⁹¹ no se observaron resistencias cruzadas entre el MCZ y otros azoles. Este fármaco antifúngico sería útil contra enfermedades orales

dependientes de la placa dental ya que posee un potente efecto antibiofilm³⁹⁶ y porque las formulaciones galénicas permiten obtener altas concentraciones en la cavidad oral^{291,293,391,397}.

El FLZ ha sido el fármaco antifúngico más utilizado para el tratamiento oral sistémico por su baja toxicidad, buena tolerancia y escasos efectos secundarios, aunque puede tener una baja biodisponibilidad oral en pacientes con hiposialia³⁹⁸. Se recomienda como primera opción en el tratamiento de las candidiasis orales graves¹⁹. En nuestro estudio hallamos dos aislamientos de *Candida albicans* resistentes a FLZ (1,6%) y cuatro aislamientos de la misma especie se catalogaron como no salvajes para este fármaco (5,3%). Nuestros datos están en concordancia con aquellos reportados por Razzaghi *et al.*³⁹⁹ e indican una tasa de resistencias menor a las encontradas por Sanchez-Vargas *et al.*²⁷⁶ en México y Kamikawa *et al.*²²⁰ en Japón. Algunos autores^{294,353} no encontraron ninguna resistencia a FLZ en aislamientos de origen periodontal, mientras que Ito *et al.*³⁹⁴ encontraron resistencias en los pacientes periodontales y no en los controles. Los aislamientos clasificados como resistentes en nuestro caso pertenecían al grupo control, aunque algunos de los no salvajes pertenecían a pacientes con caries o EPC. No hallamos resistencias en el resto de las especies de *Candida*, lo que contrasta con otros estudios^{220,276,394,353,386} en los que las resistencias a FLZ se observaban entre 14-17% de las especies emergentes, como *Candida tropicalis*^{220,394}, *Candida dubliniensis*^{353,386} y *Candida glabrata*^{220,276}. *Candida krusei* es intrínsecamente resistente a FLZ, independientemente de los resultados que se obtienen *in vitro*^{330,331} por lo que no se recomienda su empleo en las infecciones causadas por esta especie. En nuestro estudio, ambas cepas de *Candida krusei* fueron sensibles al FLZ, lo que coincide con lo descrito por Kamikawa *et al.*²²⁰.

La actividad *in vitro* de VRZ, PSZ y en menor medida, ITZ, fue buena para los aislamientos de *Candida* estudiados y concuerda con lo descrito por otros autores^{391,399}. Pappas *et al.*¹⁹ recomiendan su uso en el tratamiento de infecciones orofaríngeas causadas por aislamientos de *Candida* resistentes al FLZ. Sin embargo, en los estudios realizados por Kamikawa *et al.*²²⁰ en Japón, encontraron aislamientos de *Candida albicans* y *Candida glabrata* resistentes.

Se observaron algunas resistencias cruzadas a distintos fármacos antifúngicos. Siete de los aislamientos multirresistentes eran *Candida albicans* (9,3%), otro *Candida glabrata* y otro *Candida tropicalis* (3,9% de las cepas de especies diferentes a *Candida albicans*). Estos datos son similares a los descritos por Marcos-Arias *et al.*³⁹⁰ pero difieren de los de Patil *et al.*¹, quienes refieren una mayor tasa de cepas multirresistentes entre las especies distintas de *Candida albicans* que en las de *Candida albicans*. Otros autores^{371,393}, señalan un aumento de las resistencias cruzadas a los azoles, especialmente en *Candida glabrata* y otras especies de *Candida* no *Candida albicans*. De hecho, Pfaller *et al.*²⁹⁸ indican que las cepas menos sensibles al PSZ presentan probablemente algún tipo de resistencia al FLZ. Nosotros solamente hemos observado dos aislamientos de *Candida albicans* que siendo sensibles dosis dependientes para ITZ, se clasificaron como no salvajes para VRZ o PSZ. Al igual que Marcos-Arias *et al.*³⁹⁰, observamos que una baja sensibilidad *in vitro* a ITZ o a VRZ correspondía también con una menor sensibilidad a otro fármaco antifúngico, aunque en nuestro estudio, no necesariamente de la misma familia.

Los fármacos antifúngicos disponibles son adecuados para un tratamiento complementario potencial en pacientes con una alta susceptibilidad a la caries y EPC grave si fuese necesario y estuviese presente una colonización candidiásica importante ya que el porcentaje de resistencias es muy bajo en nuestro medio (<5%) y las

resistencias cruzadas son anecdóticas. En estos grupos de pacientes, podrían aplicarse varias terapias para erradicar *Candida*, como complemento al tratamiento convencional, como la aplicación localizada de MCZ^{291,293,391,397}, los nuevos dentífricos formulados con partículas de NYS⁴⁰⁰, tratamientos con probióticos pudieran ser también una buena alternativa⁴⁰¹ o terapias fotodinámicas⁴⁰².

5 CONCLUSIONES

1. Existe una asociación significativa entre la presencia de caries dental y la colonización oral por *Candida* en adultos del País Vasco.
2. El incremento del índice CAO se asocia a un aumento en la colonización por *Candida* y también de la carga fúngica.
3. Los pacientes con caries dental presentan una mayor variedad de especies de *Candida* que los sanos, siendo *Candida albicans* la especie más frecuente.
4. No hemos podido establecer una relación directa entre la presencia de *Candida* y la existencia de enfermedad periodontal crónica en adultos del País Vasco.
5. Se observa una tendencia a presentar una colonización oral más habitual por *Candida* y más intensa en los pacientes con enfermedad periodontal crónica grave.
6. Los pacientes con enfermedad periodontal crónica muestran una menor diversidad de especies de *Candida* que los del grupo control, siendo *Candida albicans* la especie predominante.
7. Los fármacos antifúngicos estudiados son eficaces contra las cepas de *Candida* aisladas de la cavidad oral, siendo mínimas las resistencias reconocidas.
8. Es necesario estandarizar los métodos para la toma de muestras orales en pacientes con alta cariogenicidad y/o enfermedad periodontal crónica grave, siendo los enjuagues orales útiles en ambas patologías y las puntas de papel estériles en la enfermedad periodontal crónica.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol.* 2015;6:1391.
2. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: A systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015;94(5):650-658.
3. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, *et al.* Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol.* 2008;46(8):783-793.
4. Zijng V, van Leeuwen MB, Degener JE, *et al.* Oral biofilm architecture on natural teeth. *Plos One.* 2010;5(2):e9321.
5. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Marques MR, Hofling JF, Goncalves RB. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. *Med Mycol.* 2012;50(1):43-49.
6. Gabris K, Nagy G, Madlena M, *et al.* Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Res.* 1999;33(3):191-195.
7. Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res.* 2001;35(2):149-155.
8. Shen S, Samaranayake LP, Yip HK, Dyson JE. Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly, ethnic Chinese. *Oral Dis.* 2002;8(4):207-217.

9. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of *Mutans* streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Arch Oral Biol. 2006;51(11):1024-1028.
10. Signoretto C, Burlacchini G, Faccioni F, Zanderigo M, Bozzola N, Canepari P. Support for the role of *Candida* spp. in extensive caries lesions of children. New Microbiol. 2009;32(1):101-107.
11. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. Caries Res. 2010;44(3):272-276.
12. Sharma G, Puranik MP, K RS. Approaches to arresting dental caries: An update. J Clin Diagn Res. 2015;9(5):ZE08-11.
13. Kunin AA, Evdokimova AY, Moiseeva NS. Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries. EPMA J. 2015;6(1):3-014-0025-8.
14. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. Plos Pathog. 2010;6(4):e1000886.
15. Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2013;48(4):428-432.
16. Guo W, Ye P, Yu H, Liu Z, Yang P, Hunter N. CD24 activates the NLRP3 inflammasome through c-src kinase activity in a model of the lining epithelium of inflamed periodontal tissues. Immun Inflamm Dis. 2014;2(4):239-253.

17. Rubio NA, Puia S, Toranzo S, Brusca MI. Fungal invasion of connective tissue in patients with gingival-periodontal disease. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(1):20-24.
18. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis--a brief overview. *Oral Dis.* 2008;14(2):138-143.
19. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, *et al.* Executive summary: Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62(4):409-417.
20. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis.* 2010;202(1):171-175.
21. La OMS publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales. <http://www.who.int>. Updated 2004.
22. Shaheen SS, Reddy P, Hemalatha, *et al.* Antimicrobial efficacy of ten commercially available herbal dentifrices against specific oral microflora - *in vitro* study. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(4):ZC42-6.
23. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: Forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res.* 2014;93(5):445-451.
24. Cho T, Nagao J, Imayoshi R, Tanaka Y. Importance of diversity in the oral microbiota including *Candida* species revealed by high-throughput technologies. *Int J Dent.* 2014;2014:454391.

25. Monteiro-da-Silva F, Araujo R, Sampaio-Maia B. Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. *Med Mycol.* 2014;52(5):498-505.
26. Stanley BO, Feingold E, Cooper M, *et al.* Genetic association of MPPED2 and ACTN2 with dental caries. *J Dent Res.* 2014;93(7):626-632.
27. Diaz PI, Strausbaugh LD, Dongari-Bagtzoglou A. Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: Linking the clinic and the bench. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:101.
28. Nobbs AH, Jenkinson HF. Interkingdom networking within the oral microbiome. *Microbes Infect.* 2015;17(7):484-492.
29. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *Plos Pathog.* 2010;6(1):e1000713.
30. Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ.* 2001;65(8):785-787.
31. Aguirre Urizar JM. Oral candidiasis. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19(1):17-21.
32. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. *Periodontol 2000.* 2011;55(1):250-265.
33. Meurman JH, Parnanen P, Seneviratne CJ, Samaranayake LP, Saarinen AM, Kari K. Prevalence and antifungal drug sensitivity of non-*albicans* *Candida* in oral rinse samples of self-caring elderly. *Gerodontology.* 2011;28(4):246-252.

34. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014;82(5):1968-1981.
35. Labib GS, Aldawsari H. Innovation of natural essential oil-loaded orabase for local treatment of oral candidiasis. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3349-3359.
36. Stranska P. Evaluation of the dental pathology in archaeological skeletal material: Prevalence of dental caries since prehistory to modern age. *Cas Lek Cesk*. 2013;152(4):196-205.
37. Carounanidy U, Sathyanarayanan R. Dental caries: A complete changeover (part II)- changeover in the diagnosis and prognosis. *J Conserv Dent*. 2009;12(3):87-100.
38. Kumar J, Nayak M, Prasad KL, Gupta N. A comparative study of the clinical efficiency of chemomechanical caries removal using carisolv and papacarie - a papain gel. *Indian J Dent Res*. 2012;23(5):697-9290.107429.
39. Schulze-Schweifing K, Banerjee A, Wade WG. Comparison of bacterial culture and 16S rRNA community profiling by clonal analysis and pyrosequencing for the characterization of the dentine caries-associated microbiome. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:164.
40. Albrektsson TO. Tissue preservation in caries treatment. London.: Quintessence; 2001. 37-50.
41. Rosin-Grget K, Peros K, Sutej I, Basic K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Med Acad*. 2013;42(2):179-188.

42. Roberson TM, Swift EJ, Sturdevant CM. Arte y ciencia de la odontología conservadora. Barcelona : Elsevier; 2007:65-137.
43. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: A sticky situation. Plos Pathog. 2013;9(10):e1003616.
44. Thurnheer T, Bostanci N, Belibasakis GN. Microbial dynamics during conversion from supragingival to subgingival biofilms in an *in vitro* model. Mol Oral Microbiol. 2015.
45. Pannu P, Gambhir R, Sujlana A. Correlation between the salivary *Streptococcus mutans* levels and dental caries experience in adult population of Chandigarh, India. Eur J Dent. 2013;7(2):191-195.
46. Jagathrakshakan SN, Sethumadhava RJ, Mehta DT, Ramanathan A. 16S rRNA gene-based metagenomic analysis identifies a novel bacterial co-prevalence pattern in dental caries. Eur J Dent. 2015;9(1):127-132.
47. Obata J, Takeshita T, Shibata Y, et al. Identification of the microbiota in carious dentin lesions using 16S rRNA gene sequencing. Plos One 2014;9(8):e103712.
48. Rocas IN, Lima KC, Assuncao IV, Gomes PN, Bracks IV, Siqueira JF,Jr. Advanced caries microbiota in teeth with irreversible pulpitis. J Endod. 2015.
49. Georgios A, Vassiliki T, Sotirios K. Acidogenicity and acidurance of dental plaque and saliva sediment from adults in relation to caries activity and chlorhexidine exposure. J Oral Microbiol. 2015;7:26197.

50. Organización Mundial de la Salud. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases report of a joint WHO FAO expert consultation, geneva, 28 january - 1 february 2002. Vol 916. Geneva: World Health Organization; 2003:149.
51. Moynihan PJ, Kelly SA. Effect on caries of restricting sugars intake: Systematic review to inform WHO guidelines. *J Dent Res.* 2014;93(1):8-18.
52. Shaffer JR, Carlson JC, Stanley BO, et al. Effects of enamel matrix genes on dental caries are moderated by fluoride exposures. *Hum Genet.* 2015;134(2):159-167.
53. Shimizu T, Ho B, Deeley K, et al. Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. *Plos One* 2012;7(9):e45022.
54. Wang X, Shaffer JR, Zeng Z, et al. Genome-wide association scan of dental caries in the permanent dentition. *BMC Oral Health.* 2012;12:57-6831-12-57.
55. Chaussain C, Bouazza N, Gasse B, et al. Dental caries and enamelin haplotype. *J Dent Res.* 2014;93(4):360-365.
56. Wendell S, Wang X, Brown M, et al. Taste genes associated with dental caries. *J Dent Res.* 2010;89(11):1198-1202.
57. Shaffer JR, Feingold E, Wang X, et al. GWAS of dental caries patterns in the permanent dentition. *J Dent Res.* 2013;92(1):38-44.
58. Brancher JA, Pecharki GD, Doetzer AD, et al. Analysis of polymorphisms in the lactotransferrin gene promoter and dental caries. *Int J Dent.* 2011;2011:571726.
59. Valarini N, Maciel SM, Moura SK, Poli-Frederico RC. Association of dental caries with HLA class II allele in Brazilian adolescents. *Caries Res.* 2012;46(6):530-535.

60. Briseno-Ruiz J, Shimizu T, Deeley K, *et al.* Role of TRAV locus in low caries experience. *Hum Genet.* 2013;132(9):1015-1025.
61. Aidar M, Marques R, Valjakka J, *et al.* Effect of genetic polymorphisms in CA6 gene on the expression and catalytic activity of human salivary carbonic anhydrase VI. *Caries Res.* 2013;47(5):414-420.
62. Liang J, Wu B, Plassman B, Bennett J, Beck J. Racial disparities in trajectories of dental caries experience. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41(6):517-525.
63. Liu Y, Li Z, Walker MP. Social disparities in dentition status among American adults. *Int Dent J.* 2014;64(1):52-57.
64. Gluzman R, Katz RV, Frey BJ, McGowan R. Prevention of root caries: A literature review of primary and secondary preventive agents. *Spec Care Dentist.* 2013;33(3):133-140.
65. Lacoste-Ferre MH, Hermabessiere S, Jezequel F, Rolland Y. Oral ecosystem in elderly people. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil.* 2013;11(2):144-150.
66. Jablonski-Momeni A, Stachniss V, Ricketts DN, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for detection of occlusal caries *in vitro*. *Caries Res.* 2008;42(2):79-87.
67. Hugo B, Denner W. *Esthetics with resin composite: Basics and techniques.* London: Quintessence Publishing Co.; 2009:260.

68. Shivakumar K, Prasad S, Chandu G. International caries detection and assessment system: A new paradigm in detection of dental caries. *J Conserv Dent.* 2009;12(1):10-16.
69. Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Res.* 1999;33(4):252-260.
70. Berg J. Medical management of dental caries. *J Calif Dent Assoc.* 2014;42(7):442-447.
71. Oancea R, Podariu AC, Vasile L, Sava-Rosianu R, Folescu R. *In vitro* evaluation of laser fluorescence devices for caries detection through stereomicroscopic imaging. *Rom J Morphol Embryol.* 2013;54(2):333-341.
72. Makhija SK, Gilbert GH, Funkhouser E, *et al.* Characteristics, detection methods and treatment of questionable occlusal carious lesions: Findings from the national dental practice-based research network. *Caries Res.* 2014;48(3):200-207.
73. Casals Peidró, E., Garcia Pereiro, MA. Guía de práctica clínica para la prevención y tratamiento no invasivo de la caries dental. *RCOE.* 2014;19(3):189-250.
74. Milgrom P. Management of patients with active caries. *J Calif Dent Assoc.* 2014;42(7):449-453.
75. Ritter AV, Ramos MD, Astorga F, Shugars DA, Bader JD. Visual-tactile versus radiographic caries detection agreement in caries-active adults. *J Public Health Dent.* 2013;73(3):252-260.

76. Wenzel A. Radiographic display of carious lesions and cavitation in approximal surfaces: Advantages and drawbacks of conventional and advanced modalities. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(4):251-264.
77. Shimada Y, Nakagawa H, Sadr A, *et al.* Noninvasive cross-sectional imaging of proximal caries using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) in vivo. *J Biophotonics.* 2014;7(7):506-513.
78. Bracher AK, Hofmann C, Bornstedt A, *et al.* Ultrashort echo time (UTE) MRI for the assessment of caries lesions. *Dentomaxillofac Radiol.* 2013;42(6):20120321.
79. Sinanoglu A, Ozturk E, Ozel E. Diagnosis of occlusal caries using laser fluorescence versus conventional methods in permanent posterior teeth: A clinical study. *Photomed Laser Surg.* 2014;32(3):130-137.
80. Bozdemir E, Karaarslan ES, Ozsevik AS, Ata Cebe M, Aktan AM. *In vivo* performance of two devices for occlusal caries detection. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(7):322-327.
81. Lautensack J, Rack A, Redenbach C, Zabler S, Fischer H, Graber HG. *In situ* demineralisation of human enamel studied by synchrotron-based X-ray microtomography--a descriptive pilot-study. *Micron.* 2013;44:404-409.
82. Chaffee BW, Cheng J, Featherstone JD. Baseline caries risk assessment as a predictor of caries incidence. *J Dent.* 2015;43(5):518-524.
83. Cheng J, Chaffee BW, Cheng NF, Gansky SA, Featherstone JD. Understanding treatment effect mechanisms of the CAMBRA randomized trial in reducing caries increment. *J Dent Res.* 2015;94(1):44-51.

84. Wennerholm K, Emilson CG. Comparison of saliva-check mutans and saliva-check IgA mutans with the cariogram for caries risk assessment. *Eur J Oral Sci.* 2013;121(5):389-393.
85. Cunha-Cruz J, Scott J, Rothen M, *et al.* Salivary characteristics and dental caries: Evidence from general dental practices. *J Am Dent Assoc.* 2013;144(5):e31-40.
86. Kakudate N, Sumida F, Matsumoto Y, *et al.* Restorative treatment thresholds for proximal caries in dental PBRN. *J Dent Res.* 2012;91(12):1202-1208.
87. Ricketts D, Lamont T, Innes NP, Kidd E, Clarkson JE. Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;3:CD003808.
88. Sheiham A, James WP. Diet and dental caries: The pivotal role of free sugars reemphasized. *J Dent Res.* 2015; 94(10):1341-7.
89. Hu DY, Yin W, Li X, *et al.* A clinical investigation of the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride, as sodium monofluorophosphate in a calcium base, on primary root caries. *J Clin Dent.* 2013;24 A:A23-31.
90. Srinivasan M, Schimmel M, Riesen M, *et al.* High-fluoride toothpaste: A multicenter randomized controlled trial in adults. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2014;42(4):333-340.
91. Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjaderhane L, Buzalaf MA. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2014;93(1):74-77.

92. Mei ML, Chu CH, Lo EC, Samaranayake LP. Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(4):e557-63.
93. Wiken Albertsson K, Persson A, van Dijken JW. Effect of essential oils containing and alcohol-free chlorhexidine mouthrinses on cariogenic micro-organisms in human saliva. *Acta Odontol Scand*. 2013;71(3-4):883-891.
94. Gaur S, Agnihotri R. Green tea: A novel functional food for the oral health of older adults. *Geriatr Gerontol Int*. 2014;14(2):238-250.
95. Brambilla E, Cagetti MG, Ionescu A, Campus G, Lingstrom P. An *in vitro* and *in vivo* comparison of the effect of *Stevia rebaudiana* extracts on different caries-related variables: A randomized controlled trial pilot study. *Caries Res*. 2014;48(1):19-23.
96. Costa EM, Silva S, Madureira AR, Cardelle-Cobas A, Tavarria FK, Pintado MM. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation *in vitro*. *Carbohydr Polym*. 2014;101:1081-1086.
97. Miller AB, Cates RG, Lawrence M, *et al*. The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants. *Pharm Biol*. 2015;53(4):548-554.
98. Shanbhag VK. Triphala in prevention of dental caries and as an antimicrobial in oral cavity- A review. *Infect Disord Drug Targets*. 2015;15(2):89-97.
99. Mehta VV, Rajesh G, Rao A, Shenoy R, B HMP. Antimicrobial efficacy of *Punica granatum* mesocarp, *Nelumbo nucifera* leaf, *Psidium guajava* leaf and *Coffea*

canephora extract on common oral pathogens: An *in-vitro* study. J Clin Diagn Res. 2014;8(7):ZC65-8.

100. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective. Caries Res. 2011;45(3):243-263.

101. Bader JD, Vollmer WM, Shugars DA, *et al.* Results from the xylitol for adult caries trial (X-ACT). J Am Dent Assoc. 2013;144(1):21-30.

102. Brown JP, Amaechi BT, Bader JD, *et al.* Visual scoring of non cavitated caries lesions and clinical trial efficiency, testing xylitol in caries-active adults. Community Dent Oral Epidemiol. 2014;42(3):271-278.

103. Duane B. Xylitol and caries prevention. Evid Based Dent. 2015;16(2):37-38.

104. Abbate GM, Levrini L, Caria MP. Salivary pH after a glucose rinse: Effect of a new mucoadhesive spray (cariex) based on sodium bicarbonate and xylitol. J Clin Dent. 2014;25(4):71-75.

105. Momoi Y, Hayashi M, Fujitani M, *et al.* Clinical guidelines for treating caries in adults following a minimal intervention policy--evidence and consensus based report. J Dent. 2012;40(2):95-105.

106. Thepyou R, Chanmitkul W, Thanatvarakorn O, *et al.* Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and glass ionomer show distinct effects in the remineralization of proximal artificial caries lesion *in situ*. Dent Mater J. 2013;32(4):648-653.

107. Brunton PA, Davies RP, Burke JL, *et al.* Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides--a clinical safety trial. *Br Dent J.* 2013;215(4):E6.
108. Sarmadi R, Hedman E, Gabre P. Laser in caries treatment--patients' experiences and opinions. *Int J Dent Hyg.* 2014;12(1):67-73.
109. McComb D. Caries-detector dyes--how accurate and useful are they? *J Can Dent Assoc.* 2000;66(4):195-198.
110. Hamama H, Yiu C, Burrow MF, King NM. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials on chemomechanical caries removal. *Oper Dent.* 2015;40(4):E167-78.
111. Magalhaes CS, Moreira AN, Campos WR, Rossi FM, Castilho GA, Ferreira RC. Effectiveness and efficiency of chemomechanical carious dentin removal. *Braz Dent J.* 2006;17(1):63-67.
112. Bjorndal L, Reit C, Bruun G, *et al.* Treatment of deep caries lesions in adults: Randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(3):290-297.
113. Maltz M, Garcia R, Jardim JJ, *et al.* Randomized trial of partial vs. stepwise caries removal: 3-year follow-up. *J Dent Res.* 2012;91(11):1026-1031.
114. Schwendicke F, Dorfer CE, Paris S. Incomplete caries removal: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res.* 2013;92(4):306-314.
115. Browning WD. 2014 update: Approaches to caries removal. *J Esthet Restor Dent.* 2015.

116. Yang F, Ning K, Chang X, *et al.* Saliva microbiota carry caries-specific functional gene signatures. *Plos One* 2014;9(2):e76458.
117. Hegde MN, Hegde ND, Ashok A, Shetty S. Biochemical indicators of dental caries in saliva: An *in vivo* study. *Caries Res.* 2014;48(2):170-173..
118. Vitt A, Sofrata A, Slizen V, *et al.* Antimicrobial activity of polyhexamethylene guanidine phosphate in comparison to chlorhexidine using the quantitative suspension method. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14:36-015-0097-x.
119. Nishihara T, Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: A randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health.* 2014;14:110-6831-14-110.
120. Teanpaisan R, Piwat S. *Lactobacillus paracasei* SD1, a novel probiotic, reduces *Mutans* streptococci in human volunteers: A randomized placebo-controlled trial. *Clin Oral Investig.* 2014;18(3):857-862.
121. Gungor OE, Kirzioglu Z, Kivanc M. Probiotics: Can they be used to improve oral health? *Benef Microbes.* 2015:1-10.
122. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. *Vaccine.* 2002;20(16):2027-2044.
123. Kt S, Kmk M, N B, Jimson S, R S. Dental caries vaccine - a possible option? *J Clin Diagn Res.* 2013;7(6):1250-1253.

124. Huang L, Xu QA, Liu C, Fan MW, Li YH. Anti-caries DNA vaccine-induced secretory immunoglobulin A antibodies inhibit formation of *Streptococcus mutans* biofilms *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(2):239-246.
125. Bao R, Yang JY, Sun Y, *et al.* Flagellin-PAc fusion protein inhibits progression of established caries. *J Dent Res.* 2015;94(7):955-960.
126. Shilpa PS, Kaul R, Sultana N, Bhat S. Stem cells: Boon to dentistry and medicine. *Dent Res J (Isfahan).* 2013;10(2):149-154.
127. Rajendran R, Gopal S, Masood H, Vivek P, Deb K. Regenerative potential of dental pulp mesenchymal stem cells harvested from high caries patient's teeth. *J Stem Cells.* 2013;8(1):25-41.
128. Ma D, Cui L, Gao J, *et al.* Proteomic analysis of mesenchymal stem cells from normal and deep carious dental pulp. *Plos One* 2014;9(5):e97026.
129. Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *J Clin Periodontol.* 2009;36(6):458-467.
130. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Periodontología clínica e implantología odontológica.* 4^{ed}. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005: 435-448.
131. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med.* 2015;21(3):172-183.

132. Bostanci N, Bao K, Wahlander A, Grossmann J, Thurnheer T, Belibasakis GN. Secretome of gingival epithelium in response to subgingival biofilms. *Mol Oral Microbiol.* 2015;30(4):323-335.
133. Cavalla F, Biguetti CC, Colavite PM, *et al.* TBX21-1993T/C (rs4794067) polymorphism is associated with increased risk of chronic periodontitis and increased T-bet expression in periodontal lesions, but does not significantly impact the IFN-g transcriptional level or the pattern of periodontopathic bacterial infection. *Virulence.* 2015;6(3):293-304.
134. Topcuoglu N, Kulekci G. 16S rRNA based microarray analysis of ten periodontal bacteria in patients with different forms of periodontitis. *Anaerobe.* 2015;35:35-40.
135. Schmidt J, Jentsch H, Stingu CS, Sack U. General immune status and oral microbiology in patients with different forms of periodontitis and healthy control subjects. *Plos One* 2014;9(10):e109187.
136. Fleetwood AJ, O'Brien-Simpson NM, Veith PD, *et al.* Porphyromonas gingivalis-derived RgpA-kgp complex activates the macrophage urokinase plasminogen activator system: implications for periodontitis. *J Biol Chem.* 2015;290(26):16031-16042.
137. Ramos-Junior ES, Morandini AC, Almeida-da-Silva CL, *et al.* A dual role for P2X7 receptor during *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res.* 2015;94(9):1233-1242.
138. Zhu Y, Dashper SG, Chen YY, Crawford S, Slakeski N, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* synergistic polymicrobial biofilm development. *Plos One* 2013;8(8):e71727.

139. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *Plos One* 2013;8(6):e65520.
140. Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, *et al.* Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front Microbiol.* 2015;6:119.
141. Varghese M, Hegde S, Kashyap R, Maiya AK. Quantitative assessment of calcium profile in whole saliva from smokers and non-smokers with chronic generalized periodontitis. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(5):ZC54-7.
142. Stoykova M, Musurlieva N, Boyadzhiev D. Risk factors for development of chronic periodontitis in Bulgarian patients (pilot research). *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014;28(6):1150-1154.
143. Gangula P, Ravella K, Chukkapalli S, *et al.* Polybacterial periodontal pathogens alter vascular and gut BH4/nNOS/NRF2-phase II enzyme expression. *Plos One* 2015;10(6):e0129885.
144. Velsko IM, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* alters atherosclerosis risk factors and enhances inflammatory markers with an atheroprotective immune response in ApoE null mice. *Plos One* 2015;10(6):e0129795.
145. Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Velsko IM, *et al.* Chronic oral infection with major periodontal bacteria *Tannerella forsythia* modulates systemic atherosclerosis risk factors and inflammatory markers. *Pathog Dis.* 2015;73(3):10.1093.
146. Silosi I, Cojocar M, Foia L, *et al.* Significance of circulating and crevicular matrix metalloproteinase-9 in rheumatoid arthritis-chronic periodontitis association. *J Immunol Res.* 2015;2015:218060.

147. Crotti TN, Dharmapatni AA, Alias E, Haynes DR. Osteoimmunology: Major and costimulatory pathway expression associated with chronic inflammatory induced bone loss. *J Immunol Res.* 2015;2015:281287.
148. Olsen I. From the acta prize lecture 2014: The periodontal-systemic connection seen from a microbiological standpoint. *Acta Odontol Scand.* 2015;73(8):563-568.
149. Henschel M, Keenan AV. Insufficient evidence of effect of periodontal treatment on prevention or management of cardiovascular disease. *Evid Based Dent.* 2015;16(1):17-18.
150. Ardila CM, Guzman IC. Association of *Porphyromonas gingivalis* with high levels of stress-induced hormone cortisol in chronic periodontitis patients. *J Investig Clin Dent.* 2015.
151. Liu Z, Liu Y, Song Y, Zhang X, Wang S, Wang Z. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: A meta-analysis. *Dis Markers.* 2014;2014:931083.
152. Baser U, Gamsiz-Isik H, Cifcibasi E, Ademoglu E, Yalcin F. Plasma and salivary total antioxidant capacity in healthy controls compared with aggressive and chronic periodontitis patients. *Saudi Med J.* 2015;36(7):856-861.
153. Rhodin K, Divaris K, North KE, *et al.* Chronic periodontitis genome-wide association studies: Gene-centric and gene set enrichment analyses. *J Dent Res.* 2014;93(9):882-890.
154. Guedes RA, Planello AC, Andia DC, De Oliveira NF, de Souza AP. Association of SOCS1 (- 820) (rs33977706) gene polymorphism with chronic periodontitis: A case-control study in Brazilians. *Meta Gene.* 2015;5:124-128.

155. Meusel DR, Ramacciato JC, Motta RH, Brito Junior RB, Florio FM. Impact of the severity of chronic periodontal disease on quality of life. *J Oral Sci.* 2015;57(2):87-94.
156. Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, *et al.* Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the joint EU/USA periodontal epidemiology working group. *J Clin Periodontol.* 2015;42(5):407-412.
157. Szafranski SP, Wos-Oxley ML, Vilchez-Vargas R, *et al.* High-resolution taxonomic profiling of the subgingival microbiome for biomarker discovery and periodontitis diagnosis. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(3):1047-1058.
158. Bravo Pérez M, Casals Peidró E, Cortés Martinicorena FJ, Llodra Calvo JC. Encuesta de salud oral en españa 2005. *RCOE* 2006; 11:409-456.
159. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-6.
160. American Academy of Periodontology task force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. *J Periodontol.* 2015;86(7):835-838.
161. Kim JJ, Kim CJ, Camargo PM. Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. *J Calif Dent Assoc.* 2013;41(2):119-124.
162. Armitage GC, Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol.* 2003;74(8):1237-1247.

163. Gusmao ES, Picarte AC, Ben Barbosa MB, Rosing CK, Cimoies R. Correlation between clinical and radiographic findings on the occurrence of furcation involvement in patients with periodontitis. *Indian J Dent Res.* 2014;25(5):572-575.
164. Chakrapani S, Sirisha K, Srilalitha A, Srinivas M. Choice of diagnostic and therapeutic imaging in periodontics and implantology. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(6):711-718.
165. Onabolu O, Donos N, Tu YK, Darbar U, Nibali L. Periodontal progression based on radiographic records: An observational study in chronic and aggressive periodontitis. *J Dent.* 2015;43(6):673-682.
166. Chifor R, Badea ME, Hedesiu M, Chifor I. Identification of the anatomical elements used in periodontal diagnosis on 40 MHz periodontal ultrasonography. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(1):149-153.
167. Miller PD,Jr, McEntire ML, Marlow NM, Gellin RG. An evidenced-based scoring index to determine the periodontal prognosis on molars. *J Periodontol.* 2014;85(2):214-225.
168. Dhulipalla R, Bade S, Bollepalli AC, Katuri KK, Devulapalli NS, Swarna C. Evaluation of periodontal risk in adult patients using two different risk assessment models - A pilot study. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(2):ZC25-9.
169. Loke W, Coomes AM, Eskow A, Vierra M, Mealey BL, Huynh-Ba G. Formulating a global prognosis and treatment plan for the periodontally compromised patient: A reconstructive vs. an adaptive approach. *Compend Contin Educ Dent.* 2014;35(9):668-70, 672-3, 676-7.

170. Imamura K, Takayama S, Saito A, *et al.* Evaluation of a novel immunochromatographic device for rapid and accurate clinical detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque. *J Microbiol Methods*. 2015;117:4-10.
171. Untch M, Schlagenhaut U. Inter- and intra-test agreement of three commercially available molecular diagnostic tests for the identification of periodontal pathogens. *Clin Oral Investig*. 2015;19(8):2045-52.
172. Ishii Y, Imamura K, Kikuchi Y, *et al.* Point-of-care detection of *Tannerella forsythia* using an antigen-antibody assisted dielectrophoretic impedance measurement method. *Microb Pathog*. 2015;82:37-42.
173. Ding YJ, Ge CR, Yao HY. Application of substrate utilization patterns and terminal restriction fragment length polymorphism analysis to characterize the oral bacterial community of healthy subjects and patients with periodontitis. *Exp Ther Med*. 2015;9(5):2013-2017.
174. Matarese G, Curro M, Isola G, *et al.* Transglutaminase 2 up-regulation is associated with RANKL/OPG pathway in cultured HPDL cells and THP-1-differentiated macrophages. *Amino Acids*. 2015;47(11):2447-55.
175. Ding C, Chen X, Zhang PT, *et al.* Matrix metalloproteinase-3 -1171 5A/6A polymorphism (rs35068180) is associated with risk of periodontitis. *Sci Rep*. 2015;5:11667.
176. Izadi Borujeni S, Mayer M, Eickholz P. Activated matrix metalloproteinase-8 in saliva as diagnostic test for periodontal disease? A case-control study. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204(6):665-72.

177. Ramseier CA, Eick S, Bronnimann C, Buser D, Bragger U, Salvi GE. Host-derived biomarkers at teeth and implants in partially edentulous patients. A 10-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2016 Feb;27(2):211-7.
178. Dosseva-Panova VT, Popova CL, Panov VE. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. *Folia Med (Plovdiv).* 2014;56(3):152-160.
179. Manau C., Zabalegui I., Noguerol B., Llodra J.C., *et al.* Control de placa e higiene bucodental. resumen de los resultados del 1^{er} workshop ibérico. *RCOE.* 2004;9(2):215-223.
180. Hrishi T, Kundapur P, Naha A, Thomas B, Kamath S, Bhat G. Effect of adjunctive use of green tea dentifrice in periodontitis patients - A randomized controlled pilot study. *Int J Dent Hyg.* 2015. doi: 10.1111/idh.12131.
181. Eberhard J, Jepsen S, Jervoe-Storm PM, Needleman I, Worthington HV. Full-mouth treatment modalities (within 24 hours) for chronic periodontitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;4:CD004622.
182. Kurgan S, Onder C, Altingoz SM, *et al.* High sensitivity detection of salivary 8-hydroxy deoxyguanosine levels in patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2015. 50(6):766-74.
183. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, *et al.* Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc.* 2015;146(7):525-535.

184. Froum SJ, Weinberg MA. An evaluation of antibiotic use in periodontal and implant practices. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2015;35(4):481-487.
185. Flemmig TF, Beikler T. Control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011;55(1):9-15.
186. Estanislau IM, Terceiro IR, Lisboa MR, *et al.* Pleiotropic effects of statins on the treatment of chronic periodontitis--a systematic review. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;79(6):877-885.
187. Anyanechi CE, Chukwuneke FN, Ngim N. Clinical evaluation of the efficacy of arthocare forte, a chondro-protective and anti-arthritic drug in the management of bacterial plaque-induced chronic periodontitis. *Ann Med Health Sci Res.* 2015;5(3):157-162.
188. Tekce M, Ince G, GURSOY H, *et al.* Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: A 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2015;42(4):363-372.
189. Schmuck J, Beckert S, Brandt S, *et al.* Extract from *Rumex acetosa* L. for prophylaxis of periodontitis: Inhibition of bacterial *in vitro* adhesion and of gingipains of *Porphyromonas gingivalis* by epicatechin-3-O-(4beta-->8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-di-gallate). *Plos One* 2015;10(3):e0120130.
190. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, Edwards CA, Ramage G, Combet E. Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food Funct.* 2015;6(3):719-729.

191. Adegboye AR, Boucher BJ, Kongstad J, Fiehn NE, Christensen LB, Heitmann BL. Calcium, vitamin D, casein and whey protein intakes and periodontitis among Danish adults. *Public Health Nutr.* 2015;19(3):503-10.
192. Mailoa J, Lin GH, Khoshkam V, MacEachern M, Chan HL, Wang HL. Long term effect of four surgical periodontal therapies and one non-surgical therapy: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2015;86(10):1150-8.
193. Aimetti M, Mariani GM, Ferrarotti F, *et al.* Osseous resective surgery with and without fibre retention technique in the treatment of shallow intrabony defects: A split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2015;42(2):182-189.
194. Pradeep AR, Nagpal K, Karvekar S, Patnaik K, Naik SB, Guruprasad CN. Platelet-rich fibrin with 1% metformin for the treatment of intrabony defects in chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2015;86(6):729-737.
195. Bottino MC, Thomas V. Membranes for periodontal regeneration - A materials perspective. *Front Oral Biol.* 2015;17:90-100.
196. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, *et al.* Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dent Mater.* 2012;28(7):703-721.
197. Ding YS, Zhao Y, Xiao YY, Zhao G. Toll-like receptor 4 gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(4):6186-6192.
198. Sellers RM, Payne JB, Yu F, LeVan TD, Walker C, Mikuls TR. TLR4 Asp299Gly polymorphism may be protective against chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2015; 51(2):203-11.

199. Ma L, Chu WM, Zhu J, Wu YN, Wang ZL. Interleukin-1beta (3953/4) C-->T polymorphism increases the risk of chronic periodontitis in asians: Evidence from a meta-analysis of 20 case-control studies. *Arch Med Sci.* 2015;11(2):267-273.
200. Mao M, Zeng XT, Ma T, He W, Zhang C, Zhou J. Interleukin-1alpha -899 (+4845) C-->T polymorphism increases the risk of chronic periodontitis: Evidence from a meta-analysis of 23 case-control studies. *Gene.* 2013;532(1):114-119.
201. Lavu V, Venkatesan V, Venkata B, Venugopal P, Paul SF, Rao SR. Polymorphic regions in the interleukin-1 gene and susceptibility to chronic periodontitis: A genetic association study. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015;19(4):175-181.
202. Lavu V, Venkatesan V, Rao SR. The epigenetic paradigm in periodontitis pathogenesis. *J Indian Soc Periodontol.* 2015;19(2):142-149.
203. Han MX, Ding C, Kyung HM. Genetic polymorphisms in pattern recognition receptors and risk of periodontitis: Evidence based on 12,793 subjects. *Hum Immunol.* 2015;76(7):496-504.
204. Ogata Y, Matsui S, Kato A, Zhou L, Nakayama Y, Takai H. MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from japanese patients. *J Oral Sci.* 2014;56(4):253-260.
205. Vikram V, Ramakrishnan T, Anilkumar K, Ambalavanan N. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis following periodontal flap surgery. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(2):ZC13-6.
206. Tabari ZA, Ghaedi FB, Azadmehr A, *et al.* Salivary visfatin concentration in response to non-surgical periodontal therapy. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(4):ZC05-8.

207. Xue F, Shu R, Xie Y. The expression of NLRP3, NLRP1 and AIM2 in the gingival tissue of periodontitis patients: RT-PCR study and immunohistochemistry. *Arch Oral Biol.* 2015;60(6):948-958.
208. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martinez JA, Marti A. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB J.* 2015;29(9):3595-3611.
209. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(3):359-383.
210. Maijala M, Rautemaa R, Jarvensivu A, Richardson M, Salo T, Tjaderhane L. *Candida albicans* does not invade carious human dentine. *Oral Dis.* 2007;13(3):279-284.
211. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *Plos Pathog.* 2010;6(1):e1000713.
212. Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites--a brief review. *Arch Oral Biol.* 2011;56(10):951-959.
213. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 1):10-24.

214. Machado AG, Komiyama EY, Santos SS, Jorge AO, Brighenti FL, Koga-Ito CY. *In vitro* adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis. J Appl Oral Sci. 2011;19(4):384-387.
215. De Paula SB, Morey AT, Santos JP, *et al.* Oral *Candida* colonization in HIV-infected patients in Londrina-PR, Brazil: Antifungal susceptibility and virulence factors. J Infect Dev Ctries. 2015;9(12):1350-1359.
216. Guarro J. Taxonomy and biology of fungi causing human infection. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(1):33-39.
217. Murray PR, Rosenthal. KS, Pfaller. MA. Pathogenesis of fungal disease. medical microbiology. 6th ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier; 2009.
218. Bastidas RJ, Heitman J. Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(2):351-352.
219. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. J Oral Maxillofac Pathol. 2014;18(Suppl 1):S81-5.
220. Kamikawa Y, Mori Y, Nagayama T, *et al.* Frequency of clinically isolated strains of oral *Candida* species at Kagoshima University Hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2006-2007 and 2012-2013. BMC Oral Health. 2014;14:14-6831-14-14.
221. Calderone R, Odds FC, Boekhout T. *Candida albicans*: Fundamental research on an opportunistic human pathogen. FEMS Yeast Res. 2009;9(7):971-972.

222. Conti HR, Peterson AC, Brane L, *et al.* Oral-resident natural Th17 cells and gammadelta T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. *J Exp Med.* 2014;211(10):2075-2084.
223. Li R, Puri S, Tati S, Cullen PJ, Edgerton M. *Candida albicans* Cek1 mitogen-activated protein kinase signaling enhances fungicidal activity of salivary histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3460-3468.
224. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006;51(8):672-680.
225. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: Forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res.* 2014;93(5):445-451.
226. Hibino K, Samaranayake LP, Hagg U, Wong RW, Lee W. The role of salivary factors in persistent oral carriage of *Candida* in humans. *Arch Oral Biol.* 2009;54(7):678-683.
227. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Hofling JF, Goncalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: A brief review. *J Oral Sci.* 2010;52(2):177-185.
228. Makihira S, Nikawa H, Tamagami M, *et al.* Bacterial and *Candida* adhesion to intact and denatured collagen *in vitro*. *Mycoses.* 2002;45(9-10):389-392.
229. O'Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD. Adhesion of *Candida albicans* to oral Streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology.* 2000;146:41-48.

230. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, William Costerton J, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: Impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(1):193-213.
231. Bastidas RJ, Heitman J, Cardenas ME. The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *Plos Pathog.* 2009;5(2):e1000294.
232. Hoyer LL, Oh SH, Jones R, Cota E. A proposed mechanism for the interaction between the *Candida albicans* Als3 adhesin and Streptococcal cell wall proteins. *Front Microbiol.* 2014;5:564.
233. Zheng X, Wang Y, Wang Y. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J.* 2004;23(8):1845-1856.
234. Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL, Kadosh D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(2):599-604.
235. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell.* 2003;2(5):1053-1060.
236. Heitman J, Ebrary I. *Molecular principles of fungal pathogenesis.* Washington, D.C.: ASM Press; 2006:684.
237. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: The evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.* 2002;81(2):101-110.

238. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):288-305.
239. Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun.* 2001;69(1):405-412.
240. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 2004;6(10):915-926.
241. Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Goncalves RB, Hofling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. *Arch Oral Biol.* 2008;53(12):1172-1178.
242. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindos G. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11:119.
243. Trevino-Rangel Rde J, Gonzalez JG, Gonzalez GM. Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex. *Med Mycol.* 2013;51(3):331-335.
244. Ingham CJ, Boonstra S, Levels S, de Lange M, Meis JF, Schneeberger PM. Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide. *Plos One* 2012;7(3):e33818.
245. Jayatilake JA. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. *Mycopathologia.* 2011;171(4):235-250.

246. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(4):208-210.
247. Carvalho-Pereira J, Vaz C, Carneiro C, Pais C, Sampaio P. Genetic variability of *Candida albicans* Sap8 propeptide in isolates from different types of infection. *Biomed Res Int.* 2015;148343.
248. Odds FC. Secreted proteinases and *Candida albicans* virulence. *Microbiology.* 2008;154:3245-3246.
249. Li W, Yu D, Gao S, Lin J, Chen Z, Zhao W. Role of *Candida albicans*-secreted aspartyl proteinases (SAPS) in severe early childhood caries. *Int J Mol Sci.* 2014;15(6):10766-10779.
250. Quindós G. *Micología clínica.* Barcelona: Elsevier; 2015.
251. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):122-43.
252. Ellepola AN, Joseph BK, Khan ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate. *Mycoses.* 2014;57(9):553-559.
253. Singaravelu K, Gacser A, Nosanchuk JD. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis.* *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):16-21.
254. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: An emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res.* 2007;86(3):204-215.

255. Nayak AP, Green BJ, Beezhold DH. Fungal hemolysins. *Med Mycol.* 2013;51(1):1-16.
256. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: An update. *Eukaryot Cell.* 2005;4(4):633-638.
257. Ramage G, Robertson SN, Williams C. Strength in numbers: Antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43(2):114-120.
258. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2011;19(5):241-247.
259. Haran J, Boyle H, Hokamp K, *et al.* Telomeric ORFs (TLOs) in *Candida spp.* encode mediator subunits that regulate distinct virulence traits. *Plos Genet.* 2014;10(10):e1004658.
260. Arzmi MH, Dashper S, Catmull D, Cirillo N, Reynolds EC, McCullough M. Coaggregation of *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain dependent. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(5):10.1093.
261. Jack AA, Daniels DE, Jepson MA, *et al.* *Streptococcus gordonii* comCDE (competence) operon modulates biofilm formation with *Candida albicans*. *Microbiology.* 2015;161(Pt 2):411-421.
262. Guo Y, Wei C, Liu C, *et al.* Inhibitory effects of oral *Actinomyces* on the proliferation, virulence and biofilm formation of *Candida albicans*. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1368-1374.

263. Bachtiar EW, Bachtiar BM, Jarosz LM, *et al.* AI-2 of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:94.
264. Kumar PS, Mason MR. Mouthguards: Does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health? *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:35.
265. Wu T, Cen L, Kaplan C, *et al.* Cellular components mediating coadherence of *Candida albicans* and *Fusobacterium nucleatum*. *J Dent Res.* 2015;94(10):1432-8.
266. Bassetti M, Mikulska M, Viscoli C. Bench-to-bedside review: Therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care.* 2010;14(6):244.
267. Coronado-Castellote L, Jimenez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent.* 2013;5(5):e279-86.
268. Axell T, Samaranayake LP, Reichart PA, Olsen I. A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;84(2):111-112.
269. Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, *et al.* Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2011;49(2):208-211.
270. Hertel M, Schmidt-Westhausen AM, Strietzel FP. Local, systemic, demographic, and health-related factors influencing pathogenic yeast spectrum and antifungal drug administration frequency in oral candidiasis: A retrospective study. *Clin Oral Investig.* 2015. [Epub ahead of print]

271. Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000. 2009;49:39-59.
272. Isham N, Ghannoum MA. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. *Mycoses*. 2010;53(5):434-437.
273. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*. 2010;98(1):15-25.
274. Bissell V, Felix DH, Wray D. Comparative trial of fluconazole and amphotericin in the treatment of denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993;76(1):35-39.
275. Martin-Mazuelos E, Aller AI, Romero MJ, *et al*. Response to fluconazole and itraconazole of *Candida* spp. in denture stomatitis. *Mycoses*. 1997;40(7-8):283-289.
276. Sanchez Vargas LO, Eraso E, Carrillo-Munoz AJ, Aguirre JM, Gaitan-Cepeda LA, Quindos G. *In vitro* activity of voriconazole against Mexican oral yeast isolates. *Mycoses*. 2010;53(3):200-203.
277. Mann PA, McNicholas PM, Chau AS, *et al*. Impact of antifungal prophylaxis on colonization and azole susceptibility of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5026-5034.
278. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, *et al*. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):503-535.
279. Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20(9):462-470.

280. Oliver BG, Silver PM, White TC. Polyene susceptibility is dependent on nitrogen source in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(6):1302-1308.
281. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003;11(6):272-279.
282. Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral *Candidal* infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(2):172-198.
283. Arikan S, Ostrosky-Zeichner L, Lozano-Chiu M, *et al.* *In vitro* activity of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical *Candida* isolates. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1406-1412.
284. Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Ruesga MT, *et al.* *In vitro* activity of a new liposomal nystatin formulation against opportunistic fungal pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(8):645-648.
285. Melkoumov A, Goupil M, Louhichi F, Raymond M, de Repentigny L, Leclair G. Nystatin nanosizing enhances *in vitro* and *in vivo* antifungal activity against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(9):2099-2105.
286. Martin MJ, Calpena AC, Fernandez F, Mallandrich M, Galvez P, Clares B. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. *Carbohydr Polym.* 2015;117:140-149.
287. Reis CP, Roque LV, Baptista M, Rijo P. Innovative formulation of nystatin particulate systems in toothpaste for candidiasis treatment. *Pharm Dev Technol.* 2015:1-6.

288. Ellepola AN, Samaranayake LP. Antimycotic agents in oral candidosis: An overview: 1. clinical variants. Dent Update. 2000;27(3):111-2, 114-6.
289. Samaranayake L. Commensal oral *Candida* in Asian cohorts. Int J Oral Sci. 2009;1(1):2-5.
290. Gajra B, Pandya SS, Singh S, Rabari HA. Mucoadhesive hydrogel films of econazole nitrate: Formulation and optimization using factorial design. J Drug Deliv. 2014;2014:305863.
291. Collins CD, Cookinham S, Smith J. Management of oropharyngeal candidiasis with localized oral miconazole therapy: Efficacy, safety, and patient acceptability. Patient Prefer Adherence. 2011;5:369-374.
292. Czerninski R, Pikovsky A, Gati I, Friedman M, Steinberg D. Comparison of the efficacy of a novel sustained release clotrimazole varnish and clotrimazole troches for the treatment of oral candidiasis. Clin Oral Investig. 2015;19(2):467-473.
293. De Cremer K, Lanckacker E, Cools TL, *et al.* Artemisinin, new miconazole potentiators resulting in increased activity against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(1):421-426.
294. Brito GN, Inocencio AC, Querido SM, Jorge AO, Koga-Ito CY. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individuals. Braz Oral Res. 2011;25(1):28-33.
295. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, *et al.* Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 2009;22(2):291-321.

296. Uchida K, Shimogawara K, Yamaguchi H. Correlation of *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of itraconazole intravenous and oral solubilized formulations by testing *Candida* strains with various itraconazole susceptibilities in a murine invasive infection. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):626-634.
297. Rex JH, Pappas PG, Karchmer AW, *et al.* A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. *Clin Infect Dis.* 2003;36(10):1221-1228.
298. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: Results from a global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):551-559.
299. Dos Santos Abrantes PM, McArthur CP, Africa CW. Multi-drug resistant oral *Candida* species isolated from HIV-positive patients in South Africa and Cameroon. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79(2):222-227.
300. Li Y, Theuretzbacher U, Clancy CJ, Nguyen MH, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of posaconazole. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49(6):379-396.
301. Li X, Brown N, Chau AS, *et al.* Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(1):74-80.
302. Carrillo-Munoz AJ, Quindos G, Ruesga M, *et al.* Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and amphotericin B against yeasts from

- oropharyngeal candidiasis and other infections. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(3):317-319.
303. Carrillo-Munoz AJ, Tur-Tur C, Hernandez-Molina JM, *et al.* Antifungal activity of posaconazole against *Candida* spp. and non-*Candida* clinical yeasts isolates. *Rev Esp Quimioter.* 2010;23(3):122-125.
304. Skiest DJ, Vazquez JA, Anstead GM, *et al.* Posaconazole for the treatment ofazole-refractory oropharyngeal and esophageal candidiasis in subjects with HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2007;44(4):607-614.
305. Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Eraso E, Canton E, Peman J. *In vitro* antifungal activity of voriconazole: New data after the first years of clinical experience. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24(3):198-208.
306. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3522-3528.
307. Odds FC. Secreted proteinases and *Candida albicans* virulence. *Microbiology.* 2008;154(Pt 11):3245-3246.
308. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, *et al.* *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: Six years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):150-156.
309. Ponton J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:78-82.

310. Nieminen MT, Hernandez M, Novak-Frazer L, *et al.* DL-2-hydroxyisocaproic acid attenuates inflammatory responses in a murine *Candida albicans* biofilm model. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(9):1240-1245.
311. Montejo Gonzalez JC, Catalan Gonzalez M, Leon Gil C. Therapeutic efficacy of anidulafungin for the treatment of oesophageal candidiasis, candidemia and invasive candidiasis. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(2):107-118.
312. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida spp.* by use of clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2846-2856.
313. Paul S, Moye-Rowley WS. Multidrug resistance in fungi: Regulation of transporter-encoding gene expression. *Front Physiol.* 2014;5:143.
314. Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1354:1-11.
315. Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis.* 2003;36:S31-41.
316. de Micheli M, Bille J, Schueller C, Sanglard D. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol.* 2002;43(5):1197-1214.
317. Holmes AR, Lin YH, Niimi K, *et al.* ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p does to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(11):3851-3862.

318. Morschhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1587(2-3):240-248.
319. Lettner T, Zeidler U, Gimona M, Hauser M, Breitenbach M, Bito A. *Candida albicans* AGE3, the ortholog of the *S. cerevisiae* ARF-GAP-encoding gene GCS1, is required for hyphal growth and drug resistance. *Plos One* 2010;5(8):e11993.
320. Ford CB, Funt JM, Abbey D, *et al.* The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *Elife*. 2015;4:e00662.
321. Smith WL, Edlind TD. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: Correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(11):3532-3539.
322. De Backer MD, Van Dijck P. Progress in functional genomics approaches to antifungal drug target discovery. *Trends Microbiol*. 2003;11(10):470-478.
323. Rogers PD, Barker KS. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(4):1220-1227.
324. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X, *et al.* Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3308-3317.
325. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(6):973-980.

326. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. Arch Oral Biol. 2004;49(10):789-798.
327. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. Periodontol 2000. 2011;55(1):250-265.
328. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect Immun. 2003;71(8):4333-4340.
329. Peman García J, Cantón-Lacasa E. Las pruebas de sensibilidad antifúngica en un laboratorio de microbiología clínica. Rev Esp Quimioter. 1996;9:17-2.
330. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts, fourth informational supplement. CLSI document M27-S4. 2012.
331. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts; approved standard, 3rd edition. CLSI document M27-S3. 2008.
332. Espinel-Ingroff A. Clinical relevance of antifungal resistance. Infect Dis Clin North Am. 1997;11(4):929-944.
333. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazole and *Candida* spp. as determined by 24-hour CLSI broth microdilution. J Clin Microbiol. 2011;49(2):630-637.

334. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D, CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat*. 2010;13(6):180-195.
335. Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the European committee on antibiotic susceptibility testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3841-3844.
336. Orasch C, Marchetti O, Garbino J, *et al*. *Candida* species distribution and antifungal susceptibility testing according to European committee on antimicrobial susceptibility testing and new vs. old clinical and laboratory standards institute clinical breakpoints: A 6-year prospective Candidaemia survey from the fungal infection network of switzerland. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(7):698-705.
337. Kahlmeter G. The 2014 garrod lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement? *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(9):2427-39.
338. Lombardi G, Farina C, Andreoni S, *et al*. Comparative evaluation of sensititre YeastOne vs. the NCCLS M27A protocol and E-test for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Mycoses*. 2004;47(9-10):397-401.
339. Torres-Rodriguez JM, Alvarado-Ramirez E. *In vitro* susceptibilities to yeasts using the ATB FUNGUS 2 method, compared with sensititre yeast one and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(3):658-661.

340. Canton E, Peman J, Iniguez C, *et al.* Epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for six *Candida* species as determined by the colorimetric sensititre YeastOne method. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2691-2695.
341. Freitas EM, Monteiro LC, Fernandes MB, *et al.* Antifungal susceptibility *in vitro* determined by the Etest(®) for *Candida* obtained from the oral cavity of irradiated and elderly individuals. *Braz Dent J.* 2015;26(2):99-104.
342. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, *et al.* Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *J Clin Microbiol.* 2015;53(6):1823-1830.
343. Llodra Calvo JC, Bravo Pérez M, Cortés Martinicorena FJ. Encuesta de salud oral en España (2000). RCOE y SESPO. 2000.
344. Becker T, Levin L, Shochat T, Einy S. How much does the DMFT index underestimate the need for restorative care? *J Dent Educ.* 2007;71(5):677-681.
345. Jiang Q, Yu M, Min Z, Yi A, Chen D, Zhang Q. AP-PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in caries-free and caries-active subjects. *Mol Cell Biochem.* 2012;365(1-2):159-164.
346. Yang F, Zeng X, Ning K, *et al.* Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J.* 2012;6(1):1-10.

347. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999;26(3):143-152.
348. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms *in vivo*. *Oral Dis.* 2004;10(2):106-112.
349. Nickles K, Scharf S, Rollke L, Mayer I, Mayer M, Eickholz P. Detection of subgingival periodontal pathogens-comparison of two sampling strategies. *Clin Oral Investig.* 2016;20(3):571-9.
350. Williams DW, Lewis MA. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000;6(1):3-11.
351. Byadarahally Raju S, Rajappa S. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *ISRN Dent.* 2011;2011:487921.
352. Mun MS, Yap T, Alnuaimi AD, Adams GG, McCullough MJ. Oral Candidal carriage in asymptomatic patients. *Aust Dent J.* 2015. doi: 10.1111/adj.12335.
353. Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, *et al.* Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(6):505-509.
354. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 2001;28(9):860-864.

355. Premkumar J, Ramani P, Chandrasekar T, Natesan A, Premkumar P. Detection of species diversity in oral *Candida* colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. *J Nat Sci Biol Med.* 2014;5(1):148-154.
356. Matic Petrovic S, Cimbaljevic M, Radunovic M, Kuzmanovic Pficer J, Jotic A, Pucar A. Detection and sampling methods for isolation of *Candida* spp. from oral cavities in diabetics and non-diabetics. *Braz Oral Res.* 2015;29:10.1590/1807-3107.
357. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, *et al.* Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3340-3345.
358. Pravin Charles MV, Kali A, Joseph NM. Performance of chromogenic media for *Candida* in rapid presumptive identification of *Candida* species from clinical materials. *Pharmacognosy Res.* 2015;7:S69-73.
359. Blignaut E, van Heerden WF. Molecular and histological association between *Candida albicans* from oral soft tissue and carious dentine of HIV-positive children. *Mycopathologia.* 2015;180(3-4):193-201.
360. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(2):230-233.
361. Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: Temporal analysis of antifungal drug

- resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82(4):303-313.
362. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin Microbiol.* 1988;26(11):2465-2466.
363. McManus BA, Maguire R, Cashin PJ, *et al.* Enrichment of multilocus sequence typing clade 1 with oral *Candida albicans* isolates in patients with untreated periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2012;50(10):3335-3344.
364. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(3):175-181.
365. Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2246-2254.
366. Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res.* 2011;45(2):100-106.
367. Moreira D, Spolidorio DM, Rodrigues JA, *et al.* *Candida spp.* biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba-SP, Brazil. *Pesqui Odontol Bras.* 2001;15(3):187-195.

368. Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastri ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam*. 2010;23(1):20-26.
369. Cho T, Nagao J, Imayoshi R, Tanaka Y. Importance of diversity in the oral microbiota including *Candida* species revealed by high-throughput technologies. *Int J Dent*. 2014;2014:454391.
370. Rams TE, Flynn MJ, Slots J. Subgingival microbial associations in severe human periodontitis. *Clin Infect Dis*. 1997;25:S224-6.
371. Pfaller MA, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Antifungal susceptibilities of *Candida*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* from the Asia and Western Pacific region: Data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010-2012). *J Antibiot (Tokyo)*. 2015 ;68(9):556-61.
372. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol*. 1997;42(7):513-520.
373. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, *et al*. *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2003;46(11-12):471-478.
374. Villar-Vidal M, Marcos-Arias C, Eraso E, Quindos G. Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(9):660-665.
375. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindos G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses*. 2011;54(4):e10-6.

376. Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites--a brief review. *Arch Oral Biol*. 2011;56(10):951-959.
377. Cannon RD, Nand AK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology*. 1995;141:213-219.
378. Diaz PI, Strausbaugh LD, Dongari-Bagtzoglou A. Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: Linking the clinic and the bench. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:101.
379. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: New insights. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(2):86-94.
380. Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell*. 2009;8(11):1658-1664.
381. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *Plos Pathog*. 2010;6(4):e1000886.
382. Edwards JE, Jr. Fungal cell wall vaccines: An update. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 7):895-903.
383. Moragues MD, Rementeria A, Sevilla MJ, Eraso E, Quindos G. *Candida* antigens and immune responses: Implications for a vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(8):1001-1012.

384. Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, *et al.* Acid production by oral strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. *Caries Res.* 2009;43(2):83-91.
385. Pizzo G, Barchiesi F, Falconi Di Francesco L, *et al.* Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival *Candida albicans* isolates. *Arch Oral Biol.* 2002;47(3):189-196.
386. Gutierrez J, Morales P, Gonzalez MA, Quindos G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol.* 2002;42(3):207-227.
387. Trevino-Rangel Rde J, Gonzalez JG, Gonzalez GM. Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex. *Med Mycol.* 2013;51(3):331-335.
388. Canton E, Peman J, Quindos G, *et al.* Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(12):5590-5596.
389. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Carrillo-Munoz AJ, Quindos G. *In vitro* activities of new triazole antifungal agents, posaconazole and voriconazole, against oral *Candida* isolates from patients suffering from denture stomatitis. *Mycopathologia.* 2012;173(1):35-46.
390. Isham N, Ghannoum MA. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. *Mycoses.* 2010;53(5):434-437.

391. Smiline GA, Pandi SK, Hariprasad P, Raguraman R. A preliminary study on the screening of emerging drug resistance among the caries pathogens isolated from carious dentine. *Indian J Dent Res.* 2012;23(1):26-30.
392. Waltimo TM, Orstavik D, Meurman JH, Samaranayake LP, Haapasalo MP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* isolates from apical and marginal periodontitis to common antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15(4):245-248.
393. Ito CY, de Paiva Martins CA, Loberto JC, dos Santos SS, Jorge AO. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from patients with chronic periodontitis and from control patients. *Braz Oral Res.* 2004;18(1):80-84.
394. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol.* 2011;37(4):328-336.
395. Bensadoun RJ, Daoud J, El Gueddari B, *et al.* Comparison of the efficacy and safety of miconazole 50-mg mucoadhesive buccal tablets with miconazole 500-mg gel in the treatment of oropharyngeal candidiasis: A prospective, randomized, single-blind, multicenter, comparative, phase III trial in patients treated with radiotherapy for head and neck cancer. *Cancer.* 2008;112(1):204-211.
396. Aljaeid BM, Hosny KM. Miconazole-loaded solid lipid nanoparticles: Formulation and evaluation of a novel formula with high bioavailability and antifungal activity. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:441-447.
397. Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite J, Rautemaa R. Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41(1):65-69.

398. Razzaghi-Abyaneh M, Sadeghi G, Zeinali E, *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida spp.* isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *J Mycol Med.* 2014;24(2):e43-50.
399. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, *et al.* Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):617-623.
400. Reis CP, Roque LV, Baptista M, Rijo P. Innovative formulation of nystatin particulate systems in toothpaste for candidiasis treatment. *Pharm Dev Technol.* 2015:1-6.
401. Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, *et al.* *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2015;6(1):29-39.
402. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, *et al.* *In vivo* evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine(®) against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14(7):1319-1328.
403. Biyani P. Key concepts of amalgam cavity design. dentalnotebook | RSS Feed. 2015. <http://www.dentalnotebook.com>.
404. Jenson L, Budenz AW, Featherstone JD, Ramos-Gomez FJ, Spolsky VW, Young DA. Clinical protocols for caries management by risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2007;35(10):714-723.

405. Dixon DM, Walsh TJ. Antifungal agents. In: Baron S, ed. Medical microbiology. 4th ed. Galveston Texas.1996.

406. Alpite Illueca FM, Buitrago Vera P, de Grado Cabanilles P, Fuenmayor Fernandez V, Gil Loscos FJ. Periodontal regeneration in clinical practice. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11(4):E382-92.