

Identificación fenotípica de *Candida dubliniensis* aislada de candidosis de mucosa oral en pacientes inmunodeprimidos

Phenotypic identification of Candida dubliniensis isolated from candidiasis of oral cavity in immunocompromised patients.

Graciela Mariel-Carballo

Resumen

ANTECEDENTES: *Candida dubliniensis* tiene distribución geográfica universal y está implicada como causa de candidosis oral en pacientes con VIH/SIDA. Se asocia con mucositis grave de la cavidad oral, esofagitis, candidemias y candidosis invasoras.

OBJETIVOS: Identificar fenotípicamente *C. dubliniensis* en lesiones orofaríngeas en pacientes inmunodeprimidos; así como determinar su frecuencia de distribución y su forma clínica.

MATERIAL Y MÉTODO: Estudio observacional, prospectivo y descriptivo, efectuado del 1 de julio de 2013 al 31 de octubre de 2014 con pacientes inmunodeprimidos, con datos clínicos de candidosis oral, provenientes de cinco servicios del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba, Argentina. Con las muestras obtenidas, se realizaron exámenes micológicos directos, cultivos e identificación fenotípica de los aislamientos.

RESULTADOS: Se incluyeron 145 pacientes inmunodeprimidos; la candidosis oral se confirmó en 127 pacientes; se aislaron 9 (6%) casos con *C. dubliniensis*, principalmente en los grupos de VIH/SIDA y con enfermedades autoinmunitarias (44% cada uno); 7 (78%) de estos casos tuvieron candidosis oral de repetición y predominó la forma pseudomembranosa. La levadura más aislada fue *C. albicans*: 78 (52%) casos; hubo 83% aislamientos únicos y 17% asociados; en un caso *C. dubliniensis* se asoció con *Candida glabrata* y *Candida krusei*. *C. dubliniensis* se aisló en 55% de la población femenina y el promedio de edad de los pacientes afectados fue de 49.9 años.

CONCLUSIONES: *C. dubliniensis* se aisló en 9 casos (6%), principalmente con forma pseudomembranosa. Predomina en pacientes con VIH/SIDA y con enfermedades autoinmunitarias.

PALABRAS CLAVE: *Candida dubliniensis*, pacientes inmunodeprimidos, candidosis oral.

Abstract

BACKGROUND: *Candida dubliniensis* has a universal geographical distribution and is involved as the cause of oral candidiasis in HIV/AIDS patients. It has been associated with very severe candidiasis mucositis of the oral cavity, esophagitis, candidemias and invasive candidiasis.

OBJECTIVES: To phenotypically identify *C. dubliniensis* in oropharynx lesions among immunocompromised patients; as well as to establish its frequency of distribution and its clinical form.

MATERIAL AND METHOD: An observational, prospective and descriptive study of immunocompromised patients with oral candidiasis, coming from five services of

Jefa del Departamento Laboratorio de Micología. Cátedra Clínica Dermatológica. Hospital Nacional de Clínicas. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Miembro de la Comisión Directiva, Asociación Argentina de Micología.

Recibido: agosto 2018

Aceptado: octubre 2018

Correspondencia

Graciela Mariel Carballo
bestgmc@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Mariel-Carballo G. Identificación fenotípica de *Candida dubliniensis* aislada de candidosis de mucosa oral en pacientes inmunodeprimidos. Dermatol Rev Mex. 2019 enero-febrero;63(1):14-25.

Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba, Argentina, from January 1st 2013 to October 31st 2014. Direct mycological tests, culture and phenotypic identification were taken with the obtained samples.

RESULTS: There were included 145 immunocompromised patients; oral candidiasis was confirmed in 127 patients; 9 (6%) *C. dubliniensis* were isolated mainly in HIV/AIDS groups and with autoimmune diseases (44% each); 7 (78%) of these cases had oral candidiasis in a sequence of repetition, and the pseudomembranous form was prevalent. *C. albicans* was the most frequently isolated species of yeast: 78 (52%) cases; there were unique isolations (83%) and associated ones (17%); *C. dubliniensis* was detected in one case associated with *Candida glabrata* and *Candida krusei*. *C. dubliniensis* was isolated in 55% of the female population and the average age was 49.9 years old.

CONCLUSIONS: *C. dubliniensis* was isolated in 9 cases (6%), mainly with pseudomembranous form. It prevails in HIV/AIDS patients and with autoimmune diseases.

KEYWORDS: *Candida dubliniensis*, immunocompromised patients, oral candidiasis.

ANTECEDENTES

Candida dubliniensis es una levadura identificada como agente oportunista, implicada como causa de candidosis oral en pacientes VIH positivos y SIDA.¹ Esta especie adquirió jerarquía al descubrirse asociada en mucositis candidiásica grave de la cavidad oral y esofagitis; también en otras localizaciones, incluyendo candidemias y candidosis invasoras y por ser más resistente a los tratamientos con antifúngicos.

En 1995 fue descrita por primera vez como patógeno emergente por Sullivan y colaboradores, quienes la aislaron de la cavidad oral de pacientes infectados por el VIH en Dublín, Irlanda.¹

Sin embargo, la prevalencia de candidosis oral por levaduras del género *Candida*, y de la especie *C. dubliniensis* en particular, no es bien conocida, porque la misma pasa inadvertida en la mayoría de los casos por falta de la correcta identificación.²

En Argentina, al igual que en otros países, son muy pocos los casos comunicados de candidosis por *C. dubliniensis*.^{2,3-11}

El desconocimiento de la semejanza fenotípica con *C. albicans* y la falta de experiencia en procedimientos estandarizados para su aislamiento e identificación no han permitido obtener datos epidemiológicos fidedignos; tampoco establecer diagnósticos correctos de candidosis causados por *C. dubliniensis*.

El reconocimiento de esta especie redundará en beneficio de los pacientes, al indicarles el tratamiento adecuado una vez aislada e identificada correctamente.

El objetivo de este estudio es poner en marcha un algoritmo, en el laboratorio de Micología de la Cátedra de Clínica Dermatológica, que permita identificar fenotípicamente *C. dubliniensis*, en muestras clínicas obtenidas de candidosis oral en pacientes inmunodeprimidos, ambulatorios e internados de distintos servicios del Hospital

Nacional de Clínicas de Córdoba, Argentina. Además, determinar su frecuencia de distribución en la población en estudio, con candidosis oral de repetición y las formas de manifestación clínica.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio observacional, prospectivo y descriptivo en el que se reclutaron todos los pacientes consecutivos provenientes de distintos servicios del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba, Argentina, del 1 de julio de 2013 al 31 de octubre de 2014 (16 meses) que cumplían con los siguientes criterios de inclusión: Pacientes inmunodeprimidos confirmados por su enfermedad de base o por tratamientos inmunosupresores recibidos. Mayores de 18 años de edad, de uno y otro sexo, con manifestaciones clínicas de candidosis oral, sin tratamientos con antifúngicos al momento del estudio; ambulatorios o internados provenientes de distintos servicios de nuestro hospital, que aceptaron participar en el estudio y firmar el consentimiento informado.

Los pacientes se incluyeron en las siguientes categorías:

- Categoría A: pacientes con VIH/SIDA con recuento de linfocitos T CD4+ $\leq 200/\mu\text{L}$.
- Categoría B: pacientes oncológicos.
- Categoría C: pacientes con enfermedades autoinmunitarias.
- Categoría D: pacientes atendidos en unidades de cuidados intensivos: clínicos y quirúrgicos con requerimiento de cuidados críticos, provenientes de los servicios de Unidad de Terapia Intensiva (UTI), Unidad de Cuidados Coronarios (UCO) y Unidad de Cuidados Intermedios (UCI).
- Categoría E: pacientes inmunodeprimidos internados clínicos o quirúrgicos sin requerimiento de cuidados críticos.

Se agrupó a los pacientes según la clasificación clínica de candidosis oral, modificada por Holmtup y Axel:² a) pseudomembranosa aguda o crónica; b) eritematosa aguda o crónica; c) hiperplásica (leucoplasiforme); d) secundaria: lesiones asociadas; e) multifocal (más de un aspecto clínico).

Registro de pacientes

Se registraron los datos personales: edad, sexo, domicilio, servicio de procedencia; si era ambulatorio o internado, enfermedad y tratamiento actual en el momento del estudio; asimismo, se preguntó a los pacientes si habían tenido al menos tres episodios de candidosis oral tratados con antifúngicos, en un lapso no mayor de un año del episodio actual. Se registraron, además, las características clínicas, los antecedentes clínico-patológicos, los tratamientos recibidos y los parámetros bioquímicos.

Normas éticas

De acuerdo con las normativas vigentes en la provincia de Córdoba, este proyecto fue inscrito en el Registro Provincial de Investigaciones en Salud (RePIS; Ley 9694/09), cumpliendo con las exigencias y con la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Salud del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba.

Procesamiento de las muestras clínicas

Se extrajeron muestras de la mucosa oral, mediante hisopado, de todos los pacientes incluidos en este estudio previa higiene bucal. Se utilizaron dos hisopos que se colocaron en tubos con solución fisiológica estéril (SF) para su transporte al laboratorio.

Uno de los hisopos se utilizó para el examen microscópico al estado fresco (200x y 400x) y el segundo, para los cultivos en medios de Agar

glucosado de Sabouraud (Britania, Argentina) y lactrimel de Borelli, con el agregado de antibióticos antibacterianos (ampicilina y gentamicina); se incubaron a 28°C durante cinco días.

Identificación de las levaduras aisladas

Se realizó una suspensión de varias colonias levaduriformes en solución fisiológica, que se sembró en placas con agar cromogénico CHROMagar Candida® (CHROMagar Company, París, Francia). Se incubaron a 28°C durante 72 h. A partir de una única colonia aislada en agar cromogénico se realizó un repique en agar Sabouraud. De este subcultivo se realizaron las pruebas fenotípicas.

Para la identificación de *C. dubliniensis* a partir de colonias verdes en CHROMagar Candida® se prosiguió con la siguiente marcha: 1) capacidad de crecimiento a 42°C en agar glucosado de Sabouraud; 2) producción de tubos germinativos, pseudohifas y clamidoconidios en agar leche con Tween 80 sobre portaobjetos; 3) capacidad de crecimiento en agar hipersalado con NaCl a 11%; 4) producción de lipasas en medio de opacidad con Tween 80; 5) color y aspecto macroscópico de las colonias y capacidad de formación de clamidoconidios en agar tabaco; 6) características macro y micromorfológicas de las colonias en agar Pal-CHROM; 7) utilización de diversos sustratos mediante el uso de galerías API ID 32C® (Laboratorio BioMérieux SA, Marcy L'Étoile, Francia).^{2,3,11-24}

La identificación de colonias de levaduras de otros colores en el medio cromogénico se realizó por el aspecto micromorfológico en agar leche con Tween 80, capacidad de desarrollo a distintas temperaturas, producción de ureasa, pruebas de asimilación en galerías API ID 32C® y otras pruebas adicionales (trehalosa y prolina aminopeptidasa) mediante el uso de Diatabs™ Rosco (Rosco Diagnostica A/S, Dinamarca).^{2,3,11-24}

Análisis estadístico de los datos

Los datos se consignaron en una ficha diseñada para este fin y se analizaron mediante métodos categóricos presentados en forma de gráficos o tablas. Se estableció como nivel de significación estadística un valor de $p < 0.05$ para correlaciones de la prueba t en muestras relacionadas. La comparación entre las variables numéricas continuas y las proporciones a través de la prueba χ^2 o la prueba de Fisher. Para la carga de datos se recurrió a una planilla de Excel® y como herramienta estadística se utilizó el programa SPSS v11.0 Sp.

RESULTADOS

Se realizaron hisopados a 145 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. La confirmación microbiológica se obtuvo en 127 casos. Se encontró la asociación de más de una levadura en 22 pacientes (17%), por lo que el número total de levaduras aisladas fue de 150 (**Figura 1**).

El 55.1% (70/127 casos) de los enfermos fue del sexo femenino; fue similar en los aislamientos de *C. dubliniensis* (femenino: 7.1% vs masculino: 7%; $p = 0.978$; **Cuadro 1**). El intervalo de edad de los pacientes fue de 21 a 91 años, con mediana de 66 años y media de 62.2 ± 16.2 años. Prevalcieron los casos entre 60 y 79 años y en segundo término los que se encontraban en el grupo de 40 a 49 años (**Figura 2**). En el caso de los pacientes en los que se aisló *C. dubliniensis* el intervalo de edad fue de 21 a 73 años, con media de 49.9 ± 17.1 años y mediana de 49 años ($p = 0.0169$).

La frecuencia de los distintos aislamientos de levaduras se muestra en el **Cuadro 2** y la distribución de los aislamientos asociados en la **Figura 3**.

Identificación fenotípica de *C. dubliniensis*

Ninguno de los aislamientos creció a 42°C. Las características macro y micromorfológicas en los

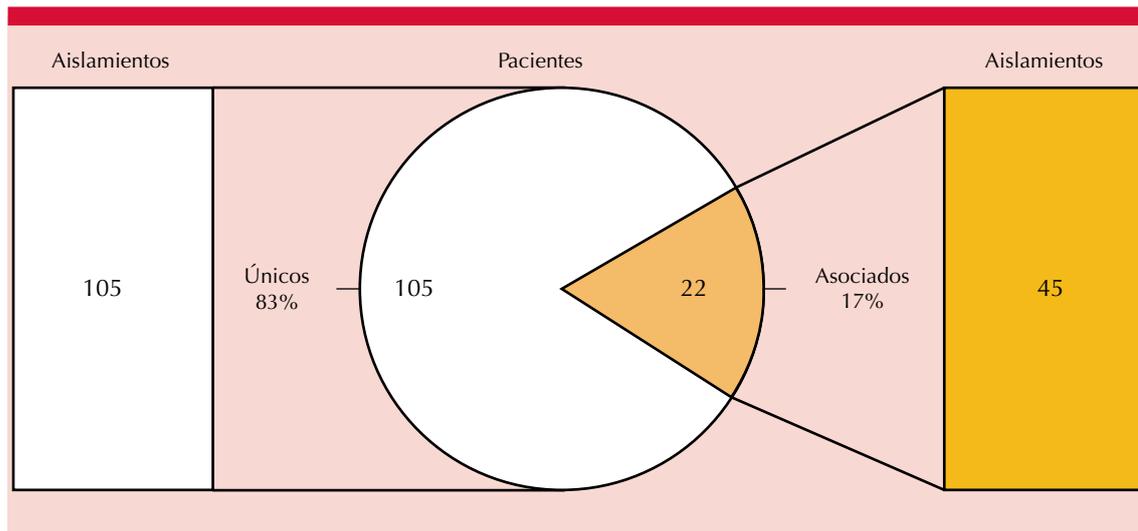


Figura 1. Distribución de la muestra según tipo de aislamiento. Los valores se expresan en frecuencias y porcentajes. n = 127.

Cuadro 1. Distribución por sexo de los 127 aislamientos de *C. dubliniensis* y otras especies de *Candida*

Especies aisladas	Sexo		Total, núm. (%)
	Masculino, núm. (%)	Femenino, núm. (%)	
<i>C. dubliniensis</i>	4 (7)	5 (7.1)	9 (7.1)
Otras	53 (93)	65 (92.9)	118 (92.9)
Total	57 (100)	70 (100)	127 (100)

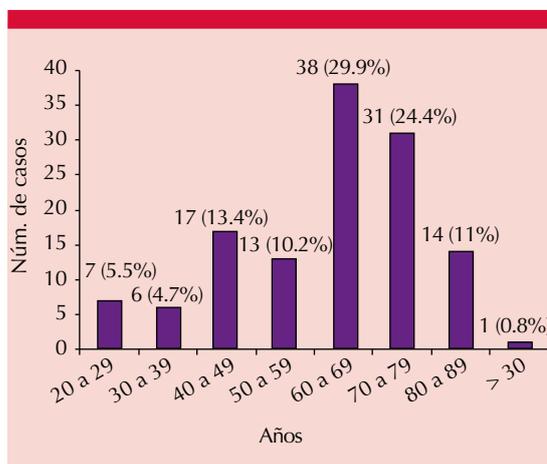


Figura 2. Distribución de los 127 pacientes según grupos etarios.

medios Pal-CHROM y agar tabaco fueron 100% específicas para la diferenciación con *C. albicans* (Figura 4). Respecto al agar opacidad, utilizado para evidenciar la existencia de fosfolipasas, 10% de cepas de *C. albicans* no formaron halo de opacidad. El uso de medio hipersalado con NaCl 11% inhibió el desarrollo de todos los aislamientos de *C. dubliniensis*, pero 5% de *C. albicans* mostró crecimiento débil.

Con respecto a la distribución de pacientes según las enfermedades, 23.6% de los mismos correspondió al grupo de inmunodeprimidos clínicos, quirúrgicos o ambos, sin requerimiento de cuidados críticos; 22.8% fueron pacientes oncológicos, los restantes se distribuyeron entre

Cuadro 2. Frecuencia de las especies de levaduras en los 150 aislamientos

Especies aisladas únicas/asociadas	Frecuencia (%)
<i>C. albicans</i>	78 (52)
<i>C. tropicalis</i>	20 (13.3)
<i>C. glabrata</i>	13 (8.7)
<i>C. parapsilosis</i>	10 (6.7)
<i>C. dubliniensis</i>	9 (6)
<i>C. krusei</i>	7 (4.7)
<i>C. guilliermondii</i>	3 (2)
<i>C. kefyri</i>	3 (2)
<i>C. intermedia</i>	2 (1.3)
<i>C. pararugosa</i>	1 (0.7)
<i>C. norvegensis</i>	1 (0.7)
<i>C. lusitanae</i>	1 (0.7)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 (0.7)
<i>Trichosporon</i> spp	1 (0.7)

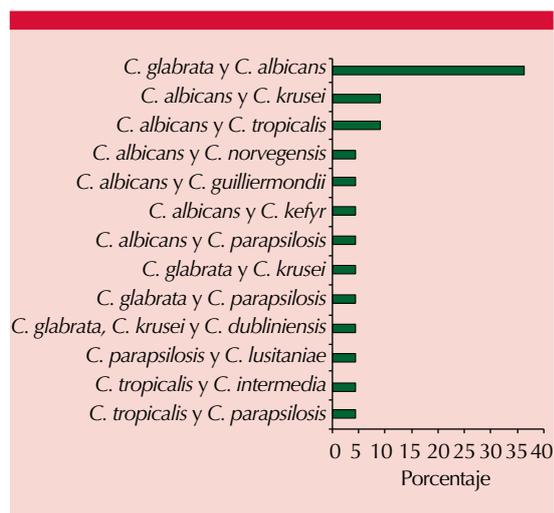


Figura 3. Distribución de aislamientos asociados de especies *Candida* en el total de casos analizados; n = 127.

VIH/SIDA (22.1%), autoinmunitarios (18.9%) y clínicos/quirúrgicos en cuidados críticos (12.6%). **Figura 5**

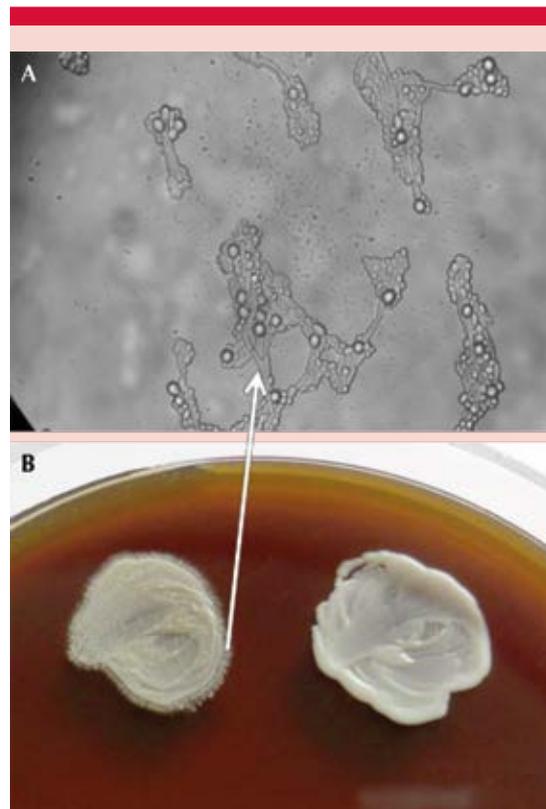


Figura 4. **A.** Clamidioconidos de *C. dubliniensis* (400x) en agar tabaco. **B.** Colonias de aspecto ocre y rugoso pertenecientes a *C. dubliniensis* (izquierda); las colonias de *C. albicans* se observan blancas, lisas y brillantes (derecha).

En el grupo de pacientes en los que se aisló *C. dubliniensis*, 44% (n = 4) correspondió a pacientes con VIH/SIDA e igual porcentaje correspondió a pacientes con enfermedades autoinmunitarias, el caso restante fue un enfermo oncológico. No hubo en este estrato pacientes inmunodeprimidos sin requerimiento de cuidados críticos, ni en unidades de cuidados intensivos. Se observó asociación estadísticamente significativa entre la enfermedad de base y la especie aislada ($p = 0.036$).

La distribución según la forma clínica de la candidosis oral se muestra en la **Figura 6**.

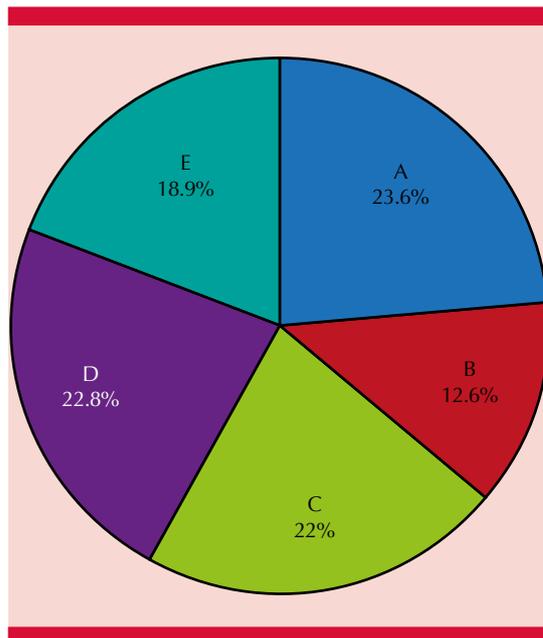


Figura 5. Distribución de la muestra según la enfermedad asociada (n = 127).

A. Inmunodeprimidos clínicos, quirúrgicos o ambos, sin requerimiento de cuidados críticos. **B.** Pacientes en unidades de cuidado intensivo: clínicos y quirúrgicos con requerimiento de cuidados críticos. **C.** Pacientes con VIH/SIDA. **D.** Pacientes oncológicos. **E.** Autoinmunitarios.

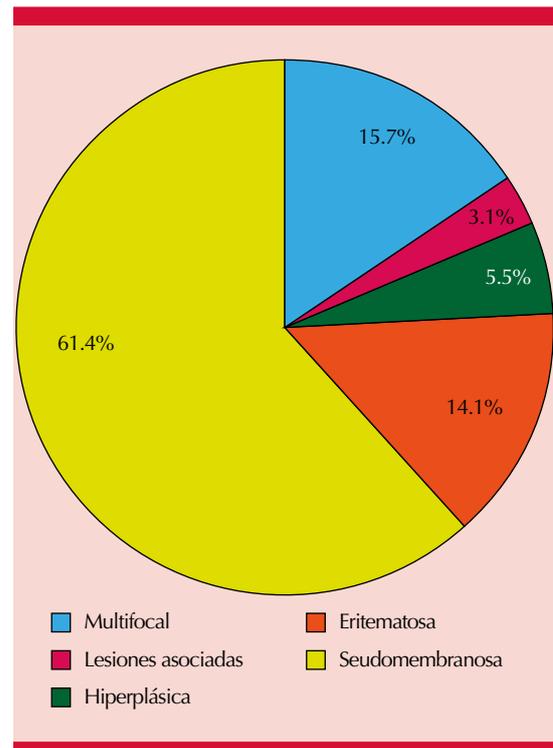


Figura 6. Distribución de los 127 casos según la manifestación clínica de la candidiasis oral.

El 56.6% de los pacientes con candidiasis tuvieron episodios de repetición dentro del año (**Figura 7**). Las recidivas fueron ligeramente más frecuentes en pacientes del sexo femenino, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.328$). Siete de los nueve casos (78%) en los que se aisló *C. dubliniensis* correspondieron a candidiasis de repetición.

El 33.3% de los pacientes con VIH/SIDA tuvieron candidiasis de repetición, seguido por 25% de los casos con enfermedades autoinmunitarias; los oncológicos e inmunodeprimidos que no requerían cuidados críticos representaron 14% cada grupo, pero la menor proporción correspondió a los pacientes en unidades de cuidados intensivos. En los pacientes onco-

lógicos la candidiasis de repetición fue más frecuente cuando la localización era la cabeza y el cuello (64.3%).

La edad media de los pacientes con candidiasis de repetición fue de 58.3 ± 16.9 años, en tanto que en los casos con un único episodio la edad media fue de 68.7 ± 13.6 años.

DISCUSIÓN

C. dubliniensis ha incrementado su participación como agente causal en diferentes procesos patológicos y afecta principalmente a personas con VIH/SIDA y candidiasis oral recurrente, aunque también afecta a pacientes con otras enfermedades de base, como diabetes y cáncer.²⁵⁻³⁰

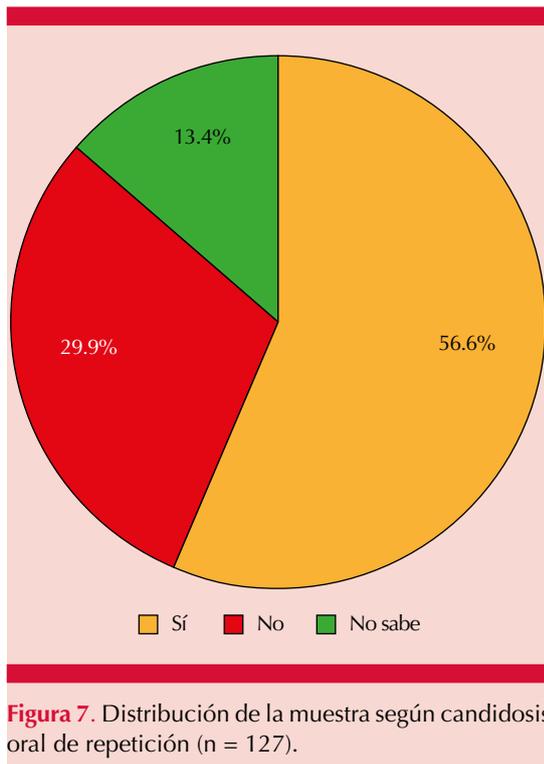


Figura 7. Distribución de la muestra según candidosis oral de repetición (n = 127).

En este estudio se encontró que la mayor proporción de aislamientos correspondió a pacientes VIH+ con recuentos de linfocitos CD4+ $\leq 200/\mu\text{L}$ y a pacientes con enfermedades autoinmunitarias (cuatro casos cada grupo) y solamente se encontró en un paciente leucémico.

Los métodos fenotípicos resultaron de gran utilidad en la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*; sin embargo, como ninguna de estas pruebas es 100% sensible o específica, es conveniente utilizar más de un método simultáneamente para evitar errores diagnósticos.

La incapacidad de *C. dubliniensis* para crecer a temperaturas elevadas (42 a 45°C) es una de las pruebas fenotípicas comúnmente utilizada para discriminar entre esta especie y *C. albicans*.³¹ Algunos autores encuentran que ciertos aislamientos de *C. albicans* (entre 1 y 23%) no son capaces de crecer a estas temperaturas,³²⁻³⁴

en tanto otros notificaron que *C. dubliniensis* es capaz de crecer a 42°C en 66% de los casos³⁵ y débilmente a 45°C en 10% de los casos.³⁶ En nuestro estudio ninguno de los aislamientos de *C. dubliniensis* fue capaz de crecer a 42°C.

Otro rasgo fenotípico que comparten *C. albicans* y *C. dubliniensis* es la producción de clamidocnidios. Algunos medios como agar Staib³⁷ y agar Pal^{25,38} estimulan la formación de clamidocnidios en *C. dubliniensis* con elevada eficiencia; por otra parte, el medio de agar-tabaco permite diferenciar *C. dubliniensis* y *C. albicans*, por sus características macro-micromorfológicas. En este medio *C. dubliniensis* es capaz de producir abundantes clamidocnidios, con colonias de aspecto ocre y rugoso, mientras que *C. albicans* crece como colonias blancas y lisas y no produce clamidosporas.²¹ La combinación del medio Pal con CHROMagar también ha demostrado gran utilidad en la diferenciación de ambas especies, con sensibilidad de 96.2%.^{18,23}

Otro aspecto fenotípico para analizar es la formación de halo alrededor del crecimiento de la colonia en el agar opacidad. *C. dubliniensis* crece sin la formación de halo, por ausencia de actividad lipolítica, a diferencia de *C. albicans* que por tener esterases, lo forma.²⁰ En este estudio algunas cepas de *C. albicans* no lo hicieron (aproximadamente 10%) a diferencia de lo publicado (13%),²² pero coincidimos con los resultados de Slifkin,²⁰ quien no registró actividad lipolítica en el 100% de las cepas de *C. dubliniensis* evaluadas.

Respecto al medio hipersalado con NaCl a 11%¹⁹ usado en este estudio, los resultados fueron los esperados, porque no se obtuvo crecimiento en ninguna de las nueve cepas identificadas como *C. dubliniensis* y, en el caso de *C. albicans*, sólo un muy pequeño número (5%) experimentó un débil crecimiento. Camacho y su grupo obtuvieron 21% de crecimientos escasos o negativos de

C. albicans, pero usaron una concentración de NaCl a 6.5% en el agar.²²

La mayor parte de las cepas de *C. dubliniensis* no asimilan metil- α -D-glucósido, lactato, trehalosa o xilosa, en cambio, *C. albicans* sí lo hace. Este método comercial (API ID 32C[®]) basado en 29 pruebas de asimilación, de alta especificidad, diagnóstica correctamente 96% de las cepas de *C. dubliniensis*.^{39,40}

C. albicans y *C. dubliniensis* no sólo comparten características fenotípicas, sino también la capacidad de colonizar e infectar la mucosa oral. *C. dubliniensis* es potencialmente muy virulenta por sus altas concentraciones de proteinasa y su gran capacidad de formar adherencias, tanto en células epiteliales de la mucosa oral como en prótesis orales.⁴¹

El mayor número de aislamientos correspondió a *C. albicans* (78 casos) seguida por *C. tropicalis* (20 casos), *C. glabrata* (13 casos) y *C. dubliniensis* (9 casos). Las demás especies se aislaron en menor proporción (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. pararugosa*, *C. lusitanae*, *C. intermedia*, *C. kefir* y dos levaduras no *Candida*: *Saccharomyces cerevisiae* de un paciente con linfoma y *Trichosporon* spp de una paciente diabética internada). Entre las especies aisladas un enfermo con mieloma múltiple padeció candidosis oral recurrente ocasionada por *C. pararugosa*; esta especie se halló previamente en la cavidad oral de una paciente italiana.⁴² En nuestro caso, la levadura se identificó por espectrometría de masa MALDI-TOF MS Bruker[®] Daltonics, Bremen, Alemania. Este método identifica las levaduras mediante la creación de un espectro basado en el perfil proteico huella química, que es único para una especie dada, muy útil para diferenciar complejos de especies de levaduras y todas las especies crípticas, géneros o ambos, que son imposibles de identificar por sus características fenotípicas (como sucedió en

nuestro caso con *C. pararugosa*). Es altamente sensible, específico y rápido en la obtención de resultados. Sus desventajas son: su costo, la base de datos debe estar actualizada, el operador requiere adiestramiento previo y es ideal para centros con grandes volúmenes de muestras a identificar. Mientras que las técnicas fenotípicas, con algunas limitaciones que se observan de manera más evidente para algún tipo de microorganismo, son fáciles de realizar y de bajo costo.⁴³

El 52% (n = 78) de los aislamientos correspondió a la especie *C. albicans*, que colonizó sola o asociada con otras especies.

En este estudio, 74 casos (83%) correspondieron a aislamientos únicos y 17% a asociaciones, que son habituales en la localización estudiada. La asociación más frecuente correspondió a *C. albicans*-*C. glabrata* con 36.4%; seguida por *C. albicans*-*C. tropicalis* y *C. albicans*-*C. krusei* acorde con lo hallado por otros autores.² Hubo un único aislamiento triple de *C. dubliniensis* y dos especies más: *C. krusei* y *C. glabrata* en un paciente con VIH/SIDA con LT CD4+ < 200/ μ L.

De acuerdo con la clasificación de formas clínicas de la candidosis oral de Hoslmüt y Axel modificada,² la más frecuente fue la seudomembranosa (61.4%), seguida de la multifocal y eritematosa con porcentajes bastante inferiores (15.7 y 14.2%, respectivamente). La seudomembranosa, si bien es la de manifestación más frecuente, se ve fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos, quienes fueron elegidos para este estudio. Esta forma clínica tuvo el mayor número de aislamientos de *C. dubliniensis* con 4 casos (45%), seguida con 3 casos (33%) de multifocal y 2 (22%) de la forma eritematosa. No hubo recuperación de esta levadura en las otras manifestaciones clínicas.

Se aisló *C. dubliniensis* en 44% de los pacientes con VIH/SIDA e igual porcentaje correspondió a

pacientes con enfermedades autoinmunitarias. En este estrato no hubo pacientes en unidades de cuidados intensivos ni inmunodeprimidos. Esto implica que hay relación entre la especie *C. dubliniensis* aislada y la enfermedad asociada.^{26,27,30}

Las variables demográficas no ofrecieron información relevante: el sexo femenino (55.1%) predominó ligeramente respecto al masculino (49.1%) y el grupo etario más afectado fue el de 60 a 79 años, con edad promedio de 62.2 años.

La distribución de *C. dubliniensis*, según el sexo en la muestra (n = 127), también fue similar (femenino 7.1% vs masculino 7%); en cambio, la media de edad en estos casos fue de 49.8 años. Esta mayor amplitud de intervalo correspondiente a la media del grupo se debe, en parte, a los pocos casos clínicos; también puede estar influenciado por el grupo de pacientes con predominio de aislamientos de *C. dubliniensis*: VIH/SIDA y enfermedades autoinmunitarias; habitualmente adultos jóvenes.

Respecto a las recidivas, en este trabajo definidas como más de tres episodios de candidosis oral tratados con antifúngicos, en un lapso no mayor de un año del episodio actual, se halló que 56.6% del total de pacientes (n = 127) padecieron candidosis oral recidivante; 30% no la padeció y en un pequeño grupo (13.4%) se ignoraba este dato. El promedio de edad en el grupo de pacientes con candidosis de repetición fue de 58.3 años vs 68.7 años en el grupo con un único episodio. Siete de los nueve casos ocasionados por *C. dubliniensis* correspondieron a pacientes con episodios múltiples, en especial en individuos VIH positivos o con enfermedades autoinmunitarias.

Entre los pacientes oncológicos, la mitad fueron candidosis de repetición y se produjeron especialmente cuando la localización del tumor era de cabeza y cuello (64.3%).

CONCLUSIONES

En 127 casos de candidosis orales en pacientes inmunodeprimidos, 9 fueron ocasionadas por *C. dubliniensis* (7.1%).

Con la marcha fenotípica, propuesta en este trabajo, se identificaron 150 aislamientos en los 127 casos, 6% correspondió a *C. dubliniensis* y 52% a *C. albicans*; las restantes se identificaron como otras especies *Candida* y levaduras no *Candida*. La especie más aislada fue *C. albicans* seguida por *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Las asociaciones son habituales en la localización estudiada. La más frecuente correspondió a *C. albicans*-*C. glabrata*, seguida por *C. albicans*-*C. tropicalis* y *C. albicans*-*C. krusei*.

C. dubliniensis es un microorganismo que se aisló frecuentemente de cultivos mixtos y en este trabajo hubo un único aislamiento triple conjuntamente con las especies *C. krusei* y *C. glabrata*.

Para diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*, debido a que comparten características fenotípicas, se recomienda el algoritmo propuesto para aislarlas e identificarlas correctamente; utilizar al menos cuatro pruebas de la marcha fenotípica propuesta. En el caso de aislamientos atípicos de esta especie, que en este estudio no se obtuvieron, es conveniente recurrir a técnicas de biología molecular o de proteómica para la identificación correcta.

El 78% de las cepas de *C. dubliniensis* se aislaron de pacientes con candidosis oral de repetición, pertenecientes principalmente a los grupos de pacientes con VIH/SIDA y con enfermedades autoinmunitarias. Esto último constituye un hallazgo de importancia y de gran efecto epidemiológico para nuestro hospital.

En los pacientes las formas clínicas más frecuentes fueron la seudomembranosa, seguida por la

multifocal y la eritematosa. Las cepas de *C. dubliniensis* aisladas estuvieron vinculadas en cuatro casos con la forma pseudomembranosa, en tres con las multifocales y en dos con la eritematosa.

Agradecimientos

A mi director de tesis de maestría, Prof. Dr. Ricardo Negroni. A mi codirectora de tesis de maestría, Prof. Dra. Alicia Arechavala.

REFERENCIAS

- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995;141:1507-1521.
- Coronado-Castellote L, Jiménez Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. Review. *Journal section: Oral Med Pathol J Clin Exp Dent* 2013;5:279-86.
- Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, Sordelli N, Malzone MC y col. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:505-509.
- Ceballos-Salobreña A, Gaitán-Cepeda L A, Ruesga MT, Ceballos-García L, Quindós G. Prevalencia de lesiones orales por *Candida* en una población con sida sometida a terapia antirretroviral altamente activa. *Rev Iberoam Micol* 1998;15:41-145.
- Schorling SR, Kortinga HC, Frosch M, Mühlshlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-infected individuals. *Crit Rev Microbiol* 2000;26:59-68.
- Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J Clin Microbiol* 2003;41:1838-1842.
- Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaró HM. High prevalence of oral colonization by *C. dubliniensis* in HIV+ patients. *Med Micol* 2005;43:431-437.
- González-Abad MJ, Sánchez-Bayle M, Hernández B, Cano J. Prevalencia de *Candida dubliniensis* en un hospital terciario de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:156-161.
- Hartung de Capriles C, Mata-Essayag S, Pérez C, Colella MT, Roselló A y col. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycopathologia* 2005;160:227-34.
- Patel PK, Erlandsen J E, Kirkpatrick WR, Berg DK, Westbrook SD, et al. The changing epidemiology of oropharyngeal candidiasis in patients with HIV/AIDS in the era of antiretroviral therapy. *AIDS Res Treat* 2012;2012:262471.
- Higuerey-Centeno FE, Ortiz-Bravo FM. Diferenciación fenotípica y molecular de *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes con candidosis en diferentes centros de salud de Cumaná, estado de Sucre (Tesis). Cumaná (Venezuela): Universidad de Oriente núcleo de Sucre Escuela de Ciencias Departamento de Bioanálisis, Venezuela, 2011.
- Bacaicoa, OA. Caracterización de aislamientos atípicos de *Candida dubliniensis* (Tesis doctoral). Leioa, España: Univ del País Vasco Facultad de Medicina y Odontología Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, 2012.
- Khelif M, Sellami A, Sellami H, Makni F, Ayadi A. *Candida dubliniensis*: Identification methods and epidemiologic implication. *Pathol Biol (Paris)* 2011;59:166-72.
- Guillarte C, Pardi G. Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana* 2009;47:1-7.
- Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. *Rev Arg de Microbiol* 2008;40:211-217.
- Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN y col. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Diseases* 2014;20:329-344.
- Koneman EW, Roberts GD. *Micología: práctica de laboratorio*. 3ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1987.
- Sahand IH, Moragues MD, Eraso E, et al. Supplementation of CHROM agar *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2005;43:5768-70.
- Gianecini RA, Romero MM, Santiso G, Arechavala A. Utilización de un medio hipersalado en la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz CABA Argentina. Trabajo en cartel Nro 0062, VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología clínicas. Palais Rouge, Buenos Aires, Argentina; 26-29 de junio, 2012.
- Slifkin, M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2000;38:4626-8.
- Khan ZU, Ahmad S, Mo Kaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4796-4798.
- Camacho LD, Mata ES, Pardi G y col. Evaluación de métodos fenotípicos para la diferenciación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*. *Kasmera* 2012;40:47-58.
- Al MA, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J Clin Microbiol* 2003;41:4787-4789.
- Gadea I, Cuenca-Estrella M. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos; MICOMED, GESITRA, SEIMC. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:32-9.

25. Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, et al. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus infected patients in Israel. *J Clin Microbiol* 2000;38:170-174.
26. Margaix-Muñoz M, Bagán JV, Poveda R, Jiménez Y, Sarrión G. Sjögren syndrome of the oral cavity. Review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14:E325-E330.
27. Ángel N, Echeverry N, Restrepo P y col. Manifestaciones bucales en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Rev Colomb Reumatol* 2010;17:13-21.
28. Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, et al. High prevalence of non-*albicans* yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Med* 2003;17:477-481.
29. Sanchez VI, Ortiz LN, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, et al. Prevalence microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolated colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol* 2005;22:83-92.
30. Ergun S, Cekici A, Topcuoglu N, Migliari DA, Külekçi G, et al. Oral status and *Candida* colonization in patients with Sjögren's syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15:310-5.
31. Coleman D, Sullivan D, Harrington B, et al. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. *Oral Dis* 1997;3:96-101.
32. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, et al. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2093-2095.
33. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC systems. *J Clin Microbiol* 1999;37:3804-3808.
34. Kurzai O, Korting HC, Harmsen D, et al. Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. *J Mol Med (Berl)* 2000;78:521-529.
35. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, et al. Use of specialized isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:296-300.
36. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;36:329-334.
37. Staib P, Morschhauser J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*-an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 2007;50:1-12.
38. Ahmad S, Khan Z, Mokaddas E, Khan ZU. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. *J Med Microbiol* 2004;53:633-637.
39. Cardenas-Perera CD, Torres-Lana A, Alonso-Vargas R, et al. Evaluation of API ID 32C and VITEK-2 to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50:219-221.
40. Pasligh J, Radecke C, Fleishhacker M, Ruhnke M. Comparison of phenotypic methods for the identification of *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43:147-154.
41. McCullough M, Ross B, Reade PC. Oral *Candida albicans* from patients infected with the human immunodeficiency virus and characterization of a genetically distinct subgroup of *Candida albicans*. *Aust Dent J* 1995;40:91-7.
42. Giammanco GM, Melilli D, Pizzo G. *Candida pararugosa* isolation from the oral cavity of an Italian denture wearer. *Res Microbiol* 2004;155:571-4.
43. Relloso MS, Nievas J, Fares Taie S, Farfuharson V, Mujica MT y col. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Rev Argent Microbiol* 2015;47(2):103-107.