



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Medicina

Maestría en Micología Médica

Título de la Tesis

**Identificación fenotípica de *Candida dubliniensis*,
aisladas de candidiasis de mucosa oral
en pacientes inmunocomprometidos
en el Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba**

Maestrando

GRACIELA MARIEL CARBALLO

Director

Prof. Dr. Ricardo Negroni

Codirectora

Prof. Dra. Alicia Arechavala

Año

2015

DEDICATORIAS

- *A mis padres ejemplo de mi vida...*
- *A mis hijos Fede, Lore y Lourdes frutos de mi vida...*
- *A mi esposo compañero de ruta en la vida...*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a los integrantes de la comisión de tesis, con especial mención a mi maestro y director Prof. Dr. Ricardo Negroni, quien me enseñó, desde mi juventud, con mucha pasión y dedicación, Micología Clínica y me motivó a realizar este trabajo, con el espíritu docente que en él nunca cesa.

Un especial agradecimiento a la Prof. Dra. Alicia Arechavala, codirectora de esta tesis, quién me estimuló, enseñó y apoyó a lo largo de estos años de Maestría y desarrollo de este trabajo final.

Al Prof.Dr. Alberto Leoni, titular Cátedra de Infectología II y jefe del Servicio de Infectología, al Prof. Adjunto Sr. Méd. Guillermo Fernández subjefe del Servicio, y a la Prof. Asistente Sra. Méd. Ximena Álvarez; Hospital Nacional de Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, quienes generosamente enviaron sus pacientes para que participen de este estudio.

Al Prof. Dr. Carlos Consigli, quién permitió, con su apoyo, el desarrollo de este trabajo de tesis en el Departamento Laboratorio de la Cátedra de Clínica Dermatológica de la del Hospital Nacional de Clínicas del Hospital Nacional de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba; y a las Médicas dermatólogas Elena Procikievick y Margarita Colotti del Servicio de Dermatología, quienes colaboraron con sus pacientes para este estudio.

A mi querida compañera de laboratorio quien me acompañó, escuchó y ayudó a lo largo de estos 16 meses de intenso trabajo, Bioq. Elvira Viera Mauro.

A mi colaborador permanente y generoso Emanuel Marin ,bioquímico de planta, y Gustavo Amaya ,preparador técnico, quién me asistió, no solo brindándome medios que hicieron falta para este estudio, sino también aportando su experiencia para prepararlos, ambos de la Unidad de Micología del Hospital Francisco Javier Muñiz, CABA.

Al Servicio de Terapia Intensiva del Hospital Nacional de Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, en las personas de las médicas residentes, Paola Mañez y Angelina Flores mi agradecimiento.

A todos aquellos que silenciosa y generosamente facilitaron mi acceso a los servicios y brindaron asesoramiento e información de los pacientes, allí internados; donando su tiempo para ayudarme a interpretar las historias clínicas y en la consecución de las firmas de los consentimientos informados.

Finalmente, a los pacientes destinatarios de este esfuerzo. A todos ellos mi reconocimiento.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
JUSTIFICACIÓN	40
HIPÓTESIS	41
OBJETIVO PRINCIPAL	42
OBJETIVOS SECUNDARIOS	42
MATERIAL Y MÉTODOS	43
RESULTADOS	53
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	79

ANEXOS

Anexo I: Hoja de captura de datos	86
Anexo II: consentimiento Informado	87
Anexo III: Planilla de identificación de levaduras	90
Anexo IV: Algoritmo para aislar e identificar levaduras	91
Anexo V: Materiales	92

Anexo VI

Imágenes complementarias de laboratorio 94

Imágenes clínicas complementarias 99

Anexo VII

Abreviaturas de genes 103

RESUMEN

Candida dubliniensis es una levadura de distribución geográfica universal, identificada como agente oportunista, implicada como causa de candidiasis oral en pacientes VIH/sida. Esta especie adquirió jerarquía al descubrirse su asociación con mucositis candidiásica grave de la cavidad oral, esofagitis y otras localizaciones; incluyendo candidemias y candidiasis invasoras y así como por ser más resistente a los tratamientos con antifúngicos (ATF). Sin embargo, la prevalencia de candidiasis oral por levaduras del género *Candida* y de la especie *C. dubliniensis* en particular, no es bien conocida, ya que la misma pasa desapercibida en la mayoría de los casos por falta de una correcta identificación. Recién en 1995 fue descrita por primera vez como patógeno emergente. El nombre de esta especie fue propuesto por Sullivan y col, quienes en 1995 la aislaron de la cavidad oral de pacientes infectados por el VIH en Dublín, Irlanda. Fue allí que se observó que en ciertos aislamientos, tipificados en principio como *C. albicans*, producían tubos germinales y clamidoconidios, pero no hibridaban de manera eficiente con la sonda de ADN 27 A específica para *C. albicans*. Esto reveló, que siendo especies diferentes, *C. dubliniensis* y *C. albicans* comparten características fenotípicas, lo que dificulta su diferenciación. Si se tiene en cuenta esta relación tan cercana entre ambas levaduras, la diferenciación de estas especies basada sólo en sus características fenotípicas puede ser complicada.

Para resolver este problema, se han desarrollado actualmente, diversas técnicas basadas sólo en los aspectos fenotípicos de las levaduras, que conforman una marcha diagnóstica de fácil aplicación en el laboratorio de diagnóstico clínico micológico.

Con el objetivo de aislar e identificar fenotípicamente *Candida dubliniensis*, como agente causal de candidiasis orofaríngea en pacientes inmunocomprometidos, en el Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba (HNCCba), se realizó esta investigación

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, en 145 pacientes provenientes de cinco servicios del HNCba, durante el período comprendido entre el 1º de julio de 2013 y el 31 de octubre de 2014, para investigar *C. dubliniensis* como agente causal de candidiasis oral, en los mismos. Con los siguientes criterios de inclusión: ≥ 18 años de edad, de ambos sexos, con manifestaciones clínicas de candidiasis oral, sin tratamiento con drogas ATF en el momento del estudio, ambulatorios e internados provenientes de los servicios de Infectología, Dermatología y Reumatología, Oncología, UTI-UCO e internados sin cuidados especiales, en distintas salas del HNCba, aceptar participar del estudio y firmar el consentimiento informado.

Las muestras se obtuvieron mediante hisopado bucal; se realizaron examen microscópico directo en fresco y cultivos en ASG y lactrimel. Con las muestras positivas se realizó siembra en medio cromogénico (CHROMagar Candida®). A partir de las colonias que produjeron color verde en este medio cromogénico se realizaron una serie de pruebas fenotípicas para identificar *C. dubliniensis* y diferenciarla de *C. albicans*, según el algoritmo propuesto en este estudio. 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 una $p < 0,05$ para correlaciones del test T para muestras relacionadas.

RESULTADOS

De 127 pacientes con candidiasis oral, confirmados clínica y micológicamente, se aislaron 9 (6%) cepas de *Candida dubliniensis*; con predominio en los grupos de pacientes VIH/sida y con enfermedades autoinmunes (44% respectivamente), con candidiasis oral a repetición (78%) y forma clínica pseudomembranosa principalmente (45%). La levadura más aislada en este estudio fue *Candida albicans* 78 (52%) seguida por *C. tropicalis* 20 (13,3%) y *C. glabrata* 13 (8,7%). Hubo aislamientos únicos (83%) y asociados (17%). Es de destacar un único triple aislamiento asociado

de *Candida dubliniensis*, con *C. glabrata* y *C. krusei*. Con respecto a los aislamientos de *C. dubliniensis* según sexo, el 55% correspondió al sexo femenino y el promedio de edad fue menor en este grupo de pacientes, respecto de los que tuvieron otros aislamientos (49,88 vs. 63,22 años).

La identificación de la levadura *C. dubliniensis* se realizó con el algoritmo propuesto en este trabajo, a partir del desarrollo de colonias verdes en CHOMagar Candida®.

CONCLUSIONES

- Con la marcha fenotípica propuesta en este trabajo, en 127 pacientes con candidiasis oral confirmada clínica y microbiológicamente, se obtuvieron 150 aislamientos entre los cuales hubo 9 (6%) especies de *C. dubliniensis*. También se identificaron 78 (52%) cepas de *C. albicans*, 61 (41%) como otras especies *Candida* y 2 (1%) como levaduras no *Candida*. Del total de aislamientos el 17% fueron asociados, lo cual es frecuente en la mucosa oral; la asociación más frecuente correspondió a *C. albicans*-*C. glabrata*.
- *C. dubliniensis*, se aísla frecuentemente de cultivos mixtos y en este trabajo se la aisló conjuntamente con las especies *C. krusei* y *C. glabrata*.
- *C. dubliniensis* fue aislada principalmente en los grupos de pacientes VIH/sida y con enfermedades autoinmunes, lo cual constituye un hallazgo de importancia dentro de la población en estudio, por el alto impacto epidemiológico en nuestro hospital.
- La mayoría de los aislamientos de *C. dubliniensis* correspondió a pacientes con candidiasis oral a repetición y los que presentaban la forma clínica pseudomembranosa; la edad promedio fue significativamente menor con respecto a los otros aislamientos, seguramente porque los pacientes más afectados fueron los que presentaron VIH/sida y enfermedades autoinmunes, en su mayoría jóvenes y adultos jóvenes.

- **Recomendamos** para diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*, con quien comparte numerosas características fenotípicas, el algoritmo aquí propuesto, utilizando al menos cuatro de las pruebas de la marcha fenotípica, para aislar e identificar correctamente *C. dubliniensis*, en el laboratorio de Micología Clínica.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Candida dubliniensis es una levadura identificada como agente oportunista, implicada como causa de candidiasis oral en pacientes VIH+ y sida^{a.1} Esta especie adquirió jerarquía al descubrirse asociada en mucositis candidiásica grave de la cavidad oral, esofagitis y otras localizaciones; incluyendo candidemias y candidiasis invasoras y por ser más resistente a los tratamientos con antifúngicos (ATF). Sin embargo, la prevalencia de candidiasis oral por levaduras del género *Candida* y de la especie *C. dubliniensis* en particular, no es bien conocida, ya que la misma pasa desapercibida en la mayoría de los casos por falta de una correcta identificación.²

Recién en 1995 fue descrita por primera vez como patógeno emergente por Sullivan y col.¹ Sin embargo, el aislamiento más antiguo de *C. dubliniensis* proviene de una pieza de pulmón de un paciente fallecido en 1957 en el Reino Unido, si bien no se confirmó como agente causal. El nombre de esta especie fue propuesto por estos autores puesto que este microorganismo fue inicialmente aislado de la cavidad oral de pacientes infectados por el VIH en Dublín, Irlanda. Fue allí, mientras se realizaba una investigación epidemiológica de la candidiasis oral en personas con VIH y enfermos de sida, donde se observó que ciertos aislamientos identificados en principio como *Candida albicans*, producían tubos germinales y clamidoconidios pero no hibridaban de manera eficiente con la sonda de ADN 27A específica para *C. albicans*.¹⁻⁴

SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL

Los hongos del género *Candida* fueron descritos por primera vez en 1923, por Christine Marie Berkhout. Comprenden más de 200 especies de levaduras que se

^a Según el Diccionario panhispánico de dudas de la RAE, el acrónimo «sida» va con minúsculas porque se ha incorporado al léxico común. El uso de minúsculas es recomendado también por la Organización Panamericana de la Salud.

diferencian por su capacidad de asimilar distintos compuestos, por la composición de los polisacáridos de la pared celular y por la capacidad de presentar diferentes morfologías. Solamente un pequeño número de estas especies son patógenas para los humanos, de hecho el 65% de ellas son incapaces de crecer a 37 °C; primer requisito necesario para el éxito de cualquier organismo patógeno.⁵⁻⁷

Los criterios para ubicar taxonómicamente las levaduras son dinámicos; con el desarrollo de estudios multigenéticos, aún los nombres de género y especie conocidos pueden cambiar.

El concepto *phylogenetic species recognition*, reconocimiento filogenético de especies (PSR), basado en la secuenciación de varios genes y posterior análisis de resultados mediante métodos filogenéticos, ha demostrado ser de gran utilidad a la hora de definir nuevas especies y delimitar especies integrantes de algunos géneros complejos. Los estudios multigenéticos han permitido demostrar que muchas especies tradicionalmente consideradas morfoespecies, constituyen en realidad complejos de especies, como el de *Candida parapsilosis* (*Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*) y *Candida glabrata* (*Candida nivariensis* y *Candida bracariensis*).

Las características macro-micromorfológicas, el tipo de fructificación, las propiedades enzimáticas y fisiológicas de las diferentes especies fúngicas, reciben el nombre de caracteres fenotípicos; fueron los únicos caracteres utilizados durante muchas décadas (aún siguen siendo muy empleados en el diagnóstico rutinario), para la ubicación taxonómica de género y especie.

En las últimas dos décadas ha tenido un importante desarrollo la aplicación de métodos de biología molecular a la taxonomía fúngica. Sin embargo, estos procedimientos son más costosos y requieren laboratorios de mayor complejidad.⁷

CLASIFICACIÓN

Actualmente, y desde la biología, es muy difícil dar un esquema taxonómico simple y funcional. Desde los años 80 del siglo XX, la taxonomía tanto de Procariotas como

Eucariotas, se ha dedicado principalmente a entender las relaciones de los organismos vivos en términos evolutivos, analizando datos moleculares tales como, la comparación de las pequeñas y las largas subunidades ribosomales ARNs y varios genes específicos. Estos estudios tienden a definir tres grandes líneas primarias de descendencia que son los dominios *Eucaryota*, *Eubacteria* y *Archeabateria*. A la línea *Eucaryota* (*Eucaria*) pertenecen los hongos.⁸

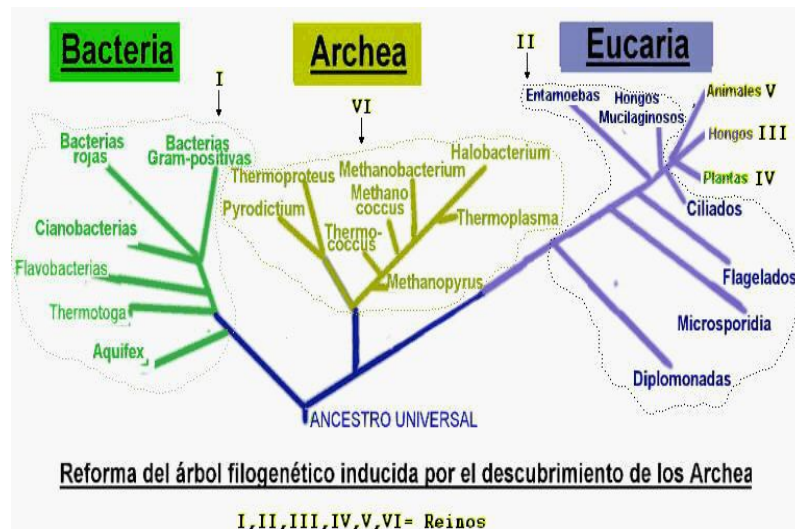


Figura 1: árbol filogenético, citado por: Woese y col.⁸

En los últimos años, gracias al avance de la filogenética molecular, los métodos analíticos y el volumen de datos disponibles de una gran diversidad de organismos, ha habido un extraordinario mejoramiento en la comprensión de las relaciones evolutivas de los niveles más profundos, que ha conducido a la ubicación de los Eucariotas en seis grupos mayores. Esto modificó el antiguo esquema propuesto de Whittaker⁹, que permaneció durante 25 años y proponía la existencia de cinco reinos; las evidencias moleculares de algunos de estos reinos no reflejaban adecuadamente en dicho esquema, sus historias evolutivas y relaciones filogenéticas.

Los altos niveles de los clados^b de los eucariontes son particularmente difíciles de acomodar según los códigos de nomenclatura existentes. Los modernos estudios filogenéticos requieren la creación de numerosos rangos bajo los niveles de los reinos

^bClado: grupo monofilético de organismos

o masivos cambios en órdenes y familias. Los nombres más actuales bajo el concepto de *Eucaryota* son: *Amoebozoa*, *Rhizaria*, *Excavata*, *Opisthokonta*, *Plantae sensu lato* y *Chromalveolata*.

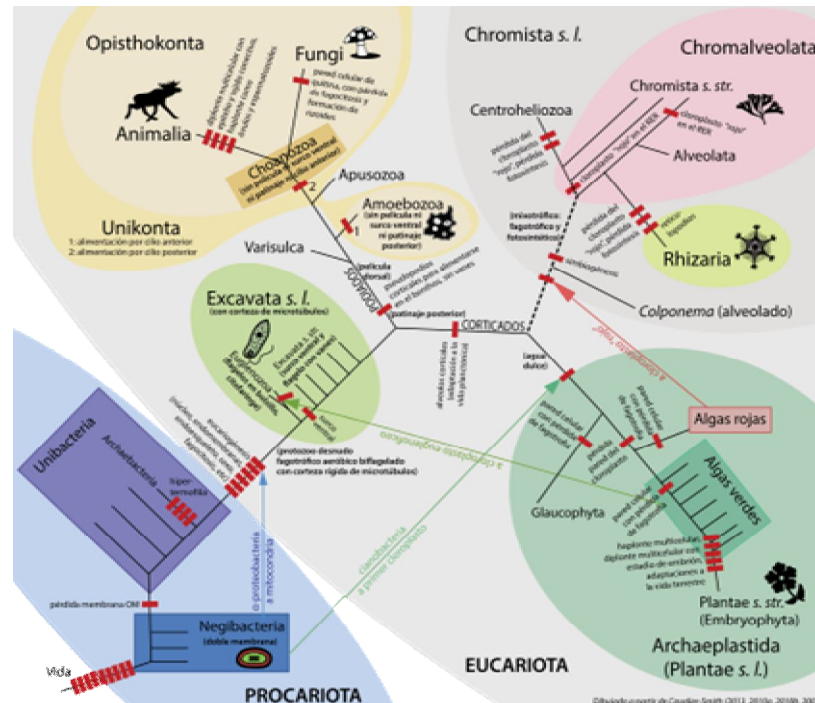


Figura 2: árbol filogenético citado por Cavalier-Smith T¹⁰, una de las últimas hipótesis de árbol filogenético de la vida, mostrando los supergrupos de Eucariotas (*Excavata sensu lato*, *Unikonta*, a veces dividido en *Opisthokonta* y *Amoebozoa*, *Chromalveolata*, *Rhizaria* y *Archaeplastida* o *Plantae sensu lato*).

Los grupos mayores *Amebozoa*, *Rhizariay* *Excavata* incluyen principalmente los organismos tradicionalmente conocidos como protozoos. En *Amebozoa* se ubican los hongos mucosos, *Myxomycetes*. En el grupo *Plantae* o *Archaeplatida* están las plantas, las algas verdes, las rojas y los *Glaucophytes*.

Chromalveolata incluye varios clados de organismos protozoos. En este grupo mayor se encuentra el Reino *Chromista* (*Stramenopila*) dentro del cual, en la clase *Oomycota* se agrupan organismos que por su estructura similar a la de los hongos siguen siendo estudiados por los micólogos, por ejemplo *Phytium insidiosum*. El grupo *Opisthokonta* contiene los animales, los hongos y algunos grupos antes incluidos en los protozoos.¹⁰⁻¹³

En la actualidad el reino *Fungi* (reino de los hongos) se divide en dos subreinos: *Dikarya* que agrupa las divisiones *Ascomycota* y *Basidiomycota* y el llamado “hongos basales” que agrupa el resto de los hongos. Refiriéndonos únicamente a los patógenos, dentro del segundo subreino se ubican aquellas especies que antes pertenecían a la división *Zygomycota* (zigomicetes) y que se ha demostrado constituye un grupo polifilético^c, por lo que dicha categoría ha sido eliminada en las nuevas clasificaciones. Fue propuesto redistribuir los taxones antes incluidos en *Zygomycota*, entre el *Phylum Glomerulomycota* y 4 *SubPhylum* “*incertain sedis*”^d.¹⁴

A continuación se describirán sólo las características más importantes de la división *Ascomycota* que incluye al hongo que es objeto de esta investigación.

Ascomycota y sus anamorfos (incluye los anteriormente llamados *Deuteromycetes*), son hongos con paredes que contienen quitina, glucanos y mananos en el caso de las levaduras.

El *thallo* vegetativo puede ser unicelular brotante (levaduriforme) o multinucleado en los mohos (micelio filamentoso, ramificado y septado, con poros simples, cribados, a nivel de los septo's).

La reproducción sexual por fusión de hifas modificadas, lleva al desarrollo de ascos (cilíndricos, fusiformes, clavados o globosos, persistentes o evanescentes), con ascosporas en número limitado de 2ⁿ. Los ascos pueden encontrarse sueltos en el sustrato o agrupados en un fruto llamado ascoma o ascocarpo. La fructificación asexual consiste en la formación de conidios.

A la división *Ascomycota* pertenecen la mayoría de los hongos patógenos, tanto los levaduriformes como los filamentosos. Entre los primeros es de destacar en los últimos años, el incremento llamativo de las infecciones por *C. albicans* y un aumento signifi-

^c polifilético: filogenéticamente refiere aquel grupo que no incluye al antepasado común más reciente de todos sus miembros.

^d *Incertae sedis*: señala la incapacidad para ubicar exactamente un taxón dentro de la clasificación

cativo de infecciones por otra especie, fenotípicamente similar y genéticamente distinta, como *C. dubliniensis* especie muy próxima a *C. albicans*.

La clasificación actual que involucra al género *Candida*,^{14,15} se describe en la tabla 1:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Candida dubliniensis*

Reino	<i>Fungi</i>
Subreino	<i>Dikarya</i>
División	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión	<i>Saccharomycotina</i>
Clase	<i>Saccharomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>C. dubliniensis</i>

“Profundizar en el conocimiento de la biología y taxonomía de los hongos contribuirá, sin duda, en una mejor elección del tratamiento de las infecciones causadas por los mismos”.¹⁴

EPIDEMIOLOGÍA

Con respecto a la epidemiología de *C. dubliniensis*, se comprobó su distribución geográfica universal. Desde el primer caso descubierto en la ciudad de Dublín, se ha aislado e identificado en muchas regiones del mundo: Marruecos, Sudáfrica, Argentina, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, EE. UU., Venezuela, China, India, Japón, Malasia, Bélgica, Inglaterra, Francia, Alemania, Islandia, Italia, Eslovaquia, España, Irán, Israel, Kuwait, Arabia Saudita, Túnez, Turquía, entre otras.^{2,16-18}

MORFOLOGÍA

Las levaduras del género *Candida* son microorganismos unicelulares, de forma esférica u ovoide de 3 a 7 μm de diámetro, que se multiplican por gemación. Su crecimiento se ve favorecido en condiciones de aerobiosis, temperaturas en el rango de 28-35°C y pH de 2,5 a 7,5.^{1,2,7}

Las colonias de *C. dubliniensis* son de color blanco a crema, redondas y crecen mejor a temperaturas no mayores de 37°C. No se conoce hasta la fecha, forma de reproducción sexual.^{2,7}

Puede presentar cuatro tipos morfológicos diferentes en función de las condiciones ambientales: levaduras o blastoconidios, pseudohifas, hifas verdaderas y clamidoconidios. Los blastoconidios son ovales o esféricos (3-7 x 3-14 μm), las pseudohifas (e hifas verdaderas) con cortas ramas unilaterales, bilaterales o multilaterales en el septo y abundantes clamidoconidios.

Las pseudohifas están formadas por cadenas de blastoconidios alargadas que simulan filamentos verdaderos.

El crecimiento de tubos germinativos se ve favorecido a la temperatura de 37°C,^{1,7,19} presencia de suero y pH cercano a la neutralidad. Los tubos germinativos son prolongaciones procedentes de una célula levaduriforme sin constricción en el punto de origen. El grosor puede medir alrededor de la mitad del diámetro de la levadura y tener una longitud tres o cuatro veces mayor al diámetro.

Los clamidoconidios, son células grandes, redondeadas, con pared engrosada y baja actividad metabólica, que se producen en el micelio de forma intercalar o terminal, cuando hay escasez de nutrientes. Estas formas de resistencia, pueden dar lugar a nuevas levaduras o bien degenerar. Los clamidoconidios se caracterizan por tener una capa externa compuesta principalmente por β -1,3 glucano y en menor proporción

quitina, una gruesa capa interna compuesta por proteínas y una región central de la célula rica en ácido ribonucleico y glóbulos lipídicos.^{1,2,7,19-21}

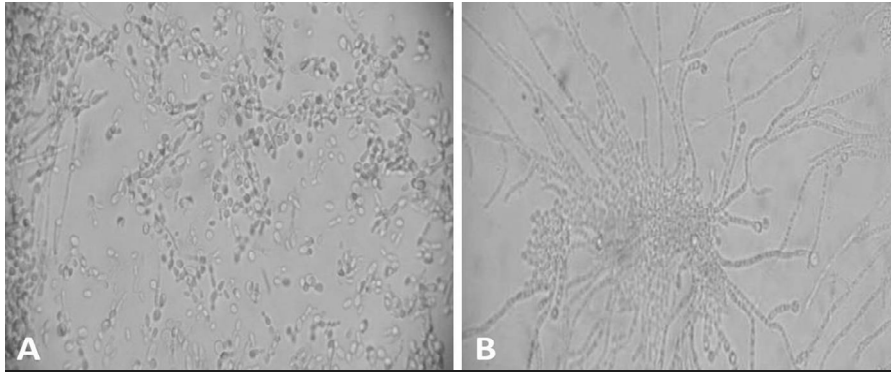


Figura 3: foto micrografías ópticas: A: observación con azul de lactofenol de blastoconidios y pseudohifas de *C. dubliniensis*, de cultivo en ASG (400x). B: observación de hifas, clamidoconidios y blastoconidios de *C. dubliniensis*, en agar leche (400x)

GENOMA

El genoma completo de *C. dubliniensis* fue secuenciado en el año 2009, está compuesto por ocho pares de cromosomas y se estima que su tamaño completo es de 14,6 Mb. La comparación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*, revela que más allá de las diferencias cariotípicas, los genomas de las dos especies son muy similares, presentando una homología del 80% en el 96,3% de los genes.²²

Muchas de las diferencias entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* se deben a la expansión de ciertas familias de genes relacionados con la virulencia en *C. albicans*. Algunos de los genes que están ausentes en *C. dubliniensis* están implicados en la formación de hifas como los que codifican, para las adhesinas de la superficie celular Hyr1 y Als3, y dos miembros de la familia de las proteinasas aspárticas Sap5 y Sap6. Sin embargo, quizás la principal diferencia entre estas dos especies se deba al tamaño de la familia de genes telómero-asociado (TLO) que está compuesta por 14 genes en *C. albicans* y por dos genes en *C. dubliniensis*.²² Actualmente la tipificación por secuencias de

múltiples locus (MLST) revela que la estructura de *C. dubliniensis* es menos diversa y compleja que la de *C. albicans*. Las diferencias entre ambos genomas, muestran las trayectorias evolutivas divergentes seguidas por ambas especies.^{2,23-26}

ECOLOGÍA Y FUENTES DE INFECCIÓN

Candida dubliniensis se aisló tanto de personas sanas como enfermas y en particular en lesiones de la mucosa oral de pacientes VIH+ con infección avanzada y recuento de linfocitos T CD4+ <200 μ L y sida. La incidencia de candidiasis oral confirmada por la presencia de levaduras en el examen de exudados bucales es muy variable según los autores, desde el 1,5% y hasta el 32% de los enfermos estudiados.² En otros pacientes inmunocomprometidos, como los tratados con drogas antituberculosas,²⁷ la incidencia ha aumentado del 28% al 38% a diferencia de lo que sucedió con los pacientes VIH/sida en los que se observó un descenso como consecuencia del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA). Los diferentes modelos de esquemas de antifúngico-terapia aplicados a dichos pacientes, así como la carencia de un control efectivo de la infección y su prevención, determinan diferencias en la distribución de especies de *Candida*.²⁴

En un estudio realizado en Sudáfrica, el 14,0% de las personas sanas de raza blanca portaban *C. dubliniensis* en la cavidad oral. También, autores argentinos, como Jewtuchowicz y col., corroboraron la presencia de esta especie en la cavidad oral tanto en sujetos sanos como enfermos.^{1,2,24,28-37} Sin embargo, otros autores no acuerdan con esto y lo consideran un integrante de la flora endógena de menor importancia.^{24,31,38}

En varias publicaciones se ha confirmado el hallazgo de esta especie en muestras clínicas como esputo, heces, exudados de mucosa vaginal, etc.; también ha sido reconocida por diversos autores como causa de candidiasis diseminada en pacientes con o sin infección por VIH, con hemocultivos positivos y desenlace fatal.^{27,39-43}

A diferencia de otras especies de *Candida*, *C. dubliniensis* no se aisló de muestras no humanas, esto ha llevado a especular que esta especie es exclusiva del hombre y los

sitios más frecuentes donde se encuentra son la cavidad oral y el tracto respiratorio superior.^{31,36,39,44-47}

La candidiasis oral es la forma más frecuente de micosis mucocutánea. *Candida* forma parte de la biota de la mucosa oral y se aísla como comensal en el 53% de la población general. En 150 especies de *Candida* aisladas de la cavidad oral, el 80% corresponde a la especie *C. albicans* que puede colonizar sola o asociada principalmente a *C. glabrata* y *Candida tropicalis*.²

Otras especies aisladas en forma frecuente en cavidad oral son: *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida famata*, *Candida lusitanae*, y últimamente *C. dubliniensis*. Incluso algunos autores aislaron *C. dubliniensis* de mucosa bucal, asociada a otras especies de *Candida* y otros agentes no micóticos como *Fusobacterium nucleatum*.⁴⁸ Entonces podemos afirmar que las fuentes de infección son de origen endógeno en la mayoría de los casos y dependen de la colonización previa.²⁸

FACTORES PREDISPONENTES

Las levaduras del género *Candida* necesitan de una serie de factores predisponentes para producir enfermedad en la mucosa oral, especialmente cuando se presenta la combinación de tres grupos de ellos: los dependientes del hospedador (locales y sistémicos), la virulencia de la cepa y las modificaciones del microambiente de la cavidad oral. De allí que la patogénesis de la candidiasis oral sea tan compleja.^{28,38,47,49,50}

Estos factores que favorecen la colonización y posterior infección por *Candida*, son los que determinan el tipo de pacientes que pueden infectarse, y obviamente que los inmunocomprometidos son los que reúnen las condiciones para que esto acontezca. De allí que se diga que la candidiasis oral pueda ser definida como “la enfermedad del paciente enfermo”.²⁸

Entre los factores inherentes al hospedador podemos citar: alteraciones endocrinológicas, inmunodepresión asociada a tratamientos antineoplásicos o inmunosupresores en pacientes trasplantados, así como también agamaglobulinemia o defectos de la inmunidad celular, sida, desórdenes hematológicos e inmunológicos como agranulocitosis, enfermedades malignas tales como leucemias, linfomas, anemia aplásica y tratamientos de tiempo prolongado con antibióticos, corticosteroides, antidepresivos, quimioterápicos, inmunosupresores en general; también hiposialia y/o xerostomía causadas por enfermedad de Sjögren, drogas o radioterapia; y estados terminales de enfermedades sistémicas.²

Con respecto a los factores que modifican el microambiente de la cavidad oral mencionamos: el uso permanente de prótesis mal ajustadas, mala higiene bucal, mal estado de conservación de la dentadura en general, el uso crónico de enjuagues bucales, y/o antisépticos, pérdida de la dimensión vertical, uso del chupete en niños por tiempo prolongado, tabaquismo, alcoholismo.²

PATOGENIA

Con respecto al género *Candida*, es entre los hongos, el más comúnmente hallado en la cavidad oral. Los factores virulentos de *C. albicans* son los más estudiados y conocidos por ser considerada la especie que más frecuentemente produce enfermedad en la cavidad oral conjuntamente con *C. tropicalis*. Las mismas se adhieren a las células hospederas “*in vitro*” en mayor grado que aquellas menos virulentas como *C. krusei* o *C. guilliermondii*.²

Las últimas experiencias descritas respecto a la capacidad de adherencia de *C. dubliniensis*, tanto en células epiteliales bucales humanas *in vivo* como *in vitro* a matrices proteicas extracelulares, constataron que es igual a la de *C. albicans*; solo hubo pequeñas diferencias en la capacidad de adherencia entre los distintos genotipos de *C. dubliniensis*.⁵¹

Las formas filamentosas de *C. albicans* se adhieren en mayor grado a diversos sustratos que las formas de levadura, característica fenotípica que es compartida también por la especie *C. dubliniensis*. Esto sugeriría que la estrecha relación filogenética existente entre estas dos especies, haría tan patógena a *C. dubliniensis* como *C. albicans*; sin embargo, algunos autores como Sullivan y col.,¹ afirman que otros son los factores que contribuyen a la mayor virulencia exhibida por *C. albicans*.^{2,51}

Entre los factores de virulencia comunes entre ambas especies, y de importancia en el rol patogénico, podemos citar la posibilidad de formar tubos germinativos, pseudohifas, hifas y clamidoconidios, (aspectos morfológicos), de secretar enzimas como aspartil proteinasa (SAP) y fosfolipasas (esta última de importancia en la producción de estomatitis por uso continuo de prótesis bucales), el *switching* o variabilidad fenotípica y antigénica, la inestabilidad genómica, la capacidad de adherirse a la membrana celular de células epiteliales bucales e incluso de formar biopelículas sobre la superficie de objetos como catéteres o dispositivos médicos permanentes, lentes de contacto y particularmente sobre prótesis bucales.^{2,19,51-54}

Actualmente se conoce que *C. dubliniensis* puede colonizar las bolsas periodontales tanto de pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Es allí donde este hongo forma verdaderos agregados de colonias (biopelículas), con fusobacterias, bacilos Gram negativos anaerobios o cualquier componente de la biota de mucosa oral.

Esta capacidad de formar biopelículas permite a esta levadura mantenerse formando verdaderos nichos ecológicos en la mucosa oral, ya sea como comensal o agente patógeno; de allí que se considere un verdadero factor de virulencia y quizás el principal en las candidiasis invasoras. Esta característica de *C. dubliniensis* es también compartida por otras especies como *C. albicans* y *C. tropicalis*.^{29,51}

Los componentes de la pared del hongo, mananos y glucanos (glucoproteínas), así como la producción de enzimas principalmente fosfolipasas y proteinasas,

conjuntamente con la formación de tubos germinativos, favorecen la adherencia del hongo a células y receptores del hospedero y la posterior invasión fúngica.

Asimismo, el hongo gracias a algunos componentes de su pared, también puede evadir la fagocitosis por parte de los macrófagos del hospedero, interferir en la presentación de antígeno e inducir la respuesta de linfocitos T (LT) supresores. El daño en los tejidos es consecuencia no solo de la acción directa del microorganismo; sino también de la respuesta del propio huésped, quien pone en marcha reacciones inmunoalérgicas mediadas por IgE en contra de los antígenos del hongo e hipersensibilidad tardía como en la candidiasis mucocutánea crónica. *Candida* para producir infección, primero debe colonizar y luego multiplicarse e invadir.²

DESCRIPCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

En relación con la virulencia, como ya fue mencionado, la especie mejor estudiada es *C. albicans*. En esta especie se han identificado diversos factores asociados con la virulencia, entre los que destacan las adhesinas, como por ejemplo el producto del gen *HWP1* o los de la familia de genes *ALS*, junto con varias enzimas extracelulares como las proteinasas aspárticas y las fosfolipasas. Uno de los factores de virulencia más importantes, es la capacidad de transformación de levadura a micelio, siendo ambas formas morfológicas esenciales para la virulencia. Las hifas desempeñan un papel clave en la adhesión, la invasión y la formación de biopelículas, mientras que las células de levadura es probable que sean requeridas para la traslocación, diseminación hematológica y la colonización inicial de las superficies del hospedador.

C. dubliniensis comparte con *C. albicans* varios de estos factores de virulencia y quizás por ello, es difícil entender por qué hay tal disparidad en la capacidad de *C. albicans* y *C. dubliniensis* para colonizar y causar enfermedad en el ser humano.^{2,7,19}

DIMORFISMO

Llamamos dimorfismo al proceso por el cual algunas levaduras del género *Candida*, como *C. albicans* y *C. dubliniensis* experimentan un cambio estructural que afecta a la célula convirtiéndola en filamento micelial. La formación de micelio se relaciona con la virulencia debido a tres observaciones: la primera es que la filamentización se induce a 37 °C en presencia de suero y pH neutro, estas condiciones son similares a las que encuentra *Candida* al infectar un hospedero; segundo, se ha comprobado que los filamentos son más adherentes a las células de los mamíferos que las levaduras, y la adhesión es sin duda un paso previo a la penetración del hongo en los tejidos del huésped; por último, las levaduras fagocitadas por macrófagos producen filamentos provocando la lisis de dichos macrófagos.^{7,54}

C. dubliniensis manifiesta la capacidad de producir hifas de una manera menos eficiente en comparación con *C. albicans*, esta es probablemente una de las causas por las que *C. dubliniensis* es menos patógena que *C. albicans*.⁵²

La expresión diferencial de genes que acompaña a la formación de hifas, es responsable de cambios tanto en el ciclo de división celular como en la composición y organización de la pared fúngica que originan el cambio morfológico.

C. albicans y *C. dubliniensis* presentan perfiles similares de expresión de genes, sin embargo, *C. albicans* muestra una mayor expresión de genes de virulencia específicos de hifas (por ejemplo, *ECE1*, *HWP1*, *HYR1* y *ALS3*), mientras que *C. dubliniensis* muestra una respuesta transcripcional más moderada y no expresa genes específicos de hifas como *HYR1* y *ALS3*. Además, se han identificado varios genes con función desconocida que están específicamente regulados en *C. albicans*, mientras que están ausentes o muy divergentes en el genoma de *C. dubliniensis* (por ejemplo, *SFL2*).

Uno de los reguladores de la transcripción más importantes que intervienen en el control de la morfogénesis de *C. albicans* es el producto del gen *NRG1*, cuya expresión en condiciones de inducción de hifas es baja, mientras que en *C. dubliniensis* su alto nivel de expresión en estas condiciones, evita la formación de hifas y hace que las células permanezcan en la fase de levadura.⁷

La formación de clamidoconidios también se considera un proceso de dimorfismo. En ciertas condiciones de reducción de oxígeno, escasez de nutrientes, bajas temperaturas, parte de las hifas se rodean de una pared gruesa y se segregan del micelio parental en forma de clamidoconidios. Este cambio morfológico también está asociado con variaciones de la expresión génica, por eso se dice que son producto de un proceso morfogénico; algunos de los genes más relevantes que participan son: *EFG1*, *NRG1*, *HOG1*, *OLE1*, *SUV3*, *SCH9*, *ISW2* y *RIM13*.

El gen *EFG1* está involucrado en diferentes cambios morfológicos como la formación de clamidoconidios, el cambio fenotípico blanco-opaco y el desarrollo de micelios. Las deleciones^e en este gen bloquean la formación de hifas y de clamidoconidios.

El gen *NRG1* además de ser un gen regulador en la formación de hifas también lo es en la formación de clamidoconidios. El nivel de expresión del gen *NRG1* es un factor determinante en la formación de clamidoconidios, y diferencial entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En medios de inducción de clamidoconidios como es el agar Staib, *C. albicans* presenta una sobreexpresión de este gen, lo que supone que la capacidad de formación de clamidoconidios esté inhibida, creciendo las células en forma levaduriforme. Por el contrario, *C. dubliniensis* presenta una subexpresión del gen *NRG1*, favoreciendo la formación de clamidoconidios y de hifas.

^eDeleciones: tipo especial de anomalía estructural cromosómica que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma. Esta pérdida ocasiona desequilibrio, por lo tanto las deleciones son reordenamientos estructurales desequilibrados.

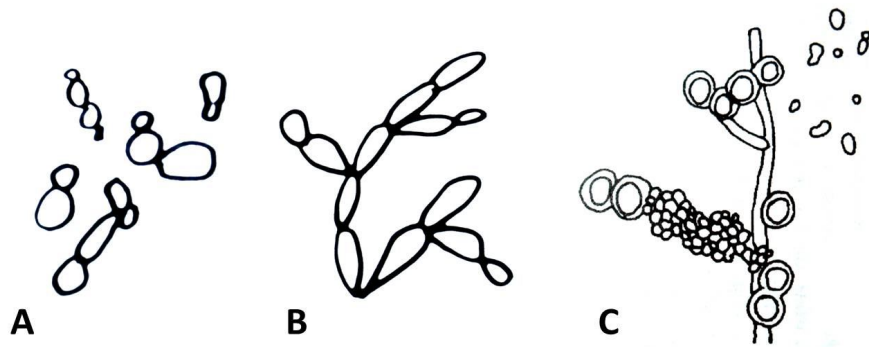


Figura 4: aspectos morfológicos de las levaduras *Candida*. A: levaduras *Candida* con blastoconidios B: pseudohifas de *Candida*. C: clamidoconidios, blastoconidios de *Candida*.

SECRECIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

La secreción de proteasas y otras enzimas hidrolíticas constituyen un factor de virulencia en *Candida* porque estas enzimas facilitan la progresión del hongo en los tejidos del hospedador. Las principales enzimas hidrolíticas secretadas por *Candida* spp. son las SAP y las fosfolipasas.^{19,53,54}

PROTEINASAS ASPÁRTICAS (SAP)

La familia de proteasas SAP es la responsable de la actividad proteolítica extracelular en *C. albicans*. Estas enzimas presentan su actividad óptima a un pH ácido. Esta característica es esencial para el hongo a la hora de infectar diversos tejidos. Hasta el momento se conocen diez genes de la familia SAP (*SAP1* a *SAP10*), de los que *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* se expresan específicamente en la forma micelial.

Aunque sólo tiene ocho genes SAP, *C. dubliniensis* presenta una elevada actividad proteolítica y adherencia a las células epiteliales bucales.

C. dubliniensis conserva sólo una de las proteasas relacionadas con la formación de hifas (*CdSAP4*) y carece de las otras dos (*CdSAP5* y *CdSAP6*).^{7,19,53,57,58}

FOSFOLIPASAS

Son otro tipo de enzimas hidrolíticas extracelulares implicadas en la patogénesis de *C. albicans*. Aunque los primeros estudios señalaban que sólo *C. albicans* producía fosfolipasas extracelulares, posteriormente se ha comprobado que otras especies como *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* producen niveles detectables, pero significativamente menores de actividad fosfolipasa. La producción de estas enzimas en *C. dubliniensis*, presenta variaciones que dependen de los aislamientos clínicos y las condiciones de cultivo, entre otros factores.^{7,19,53}

ADHESIÓN

La adhesión del hongo a los tejidos del huésped es un paso imprescindible para el inicio de la infección. El proceso de adhesión ocurre en varias fases. La primera fase es inespecífica y está basada en las fuerzas de atracción y repulsión entre las que se destacan las interacciones hidrófobas de las superficies tisulares. Esta etapa permite iniciar la colonización. A continuación, se establecen interacciones específicas entre proteínas de la pared celular de las levaduras que actúan como adhesinas y los receptores de las células epiteliales. Una vez adheridos muchos microorganismos forman una biocapa, esto es una estructura tridimensional de levaduras e hifas envuelta en una matriz exopolimérica, y así establecen un sistema de vida que los protege, favoreciendo su permanencia e impidiendo su erradicación.

Se han identificado diferentes adhesinas que promueven la adherencia de *C. albicans* a células del huésped o a ligandos de las mismas. Estudios genéticos han permitido identificar y aislar genes de *C. albicans* que potencialmente codifican estas adhesinas, entre los que se encuentran la familia génica *ALS*, y los genes *HWP1*, *INT1*, *MNT1* y *EAP1*. Los productos de los genes *ALS1*, *ALS3* y *ALS5*, están implicados en la adhesión a las células huésped en *C. albicans*, mientras que, *C. dubliniensis* expresa

de una manera diferente estos genes y presenta tres secuencias distintas de la familia ALS denominadas *ALSD1*, *ALSD2* y *ALSD3*.

La Hwp1p sólo se expresa en la forma micelial y actúa como un sustrato para la enzima transglutaminasa, la cual es necesaria para establecer la unión covalente entre el hongo y las células huésped. En *C. dubliniensis* se ha identificado un gen homólogo de Hwp1, sin embargo ambas proteínas muestran significativas diferencias estructurales derivadas de la presencia de numerosas deleciones en el gen *HWP1* de *C. dubliniensis*.^{7,19,54}

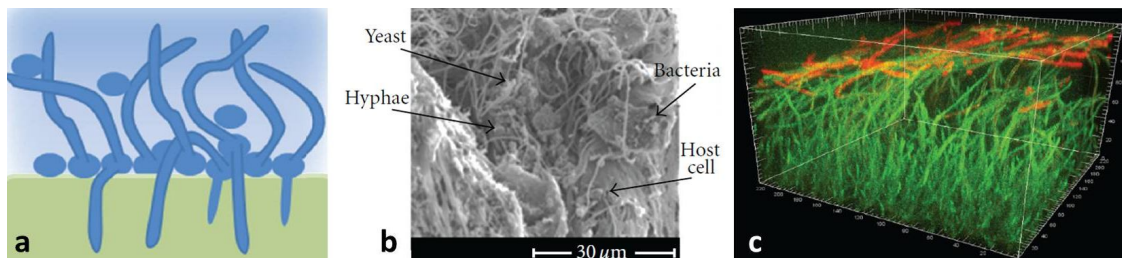


Figura 5: modelos y ejemplos de invasión de hifas *in vivo*, citado por Brand.⁵²

a: biocapa formada sobre superficie mucosa o siliconada, por adhesión de células de levaduras seguida de germinación de hifas y producción de polisacáridos que conforman una matriz extracelular (color azul). b: formación de biocapa a las 48 h en dentadura de rata. c: modelo en silicona de biocapa formada por matriz de hifas gruesas (verdes) y el depósito de β -glucanos en el extremo de las hifas (rojo).

CARÁCTER HIDRÓFOBO

La región hidrófoba de la superficie celular cumple un rol de importancia en la patogenia de los microorganismos. Además, las células hidrófobas son también más resistentes que las hidrófilas a la fagocitosis por macrófagos, por lo que una mayor hidrofobicidad proporciona al hongo protección frente a los mecanismos de defensa del huésped.

C. dubliniensis presenta una mayor adherencia a las células epiteliales de la boca, con respecto a *C. albicans* debido a sus diferencias en las propiedades hidrófobas. Se ha demostrado que mientras *C. albicans* pierde su carácter hidrófobo a 37°C,

C. dubliniensis mantiene esta propiedad independientemente de la temperatura. Este comportamiento parece estar relacionado con la presencia de un tipo de N-glucanos que modulan la hidrofobicidad superficial de la célula de *C. albicans*, que son significativamente menos abundantes en *C. dubliniensis*. En contraposición al comportamiento descrito para *C. albicans*, las células hidrófobas de *C. dubliniensis* no son más resistentes a la fagocitosis.^{7,19}

CAMBIO FENOTÍPICO O SWITCHING

El cambio fenotípico en *C. albicans* fue caracterizado por primera vez por Slutsky y col. y Pomes y col.;^{57,59} la transformación de levadura a micelio no es considerada como un cambio fenotípico, ya que cambia la morfología de toda la población, en respuesta a los factores ambientales. El fenómeno de cambio fenotípico ocurre en los lugares de infección y se asume además, que implica reordenamientos genéticos reversibles, tales como reordenamientos cromosómicos.

Se han descrito varios modelos de cambio fenotípico: formas lisas-rugosas, formas liso-micelial y formas blanco-opacas.⁵⁹

Los mecanismos moleculares responsables de la transición blanco-opaca de

C. albicans están representados en *C. dubliniensis* con un 84% de homología, sin embargo, en esta última especie los mecanismos parecen ser menos uniformes y eficientes. Parece probable que esta variabilidad sea el resultado del alto nivel de inestabilidad genética característica de *C. dubliniensis*.

Aunque el papel del cambio fenotípico en la virulencia de *C. dubliniensis*, no es aun totalmente conocido, se ha observado que las células opacas son más virulentas en infecciones cutáneas, mientras que las células blancas lo son en infecciones sistémicas.^{7,19}

El cambio fenotípico se ha relacionado con la modulación de determinados factores de virulencia, como cambios en la capacidad antigénica, la morfología y tamaño celular, la adhesión, la secreción de proteasa ácida y fosfolipasas y la sensibilidad a los fármacos.^{53,54} Además, el cambio fenotípico altera de manera directa o indirecta, la expresión de muchos genes, como los reguladores transcripcionales (*EFG1* y *TUP1*) y algunos implicados en virulencia (*SAP*).

La familia de genes *SAP* constituyen blancos potenciales para los agentes antifúngicos. La búsqueda de genes *SAP* en *C. dubliniensis* y el estudio de las condiciones para su expresión diferencial, podrían ayudar a discernir, si la menor virulencia de *C. dubliniensis* es debida a sus diferencias genéticas, o más bien a que existan diferencias en la regulación de la expresión de sus genes.^{7,19}

CANDIDIASIS ORAL: HISTORIA. DEFINICIÓN

La candidiasis oral como entidad clínica ha sido reconocida desde la antigüedad; ya Hipócrates en su tratado sobre "Epidemias" describió dos casos de afta oral o *muguet* (placas blancas) en pacientes debilitados, asociados con enfermedades agudas subyacentes, y la presencia de su cuadro clínico ha sido citada durante siglos.

Entre los escritos de Galeno hay numerosas descripciones de afta oral y su frecuente incidencia entre los niños, sobre todo en los "enfermizos" (Galeno, 130-200 aC). La enfermedad es también mencionada por los siguientes autores: Samuel Pepys en su diario del 17 de junio de 1665,⁶⁰ Rosen von Rosenstein en un texto pediátrico de 1771,⁶¹ al igual que Underwood en 1784,⁶² reconocen las condiciones para una candidiasis oral y gastrointestinal.⁷

La enfermedad llegó a ser tan frecuente en Francia que la Real Sociedad Francesa de Medicina ofreció un premio para su estudio en 1786, de 1200 libras.⁶³ Fue Verón, en 1835, quien postuló que la entidad clínica se adquiría durante el paso a través del útero; también describió los primeros casos de candidiasis esofágica.⁶⁴

El descubrimiento inicial del organismo causante de la enfermedad no se hizo hasta 1839, cuando Langenbeck descubrió la "planta criptógama" en una lesión de *muguet*. Sin embargo no asoció la presencia del hongo con las lesiones de la lengua. Erróneamente Langenbeck sugirió que el hongo era el responsable del tifus, pero su descripción fue una de las primeras en asociar un microorganismo con un proceso patológico.⁶⁵

Las primeras noticias del establecimiento del agente causal con el *muguet* proceden de Gruby.⁶⁶ Este investigador definió la enfermedad y su agente causal en 1842, describiendo al hongo como "el verdadero *muguet* de los lactantes".

Pero Berg⁶⁷ en 1846, fue quien realmente describió la relación entre el hongo de la candidiasis y las lesiones bucales. Este autor consideró que el hongo era transmitido por las malas condiciones higiénicas y los biberones de uso común. Asimismo, asoció su presencia con enfermedades debilitantes, confirmando algunos comentarios ya hechos por Hipócrates. En 1853 Robin,⁶⁸ hizo un importante aporte al demostrar y reconocer que el hongo causante del *muguet* podría diseminarse a órganos profundos durante la fase terminal de otras enfermedades. También describió en detalle las formas tanto de levadura como del micelio del microorganismo.⁷

Durante el siglo XIX era bien conocido que las enfermedades debilitantes predisponían a los pacientes a la candidiasis. Trousseau en 1869, sugirió que la candidiasis oral era una expresión local de una anomalía de todo el sistema⁶⁹ y Parrot, casi diez años después, observando la asociación casi invariable de la enfermedad con un estado de debilidad subyacente, afirmó que la candidiasis es "*siempre la consecuencia de un estado mórbido preexistente*".^{7,70}

Casi un siglo después de estos hallazgos, las especies de *Candida* causantes de la enfermedad fueron objeto de estudios taxonómicos bastante confusos. Mientras algunos autores intentaron cuidadosamente su clasificación dentro de los géneros botánicos ya establecidos, otros aislaban levaduras similares de material clínico procediendo a la asignación de nuevos y conflictivos nombres de género y especie.⁷

CANDIDIASIS ORAL: CLASIFICACIÓN. ASPECTOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS

Las candidiasis orales además de presentar distintos aspectos clínicos e histopatológicos, se distinguen en formas primarias y secundarias, donde la candidiasis oral constituye una de las tantas manifestaciones de la candidiasis mucocutánea.

Desde la primera clasificación de candidiasis oral descrita por Lehner en 1966,²⁸ la misma ha ido sufriendo variaciones. Actualmente la más aceptada es la propuesta por Holmtup y Axel,² que consideran las siguientes formas clínicas primarias y secundarias:

- *Candidiasis pseudomembranosa (aguda o crónica)*: es observada habitualmente en individuos inmunodeprimidos, pacientes irradiados, neonatos, ancianos, y pacientes con xerostomía y diabetes mellitus, entre otros. Se caracteriza por la presencia de placas blancas amarillentas (masas de hifas, levaduras y detritus), de consistencia blanda y gelatinosa y crecimiento centrífugo. Las lesiones se localizan en la región orofaríngea, mucosa yugal, y bordes laterales de la lengua. Los síntomas en general son leves (ardor y comezón), pero puede también presentarse disfagia cuando afecta la región orofaríngea.
- *Candidiasis eritematosa (aguda o crónica)*: es la de más frecuente aparición tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes; suele aparecer como complicación por la acción de antibióticos (ATB) de amplio espectro. Se caracteriza por la presencia de eritema y atrofia de la mucosa palatina y las papilas linguales; aunque puede presentarse en otros sitios de la cavidad oral. La superficie de la lengua adquiere un aspecto rojo y liso como de caucho mojado.

- *Candidiasis hiperplásica (leucoplasiforme)*: se manifiesta como placas blancas, que no se desprenden fácilmente con el raspado, de aspecto ligeramente vegetante, simulan una papilomatosis florida; típicamente localizadas en mucosa yugal, lengua y detrás de las comisuras labiales. No es patognomónica de ninguna enfermedad y siempre presenta una evolución crónica. En este proceso, las hifas y pseudohifas de *Candida*, no sólo invaden la superficie epitelial, sino también los estratos profundos del mismo, donde puede observarse una displasia epitelial, con riesgo asociado de malignización.
- *Lesiones asociadas (secundarias)*: estomatitis protésica, queilitis angular, glositis romboidal, queilitis exfoliativa. En pacientes VIH+, particularmente, se observa candidiasis oral asociada a eritema gingival lineal, periodontitis necrótica y queilitis exfoliativa.²

Cuando dos o más de estas formas clínicas aparecen se las denomina candidiasis oral multifocal.²⁸

Lo que no se pudo aclarar aún son las circunstancias requeridas para que la candidiasis oral se manifieste como pseudomembranosa o eritematosa. Aunque podría ser explicado por las diferencias en los mecanismos inmunitarios de las defensas locales.²⁸

Las candidiasis orales en pacientes VIH+ pueden presentarse como zonas de parches eritematosos o blancos fácilmente removibles con bajalenguas o bisturí. Sin embargo, adquieren a veces formas de presentación clínica atípica como el eritema gingival lineal, la periodontitis necrótica y la queilitis exfoliativa, incluso pueden observarse como una combinación de las mismas; aunque no hay que descartar las otras formas clínicas, principalmente las formas pseudomembranosa y eritematosa, que si bien presentan síntomas muy leves en la mayoría de los pacientes, pueden hallarse asociadas a: disfagia, odinofagia y disgeusia.²

El diagnóstico de las candidiasis orales continua siendo importante, ya que puede ser la primera manifestación de alteraciones sistémicas, incluyendo infección por virus

VIH. Es habitual observarlas en pacientes VIH+ con recuentos de linfocitos TCD4+ < 200 μ L; sin embargo la aplicación del TARGA en estos últimos años, redujo la frecuencia de aparición de candidiasis oral del 80% al 4% en estos pacientes.²

DIAGNÓSTICO DE LA CANDIDIASIS: CLÍNICO Y MICROBIOLÓGICO

Con respecto al diagnóstico de la candidiasis oral en cualquiera de sus formas, se basa en el reconocimiento de las lesiones clínicas, que debe ser confirmado con la observación de pseudohifas y blastoconidios en los exámenes microscópicos directos (EMD) de muestras orales y el aislamiento en cultivos de colonias del género *Candida*. Como *Candida* forma parte de la biota oral, un hallazgo positivo en un EMD y/o aislamiento en cultivo, no son significativos sin lesiones clínicamente compatibles, ya que sólo comprobaríamos colonización no infección, particularmente en el caso que el EMD sea negativo y el cultivo positivo. Sin embargo, la comprobación de levaduras y pseudohifas que invaden los tejidos en preparados histológicos, es definitivo para establecer el diagnóstico de candidiasis oral.²⁸ Se requieren biopsias para hacer diagnóstico diferencial con otras patologías de la boca, especialmente en el caso de candidiasis hiperplásica, para descartar leucoplasias y carcinomas *in situ*.²

Es imposible poder distinguir clínicamente, si la causa de candidiasis oral es por *C. dubliniensis*, *C. albicans* u otra especie, lo cual ha sido corroborado y publicado por numerosos autores.^{28,38,49,50} Si se demostró la apetencia especial de *C. dubliniensis* por células epiteliales de la mucosa bucal por la presencia de altos niveles de proteinasa extracelular, que permiten una mayor adherencia al mismo.⁷¹

La identificación correcta de *C. dubliniensis* es problemática debido a que comparte aspectos fenotípicos con *C. albicans* lo que determina que con frecuencia sea confundida con esta última especie.^{1,2,27,29,47,54,71-75}

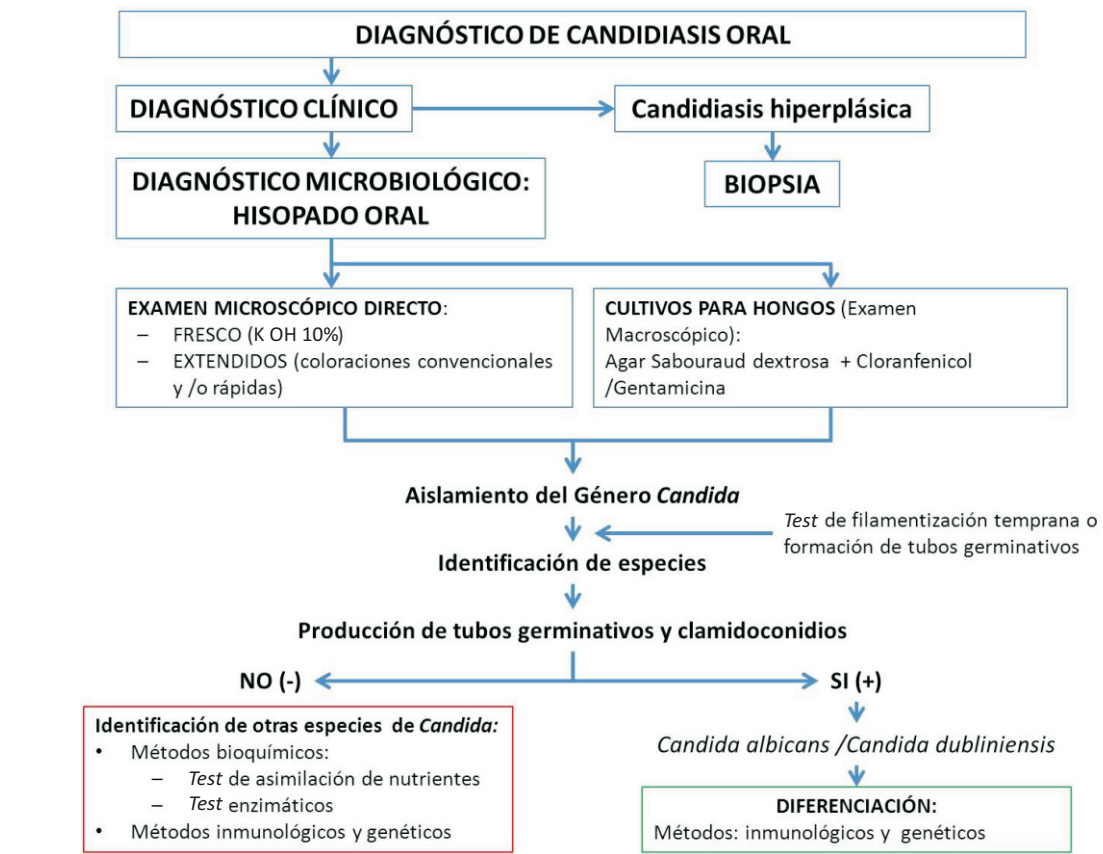


Figura 6: Marcha para diagnóstico de candidiasis oral. Citado por Coronado-Castellote L y col.²

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *C. dubliniensis*

Candida dubliniensis presenta características fenotípicas casi idénticas a las de *C. albicans*, incluso comparten la habilidad de producir tubos germinativos, formación de pseudohifas e hifas verdaderas y clamidoconidios;²⁴ teniendo en cuenta esta relación tan cercana entre ambas levaduras, la diferenciación de estas especies basada sólo en sus características fenotípicas puede ser difícil.

Para resolver este problema, se han desarrollado diversos métodos basados en sus características fenotípicas, genotípicas e inmunológicas con la finalidad de poder distinguir ambas especies. Algunos de los métodos fenotípicos se basan en el empleo de medios de cultivo diferenciales en los que se analiza el color que desarrollan las colonias en medios cromogénicos, en el análisis de las características fisiológicas (producción de tubos germinativos, termotolerancia), en la evaluación de

características macro-micromorfológicas (aspecto de la colonia, presencia de pseudohifas, clamidoconidios) y las pruebas basadas en sus propiedades bioquímicas (asimilación y fermentación de fuentes carbonadas, etc.).

Las técnicas inmunológicas, son de utilidad en pacientes con candidiasis graves, particularmente en pacientes inmunocomprometidos; en los mismos es habitualmente difícil tomar muestras profundas y/o el tiempo de demora de cultivos puede ser crítico para dichos pacientes.

Los métodos inmunológicos, son una herramienta de gran valor que se basan en la detección de antígenos o anticuerpos a través de ensayos de inmunofluorescencia indirecta, aglutinación en látex, ELISA, etc. Hoy en día se dispone de pruebas comerciales rápidas, de fácil ejecución, que tienen la ventaja de tornarse positivas antes que los cultivos. Sin embargo no son tan específicas y son más útiles cuando se las emplea en forma conjunta. Ayudan a incrementar la sospecha de candidiasis invasoras; no se emplean para el diagnóstico de infecciones por *Candida* en cavidad bucal. Si bien estas pruebas no identifican especies, en la actualidad hay técnicas de aglutinación en látex, que utilizan anticuerpos monoclonales específicos para levaduras que permiten identificar *C. dubliniensis*, como el test Bichro-DubliFumouze® (FumouzeDiagnostics, Levallois-Perret, France).^{2,7}

La mejor forma de identificar estas especies son las técnicas basadas en biología molecular. Actualmente se conoce que el genoma de *C. dubliniensis* es mucho menos polimorfo que el de *C. albicans*.^{1,2,16,24,71,72,75,76}

Las técnicas genéticas son de alta especificidad y sensibilidad y permiten la identificación de estos patógenos sin necesidad de cultivos previos. Distintos ensayos de reacción en cadena polimerasa (PCR) se han aplicado y se siguen utilizando, tales como el PCR RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), con buenos resultados. Actualmente Bosco-Borgeat, Ligor y col. propusieron una multiplex PCR (reacción en cadena polimerasa múltiple), que permite identificar levaduras

directamente de muestras clínicas sin extracción previa de ADN, eliminando el tiempo de espera de cultivo.^{2,25,54,74,75,77}

Sin embargo, estas técnicas genéticas no son accesibles para la gran mayoría de los laboratorios clínicos hospitalarios, ni son de uso rutinario debido a su costo y complejidad para implementarlas.^{1,16,72,76}

DIAGNÓSTICO FENOTÍPICO DE *C. dubliniensis*

Existen actualmente técnicas basadas sólo en los aspectos fenotípicos de las levaduras, que conforman una marcha diagnóstica de fácil aplicación en el laboratorio de diagnóstico clínico micológico.

La marcha diagnóstica que permite diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* comprende aspectos macro-micromorfológicos como la producción de tubos germinativos (TG) y clamidoconidios (CL) en agar leche; así como pruebas basadas en propiedades fisiológicas y bioquímicas, tales como la incapacidad de *C. dubliniensis* de crecer a temperaturas elevadas; crecimiento en medios cromogénicos como el CHROMagar Candida® (CHROMagar Company, París, Francia), la prueba de opacidad, el desarrollo o no en medios hipersalados con NaCl, así como la falta de capacidad para asimilar N-acetil glucosamina debido a la ausencia de β -glucosidasa.

Otros métodos últimamente propuestos y que permiten una fácil diferenciación entre ambas especies son, el desarrollo en agar tabaco y en medio mixto CHROMagar Candida® y agar con semillas de girasol: agar Pal CHROM. Estas características conjuntamente con la identificación basada en asimilación y/o utilización de carbohidratos^f y compuestos nitrogenados, mediante micrométodos comerciales como el API ID 32C® (Laboratorio bioMérieux SA, MarcyL'Étoile, Francia) o métodos

^fLos carbohidratos son definidos como aquellas sustancias que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. También existen derivados de carbohidratos que pueden contener nitrógeno y azufre. Acorde a su estructura química, los carbohidratos se pueden dividir en dos grupos principales, azúcares y no azúcares. Derivados de monosacáridos incluyen el éster de azúcar fosfato (D-glucosa-6-fosfato, D-glucosa-1-fosfato, D-fructuosa-6-fosfato y diésteres de fosfato), azúcares-amino (D-glucosamina), azúcares-ácido (ácido glucónico y ácido glucurónico) y azúcares-alcohol (sorbitol).

automatizados como el sistema Vitek 2 ID-YST® (laboratorio bioMérieuxVitek, Inc., Hazelwood, MO, EE. UU.) son concluyentes a la hora de la identificación definitiva de *C. dubliniensis*.^{2,29,31,54,73-75,77,-86} Es importante destacar que el uso de un método no garantiza resultados confiables, deberían utilizarse al menos cuatro métodos para la diferenciación fenotípica de estas especies.^{2,75}

Actualmente el algoritmo que se emplea para identificar fenotípicamente

C. dubliniensis, en la Unidad de Micología del Hospital Francisco Muñiz de C.A.B.A., Argentina, incluye pruebas basadas en propiedades macro-micromorfológicas y bioquímicas de la levadura. Este algoritmo será el que se utilizará como marcha diagnóstica en esta investigación (ver anexo IV).^{73,75,79}

Crecimiento en medios cromogénicos

En 1958 Pagano y col. adicionaron al medio de agar Sabouraud dextrosa, un compuesto químico: el cloruro de trifenil-tetrazolio, cuya reducción por el hongo tiñe las colonias en varias tonalidades lo que permite diferenciar *C. albicans* de otras especies de *Candida*.

En los últimos años se ha promovido el uso de medios cromogénicos, ya que resulta un método muy atractivo por su sencillez y rapidez con el que, según los fabricantes, se obtiene la identificación presuntiva de algunas especies de *Candida*. En la actualidad existen diferentes medios cromogénicos comerciales como por ejemplo CHROMagar Candida®. Los compuestos cromógenos de este último son hidrolizados por acción de enzimas específicas de las levaduras, desarrollando colonias de *Candida* de diferentes colores; esto permite identificar presuntivamente algunas especies de *Candida* de relevancia clínica.^{2,54}

Este medio facilita también el aislamiento y reconocimiento de cultivos mixtos de levaduras. En CHROMagar Candida® las colonias de *C. albicans* desarrollan de color verde esmeralda, mientras que las de *C. dubliniensis* son de color verde oscuro.

C. tropicalis desarrolla color azul y *C. krusei* color rosa seco.^{54,75,82}

Crecimiento a 42 °C

C. albicans tiene la capacidad de crecer a 42 °C. *C. dubliniensis* habitualmente no desarrolla a esa temperatura (T), porque la mayoría de las cepas carecen de termotolerancia; solo un pequeño porcentaje es capaz de hacerlo; sin embargo, sirve como método válido para diferenciarlas.^{7,73,75,82}

Agar leche

Se utiliza para observar las características micromorfológicas. Tanto *C. albicans* como *C. dubliniensis*, forman tubos germinativos a 35 °C antes de las 3 h.

El tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula parental y su longitud tres o cuatro veces mayor que ésta; este es indistinguible entre ambas especies. Los clamidoconidios desarrollan también en ambos casos a 28 °C. Este medio permite observar además la producción o ausencia de pseudohifas y la disposición del micelio y blastoconidios.^{2,7,73,75,82}

Agar hipersalado con NaCl al 11%

C. albicans crece por la presencia de porinas que facilitan su desarrollo en medios con altas concentraciones en sales; *C. dubliniensis* no crece en este medio, por la alta concentración de NaCl.⁷⁹

Prueba de opacidad

Se utiliza un medio con Tween 80 y CaCl₂ que detecta la actividad lipolítica de

C. albicans. *C. albicans* desarrolla colonias rodeadas de un halo de opacidad por acción de las lipasas, que hidrolizan el Tween del medio, liberando ácidos grasos que precipitan el calcio del medio. El acomplejamiento del calcio se hace visible debido a la

presencia de cristales insolubles alrededor del sitio de inoculación. *C. dubliniensis* no tiene actividad lipolítica, por carecer de enzimas esterases, por lo tanto no forma halo alrededor de la colonia.⁸⁰

Agar tabaco

Permite distinguir a *C. dubliniensis* por sus características macro y micro morfológicas.

C. dubliniensis se diferencia de *C. albicans* porque desarrolla colonias de color dorado u ocre, de aspecto rugoso, bordes festoneados y forma racimos de clamidoconidios. Mientras que las de *C. albicans* son lisas, brillantes, bordes lisos y no forma clamidoconidios.⁸¹

Agar Pal CHROM

Este medio mixto elaborado con extractos de semillas de girasol (*Helianthus annuus*) y CHROMagar Candida® en partes iguales, permite separar y diferenciar los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* y los de *C. albicans*. Las diferencias micro-morfológicas están basadas en el color y aspecto de las colonias. *C. albicans* desarrolla colonias lisas de color verde claro, borde liso, con ausencia de clamidoconidios mientras *C. dubliniensis*, colonias rugosas de color verde azulado, borde festoneado y producción de clamidoconidios. Este método tiene una sensibilidad del 96,2% y una especificidad del 100%.^{78,83}

Pruebas bioquímicas: sistemas miniaturizados comerciales

Las pruebas bioquímicas se basan en la asimilación de azúcares y la detección de enzimas específicas; son realizadas en la mayoría de los casos con galerías comerciales, que mediante la presencia de turbidez por crecimiento celular o cambio de color del medio ponen de manifiesto un resultado positivo.

En la actualidad están disponibles diversos métodos semiautomáticos comercializados de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación. API ID 32C® es un kit comercial para identificación definitiva de levaduras; consta de una

galería de treinta y dos cúpulas que permite realizar veintinueve pruebas de asimilación de carbohidratos (azúcares y no azúcares), un control negativo, una prueba de sensibilidad (cicloheximida) y una prueba colorimétrica. Incluye una base de datos con 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados; y la lectura de los resultados después de 48 h de incubación a 28 °C, puede realizarse de forma visual o bien de forma automatizada.

Este sistema comercial permite diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*, puesto que los datos generados mediante estos sistemas revelan que el rango de los hidratos de carbono asimilables por *C. albicans* y *C. dubliniensis* son significativamente diferentes. Los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*, a diferencia de la gran mayoría de *C. albicans*, son incapaces de asimilar metil- α -D-glucósido, lactato o xilosa. Además, *C. dubliniensis* crece mucho más lentamente que *C. albicans* con D-trehalosa como única fuente de carbono.

Otras de las pruebas es el sistema automático VITEK 2 ID-YST® (laboratorio bioMérieux, Vitek, Inc., Hazelwood, MO, EE. UU.) que puede identificar levaduras y organismos afines en tan sólo 15 h. Este último está basado en tecnología de fluorescencia. La información se procesa gracias a un *software* de análisis y un sistema experto avanzado. Permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis*. Este último sistema permite diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans* como consecuencia de las diferencias en la asimilación de los azúcares D-trehalosa, metil- α -D-glucósido y lactosa.⁷⁵

Otras técnicas de identificación rápida para especies del género

Candida

Estas técnicas que están en el algoritmo (anexo IV), son de utilidad para diagnóstico rápido y presuntivo de algunas especies de *Candida*:

A-Tabletas de trehalosa® (Rosco Diagnóstica A/S, DK 2630 Taastrup, Denmark): esta prueba se basa en la asimilación de la trehalosa. Es útil como prueba de

screening. Contiene trehalosa como sustrato en buffer y como indicador rojo fenol que cambia de rojo a amarillo en caso positivo. Específica para identificación presuntiva de *C. glabrata*, produce viraje antes de las 2 h porque rápidamente libera las enzimas para degradarla. Otras levaduras, de importancia clínica como: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* también utilizan la trehalosa, pero positivizan la prueba después de 3h, por ello la indicación estricta del tiempo de lectura. Estas levaduras se diferencian micro-morfológicamente y por otras pruebas bioquímicas. *C. dubliniensis* no alcanza a virar el indicador dentro del tiempo de lectura, ya que asimila lentamente la trehalosa.

B- Tabletillas proline aminopeptidasa® (PRO) (Rosco Diagnóstica A/S, DK 2630 Taastrup, Denmark): la β -naftilamina es detectada por su reacción con la aminopeptidasa, que se pone de manifiesto por el viraje de color, del amarillo al rojo o naranja; esto es característico de *C. parapsilosis*, aunque *C. albicans* también da positiva esta prueba. Sin embargo, estas levaduras se distinguen fácilmente por sus características micro-morfológicas.

C- Prueba de detección de ureasa rápida: permite determinar la presencia de la enzima ureasa que es común en las bacterias y levaduras basidiomicéticas, no así entre las levaduras *Candida*. Existen varias técnicas para determinar la presencia de la ureasa; la más difundida y conocida es la siembra en agar urea de Christensen, pero es engorrosa y costosa. La técnica de ureasa rápida, en cambio, tiene la ventaja de ser económica, rápida y segura; se lee en apenas 15 minutos y los reactivos son de fácil preparación. Se basa en la hidrólisis que produce la ureasa de la levadura, que desdobla la urea produciendo amonio y CO₂, el cual alcaliniza el medio produciendo viraje del indicador rojo de fenol (del amarillo al rojo). La mayoría de las especies del género *Candida* son ureasa negativas; *C. krusei* suele producir una reacción débilmente positiva. Es imprescindible asegurar la pureza de la cepa en estudio, ya que las bacterias

pueden producir ureasa. Asimismo levaduras no *Candida* como algunas especies de *Trichosporon* y *Rhodotorula* también son ureasa positivas.⁷⁷

Candida dubliniensis: SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

C. dubliniensis, al ser reconocida como especie causante de patologías tanto localizadas como diseminadas, representa un verdadero problema a la hora de iniciar el tratamiento, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. Hay que destacar, que en la mayoría de los pacientes VIH+ con lesiones clínicas compatibles con candidiasis oral, tratados con fluconazol y que no respondieron al tratamiento, son aquellos en los cuales, se aisló *C. dubliniensis* con más frecuencia.⁴⁷

Esta capacidad de desarrollar resistencia al fluconazol, la hace diferente de

C. albicans y a la vez crea un problema terapéutico. Hay publicaciones que comunicaron la existencia de resistencia *in vitro* al fluconazol de la mayoría de las cepas de *C. dubliniensis* y una importante y creciente expresión de transportadores *MDR1* multidrogas de resistencia.^{1,2,15,23,24,31-34,42,45,86,87}

Esta predisposición, a generar rápidamente resistencia a fluconazol, la convierte en una especie que debe ser identificada adecuadamente en las muestras clínicas. Algunos investigadores plantearon que se establece una competencia en la cavidad oral, entre las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis*, y que en ausencia de antifúngicos (ATF) va a predominar *C. albicans*; sin embargo algunos otros factores pueden favorecer el predominio de *C. dubliniensis* en orofaringe, como la gran hidrofobicidad por células de superficie, lo cual le permite unirse a bacterias y formar biopelículas. Si a esto le sumamos la capacidad de *C. dubliniensis* de generar rápidamente resistencia a los ATF, principalmente en pacientes VIH o sida que han recibido múltiples tratamientos contra diversas micosis o excesiva terapia profiláctica con azoles.

Al eliminar así la competencia para *C. dubliniensis* con otros hongos o especies del mismo género, aumenta el riesgo de una candidiasis orofaríngea, causada por esta especie emergente con elevados perfiles de resistencia.

La estructura molecular de *C. dubliniensis* difiere significativamente de la de *C. albicans* y ha sido demostrado como impacta la misma en el desarrollo de mecanismos de resistencia específica a los ATF. Las sondas específicas de especie utilizadas inicialmente para estudiar *C. dubliniensis* fueron complejos ADN *fingerprint* Cd25, que demostraron que esta especie se puede dividir en tres grupos *fingerprint* (Cd25 grupos I-III). El grupo III se corresponde con los aislamientos de *C. dubliniensis* recuperados exclusivamente de pacientes provenientes de países de medio oriente como Egipto, Arabia Saudita e Israel. La mayoría de los aislamientos clínicos recuperados de distintos países del mundo, pertenecen al *fingerprint* Cd 25 grupo I. Los tres grupos se corresponden a su vez con 4 genotipos identificados en base a la secuencia de ADN del ITS (espacio interno de transcripción), en la región del operón ARNr. Estos son: *fingerprint* grupo I = ITS genotipo 1, *fingerprint* grupo II=ITS genotipos 2-4, *fingerprint* grupo III= ITS genotipos 3 y 4.²⁴

La tipificación por secuencias de múltiples locus (MLST) permitió identificar tres clados (C1-3), entre los aislamientos de *C. dubliniensis*.²⁴ La técnica consiste en la amplificación mediante PCR seguida de la secuenciación del ADN, que permite rastrear las diferencias en nucleótidos entre cepas en un número variable de genes, en función del nivel de discriminación que se desee.^{2,,24,25,75}

Con respecto a los clados de *C. dubliniensis* esta técnica identificó: clado 1 que corresponde a genotipo ITS 1, clado 2 corresponde genotipo ITS 2, clado 3 corresponde genotipo ITS 3 y 4. El análisis del MLST revela que la estructura de *C. dubliniensis* es menos diversa y compleja que la de *C. albicans*.

Se han estudiado los mecanismos moleculares de resistencia de *C. dubliniensis* con respecto a distintos ATF. El mecanismo de resistencia primaria al fluconazol puede ser explicado por una sobreexpresión del transportador *CdMDR1p*, debido a las mutaciones en el regulador transcripcional *Cd Mrr1p*.

Solamente dos modelos principales de resistencia a drogas antifúngicas han sido identificados en aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*. Uno de los grupos de

pacientes estudiados, fueron los tratados largamente con fluconazol y que generaron resistencia a la misma.

El mecanismo predominante de resistencia a fluconazol en *C. dubliniensis*, está mediado por la hiperregulación de la bomba de flujo de droga CdMdr1p, causado por mutaciones hiperfuncionales que determinan que el factor de transcripción CdMrr1p pierda la capacidad de regulación (deja de actuar según la concentración de fluconazol interno); esto determina que se sintetice de forma independiente, es decir se hace constitutivamente activo. Es menos común la sobreexpresión del gen *CdCdr1p* en *C. dubliniensis* como causa de resistencia a fluconazol. Esto es debido a que el gen mencionado alberga una mutación sin sentido en un número importante de aislamientos clínicos.²⁴

Otro grupo estudiado, con muy elevada resistencia intrínseca a 5-fluorocitocina (5FC), incluye los pacientes de etnia árabe (5FC CIM ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$); dichos aislamientos estudiados pertenecían al Cd25 *fingerprint* grupo III, MLST clado 3. El mecanismo es causado por un cambio de un único nucleótido base, en el gen *CdFCA1* que codifica la citosina desaminasa, que causa la sustitución de un aminoácido en la posición 29: serina por leucina (Ser29Leu), en una proteína desaminasa. Esta enzima convierte la prodroga no tóxica 5-FC, en 5-fluoracilo (5-FU), droga tóxica.

La resistencia a itraconazol, es sumamente rara en los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*. Se ha observado resistencia cruzada a fluconazol con otros azoles en aislamientos clínicos que se corresponden al genotipo ITS 3. La resistencia a azoles se asoció a la hiperregulación de *CdCDR1* y *CdCDR2*, pero no por *CdMDR1*.

No se ha descrito resistencia a polienos y equinocandinas para aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*.

El conocimiento del genoma completo de cepas de *C. dubliniensis* pertenecientes a los tres principales clados, permitirá en el futuro investigar el desarrollo y control de resistencia a drogas ATF.²⁴

JUSTIFICACIÓN

En Argentina, al igual que en otros países, son muy pocos los casos comunicados de candidiasis por *C. dubliniensis*.^{29,30,35-37,40,41,45,74}

El desconocimiento de la semejanza fenotípica con *C. albicans*, la falta de experiencia sobre procedimientos estandarizados para su aislamiento e identificación, no han permitido obtener datos epidemiológicos fidedignos ni establecer diagnósticos correctos de candidiasis causados por *C. dubliniensis*.

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

De allí la necesidad de poner en marcha un algoritmo en el laboratorio de Micología de la Cátedra de Clínica Dermatológica, que permita identificar *C. dubliniensis* en muestras clínicas obtenidas de candidiasis oral en pacientes inmunocomprometidos, ambulatorios e internados, de distintos servicios, en el Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

HIPÓTESIS

Candida dubliniensis es causa de candidiasis orofaríngea en pacientes inmunocomprometidos.

OBJETIVO PRINCIPAL

- Identificar fenotípicamente *C. dubliniensis*, en muestras obtenidas de mucosa oral de pacientes inmunocomprometidos hospitalizados y ambulatorios, con lesiones clínicamente compatibles con candidiasis oral, provenientes de distintos servicios del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Estimar la prevalencia de *C. dubliniensis* en los aislamientos clínicos del total de los pacientes inmunocomprometidos estudiados; y por grupos referidos a su enfermedad y/ o tratamiento inmunosupresor, en el Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba, Argentina; durante el período de recolección de los datos.
- Estimar la frecuencia de distribución de especies de *Candida*, únicas y asociadas en el total de los pacientes con candidiasis oral y referida a los distintos agrupamientos.
- Estimar la prevalencia de *C. dubliniensis* entre pacientes que presentaron al menos tres episodios en el último año y que habían sido tratados previamente con antifúngicos con diagnóstico de candidiasis oral; comparar los datos con los de aquellos que no los presentaron, en relación al total de casos estudiados y a cada grupo en particular.
- Estimar la prevalencia de *C. dubliniensis* según las características clínicas que presente la candidiasis oral, referida al total de los pacientes inmunocomprometidos estudiados.
- Determinar distribución por edad y sexo respecto del total de casos estudiados y en relación a cada grupo en particular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra poblacional

Se reclutaron 145 pacientes consecutivos con criterios de inclusión provenientes de distintos servicios del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba (HNCba), durante el período comprendido entre el 1º de julio de 2013 y el 31 de octubre de 2014 (16 meses).

Los pacientes inmunocomprometidos incluidos en este estudio fueron elegidos por reunir las siguientes características: ≥ 18 años de edad, de ambos sexos, con manifestaciones clínicas de candidiasis oral, sin tratamiento con drogas ATF en el momento del estudio, ambulatorios e internados provenientes de distintos servicios del HNCba; que aceptaron participar del estudio y firmar el consentimiento informado.

Los pacientes inmunocomprometidos incluidos en este estudio se los definió como aquellos pacientes inmunodeprimidos confirmados por su enfermedad de base y aquellos inmunosuprimidos por los tratamientos recibidos.

Se excluyeron del estudio, pacientes inmunocomprometidos con lesiones en mucosa oral, clínicamente incompatibles con candidiasis orales; aquellos pacientes que estaban en tratamiento con drogas ATF en el momento del estudio, pacientes inmunocompetentes con lesiones de candidiasis oral, < 18 años de edad, todos aquellos que se negaron a firmar el consentimiento informado y aquellos cuyos familiares no quisieron firmarlo.

Método

Población incluida en el estudio categorizada según sus características clínicas y servicio de procedencia

- Categoría A: Pacientes VIH/sida: provenientes del servicio de infectología del HNCba, ambulatorios y /o internados, con serología reactiva para VIH; confirmado mediante pruebas de laboratorio (Western blot y Elisa); que habían o no desarrollado síndrome

de inmunodeficiencia adquirida (sida). Con o sin adherencia al tratamiento antirretroviral (TARV) y recuento de linfocitos T que expresan el marcador CD4+ $\leq 200\mu\text{L}$.

- Categoría B: Pacientes oncológicos: provenientes del servicio de oncología del HNCba, ambulatorios y/o internados, en tratamiento quimioterápico desde su comienzo y hasta dos meses después de su finalización; y/o radioterapia desde su comienzo y hasta 6 meses después de su finalización; y/o con xerostomía de hasta 18 meses de evolución.
- Categoría C: Pacientes con enfermedades autoinmunes: provenientes de los servicios de Reumatología y Dermatología del HNCba, ambulatorios y /o internados, con enfermedades autoinmunes en curso, con tumores de mucosa bucal, lesiones precancerosas, y otras patologías orales; pacientes que por su enfermedad en curso estuvieron recibiendo tratamientos inmunosupresores con corticoesteroides sistémicos con dosis >20 mg/día de metilprednisona y/o biológicos anti-TNF- α^g y anti-interleuquinas 12/23 u otros tratamientos terapéuticos inmunosupresores, por un período mayor a tres meses.
- Categoría D: Pacientes en unidades de cuidados intensivos: clínicos y quirúrgicos con requerimiento de cuidados críticos. Pacientes provenientes de los servicios de Unidad de Terapia Intensiva (UTI) I y Unidad de Cuidados Coronarios (UCO) y Unidad de Cuidados Intermedios (UCI) que reunieron las siguientes características:
 - Estadía mayor a los 8 días en dichas unidades.
 - En tratamiento, con antibióticos (ATB) de amplio espectro (en especial a los que se les rotan más de dos esquemas).
 - En tratamiento con corticoesteroides en dosis >20 mg/día o 1 mg/kg/día de metilprednisona.
 - Nutrición parenteral total y otras vías.

^g Anti factor de necrosis tumoral alfa.

- Pacientes inotrópicos^h.
 - Pacientes con insuficiencia respiratoria aguda y asistencia respiratoria mecánica (ARM) con dispositivos CPAP (presión positiva continua en la vía aérea) o intubados, EPOC, asma, distrés respiratorio agudo, enfisema, tromboembolismo pulmonar agudo (TEPA), traumatismo de tórax, edema pulmonar cardiogénico y no cardiogénico, etc.
 - Pacientes sépticos.
 - Postquirúrgicos en general (especialmente digestivas) con complicaciones graves.
 - Pacientes post neurocirugías.
 - Pacientes neurológicos.
 - Pacientes con insuficiencia renal aguda (IRA) o reagudizada c/sin hemodiálisis y/o diálisis intraperitoneal.
 - Pacientes post cirugías torácicas.
 - Pacientes con síndrome coronario.
 - Pacientes vasculares periféricos.
- Categoría E: Pacientes inmunocomprometidos internados clínicos y/ o quirúrgicos sin requerimiento de cuidados críticos; provenientes de las salas 3-5, 4-6, Carrillo Norte y Sur que reunieron las siguientes características:
 - Estada mayor a los 8 días en dichas unidades
 - Con antibióticoterapia de amplio espectro (en especial a los que se les rotan más de dos esquemas)
 - Nutrición parenteral y/u otras vías.
 - Enfermedades endocrinológicas (hipo e hipertiroidismo, diabetes mal compensada, etc.).
 - Infecciones respiratorias (sin ARM), con vías para ATB y otros medicamentos.

^h Pacientes bajo tratamiento con drogas inotrópicas.

- Infecciones recurrentes (vasculitis alérgicas, candidiasis oral, infecciones tracto urinario, etc.).
- Infecciones no respiratorias no recurrentes con vías para ATB y otros medicamentos.
- Post quirúrgicos en general, no críticos.
- Pacientes neurológicos y vasculares periféricos no críticos.
- Pacientes hemodializados y /o diálisis intraperitoneal con complicaciones, no críticos.

Otras variables estudiadas

- Pacientes oncológicos con localización en cabeza y cuello, en y post tratamiento (quimioterapia y/o radioterapia).
- Pacientes con candidiasis oral a repetición: aquellos que tuvieron más de tres episodios de candidiasis oral previos y recibieron tratamiento con ATF en un lapso de tiempo no mayor de un año del episodio actual (al momento del estudio).
- También se agrupó a los pacientes, de acuerdo a los aspectos clínicos de la candidiasis oral presentados; según clasificación modificada por Holmtup y Axel:²
 - a) pseudomembranosa aguda o crónica
 - b) eritematosa aguda o crónica
 - c) hiperplásica (leucoplasiforme)
 - d) secundarias: lesiones asociadas
 - e) multifocal (más de un aspecto clínico)

Registro de pacientes

De todos los pacientes que participaron en el estudio se registraron sus datos personales: edad, sexo, domicilio, servicio de procedencia; si era ambulatorio /internado, enfermedad y tratamiento actual en el momento del estudio; asimismo se solicitó de los pacientes conocer, si habían tenido al menos tres episodios de candidiasis oral tratados con ATF en un lapso de tiempo no mayor de un año del

episodio actual; se observaron y anotaron las características clínicas de la o las lesiones de candidiasis oral; toda la información se consignó en la hoja de captura de datos, donde se incluyeron además los antecedentes clínicos patológicos del paciente, tratamientos recibidos y perfil bioquímico (ver anexo I).

De acuerdo con las normativas vigentes en la provincia de Córdoba, este proyecto fue inscripto en el RePISⁱ (Ley 9694/09), cumplimentando con las exigencias y con la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Salud del HNCba. Se confeccionó un instructivo con información clara y detallada sobre el trabajo de investigación, para el paciente que participaba, y el consentimiento informado para su firma (ver anexo II).

Obtención de muestras clínicas

Se extrajeron muestras de la mucosa oral, mediante hisopado, de todos los pacientes incluidos en este estudio; se les indicó higiene previa mediante buches con agua. Tanto los pacientes ambulatorios como los internados con posibilidad de hacerlo los realizaron, excepto los de cuidados críticos que estaban impedidos. Se colocó el hisopo en tubo con solución fisiológica estéril (SF) para su transporte al laboratorio. Dicho procedimiento se realizó por duplicado.

Procesamiento de las muestras clínicas

Con las muestras obtenidas, se realizaron examen microscópico directo (EMD) en fresco y cultivos.

EMD: se colocó una gota (de uno de los hisopos embebidos en SF) entre porta y cubreobjetos. Dicho material se observó por microscopía óptica directa (MO) a 200X y 400X.; se buscó presencia de elementos levaduriformes: blastoconidios, con o sin pseudohifas.

Cultivos: se practicó con el hisopo restante, siembra por diseminación en agar Sabouraud glucosado (ASG) (Britania, Bs. As., Argentina) y Lactrimel de Borelli (L)

ⁱRegistro Provincial de Investigaciones en Salud.

⁷⁷Ambos medios con antibióticos (ATB) (solución de gentamicina 0,80 mg y ampicilina 1 g en 100 mL de agua destilada estéril), fueron incubados por un período de hasta 5 días, a 28 °C por duplicado respectivamente.

Del desarrollo obtenido en los cultivos de ASG y L se realizó una suspensión de una ansada de varias colonias levaduriformes, en SF; se resembró dicha suspensión en medio cromogénico CHROMagar Candida® a 28 °C hasta 72 h. La siembra directa en CHROMagar Candida® a partir de muestras biológicas no fue de utilidad en este estudio.

Se tomó una única colonia partir del desarrollo en el medio cromogénico y se resembró en ASG a 28 °C durante 24 h sin ATB. Con el desarrollo del nuevo repique y según el color desarrollado por las colonias en CHROMagar Candida® se prosiguió con la marcha fenotípica correspondiente (ver anexo IV).

Métodos fenotípicos para la identificación de *C. dubliniensis*

A partir del desarrollo de colonias de color verde en CHROMagar Candida® y del crecimiento obtenido en 24 h, del repique en ASG sin ATB, se estudiaron las siguientes características para identificar *C. dubliniensis* y diferenciarla de *C. albicans* (especie con la que comparte numerosas características fenotípicas):

- Capacidad de crecimiento a 42 °C en ASG
- Producción y formación de tubos germinativos, pseudohifas y clamidoconidios en agar leche en portaobjetos
- Crecimiento en medio hipersalado con NaCl al 11%
- Prueba de opacidad en medio con Tween 80
- Desarrollo y observación de características macro y micro-morfológicas en agar tabaco.
- Desarrollo y observación de características macro y micro-morfológicas en agar Pal CHROM.
- Siembra en galerías API ID 32C® para identificación definitiva de la levadura.

MATERIALES

Ver anexo V

PROCEDIMIENTO

- Capacidad de desarrollo a 42 °C: se inocularon en ASG sin ATB durante 24 h a 42 °C, un par de colonias provenientes de un repique en ASG de 24 h; se observó presencia o ausencia de crecimiento.
- Agar leche en portaobjetos: una vez sembrada la muestra obtenida de un repique en ASG reciente, mediante estría en el portaobjetos con agar leche, se colocó un cubreobjetos e incubó en cámara húmeda 3h a 37 °C. Se observó si había formación de tubos germinativos. Para la observación de pseudohifas y clamidoconidios, así como la presencia y disposición de micelio y blastoconidios, se incubó a 28 °C durante 48-72 h. En ambos casos la lectura se hizo con MO a 200X y 400X, directamente desde el portaobjetos sembrado.
- Agar NaCl al 11%: se realizó una dilución ajustando a un grado 2 de la escala Mc Farland (MF) en 2 mL de SF, a partir del repique en ASG de no más de 24h. Se tomó 1µL con pipeta automática marca Eppendorf®. Dicha alícuota se depositó sobre el agar con NaCl al 11%. La placa se incubó con la tapa hacia arriba en estufa hasta secado de la gota depositada. Posteriormente la placa se dio vuelta y se incubó durante tres días a 35-37 °C. Se observó si hubo o no crecimiento.
- Prueba de opacidad: se tomó una ansada de la colonia problema del tubo de repique en ASG de 24h y con ella se realizó un toque en círculo sobre el agar con Tween 80. Se incubó a 28 °C durante 48-72h. Se observó presencia o no de halo de opacidad alrededor de la colonia.

- Agar Tabaco: se sembraron en este medio, mediante estría profunda y en círculo, las colonias provenientes del repique en ASG de 24h. Se incubó durante 72h a 28 °C. Se observaron las características macro y micro-morfológicas de las colonias desarrolladas.
- Agar Pal CHROM: se sembró por diseminación en el medio mixto de semillas de girasol y CHROMagar, una ansada de las colonias obtenidas del desarrollo en ASG de 24h. Se incubó a 28 °C hasta 10 días. Se realizaron observaciones macro-microscópicas a los 3, 6 y 10 días.
- API ID32C®: la identificación fenotípica definitiva de los aislamientos se llevó a cabo con este micrométodo comercial. La galería consta de treinta y dos pocillos, treinta y uno de los cuales contienen componentes deshidratados: D-galactosa, cicloheximida, D-sacarosa, N-acetil-glucosamina, ácido láctico, L-arabinosa, D-celobiosa, D-rafinosa, D-maltosa, D-trehalosa, 2-cetogluconato potásico, metil- α -D-glucopiranosido, D-manitol, D-lactosa, inositol, D-sorbitol, D-xilosa, D-ribosa, glicerol, L-ramnosa, palatinosa, eritritol, D-melibiosa, glucuronato sódico, D-melecitosa, gluconato potásico, ácido levunílico, D-glucosa, L-sorbosa, glucosamina y esculina (citrato férrico). La cúpula número treinta y dos corresponde al control negativo. El procedimiento de la inoculación en las galerías, se realizó preparando una suspensión de la levadura problema a partir de un cultivo de 24 h, en 2 mL de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a un grado 2 de la escala MF. Se añadieron 250 μ L de esta suspensión a una ampolla de medio APIC®. Tras homogeneizar esta nueva suspensión se inocularon 135 μ L en cada cúpula. La incubación se realizó a 28 °C durante 48 h. Se realizó la lectura de la turbidez en forma visual y se interpretó la presencia de turbidez como positivo, comparando siempre con el control negativo. Se utilizó la tabla de identificación

del equipo y el programa informático provisto por el fabricante para la interpretación de los resultados.⁷⁵

Todos los aislamientos identificados como *C. dubliniensis* fueron corroborados y comparados con cepas conocidas de la Unidad de Micología del Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, C.A.B.A., Argentina.

Procedimientos para identificar otros hongos levaduriformes

Marcha Diagnóstica para hongos levaduriformes que desarrollaron color no verde en el CHROMagar Candida®:

A partir del desarrollo obtenido en la resiembra realizada en ASG sin ATB, incubado 24 h a 28 °C, se continuó con el algoritmo ya propuesto en el marco teórico:

- 1- Siembra en agar leche en portaobjetos
- 2- Crecimiento a 42 °C en ASG
- 3- Prueba de asimilación rápida de trehalosa
- 4- Determinación de prolina aminopeptidasa (PRO)
- 5- Prueba de urea rápida para determinar ureasa
- 6- API ID32 C®

1,2 y 6 ya fueron desarrollados.

3- Tabletas de trehalosa® (Rosco Diagnóstica A/S, DK 2630 Taastrup, Dinamarca).

Método: (según especificaciones del fabricante)

Se realizó una suspensión en tubo ajustada a un grado 2 de la escala MF, en 250 µL de SF estéril, a partir de un cultivo en ASG de no más de 24 h; a la misma se le adicionó una tableta Rosco de trehalosa® e incubó a T 35 °C. Se observó viraje del indicador de la tableta, del rojo al amarillo cuando fue positivo, antes de las 2 h para *C. glabrata*. De lo contrario, se continuó la observación de cambio de color hasta 24 h. Para informarlo como negativo no debe haber viraje del indicador.

4- Tabletas de prolina aminopeptidasa® (PRO) (Rosco Diagnóstica A/S, DK 2630 Taastrup, Dinamarca).

Método: (según especificaciones del fabricante)

Se realizó una suspensión en tubo ajustada a un grado 4 de la escala MF, en 0,25 mL de SF estéril, a partir de un cultivo reciente en ASG; a la misma se le adicionó una tableta Rosco de prolina aminopeptidasa® e incubó a 35 °C. Al cabo de 4 h se le agregaron tres gotas de reactivo aminopeptidasa y se observó si había cambio de color. Cuando fue positivo, el viraje de color se produjo del amarillo al rojo, dentro de los 5 minutos.

5- Prueba rápida de detección de ureasa (composición medio ver anexo V).⁷⁷

Método

Se colocó en un tubo de hemólisis 0,5 mL de solución A y una gota de solución B. Se colocó una ansada de colonias de levaduras, obtenidas de un cultivo con desarrollo reciente en ASG. La lectura se hizo entre 3 a 5 minutos. Viró al rojo cuando fue positivo.

Todos los resultados obtenidos en el Laboratorio de Micología de la Cátedra de Clínica Dermatológica, HNCba, fueron registrados en una planilla confeccionada para tal fin (ver anexo III).

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 una $p < 0,05$ para correlaciones del *Test t* en muestras relacionadas. La comparación entre las variables numéricas continuas y las proporciones a través del Chi cuadrado 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

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Las muestras obtenidas mediante hisopado bucal de 145 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, definidos en el capítulo de material y métodos, se procesaron y fueron confirmadas microbiológicamente en 127 casos, con el algoritmo propuesto para identificar levaduras (ver anexo IV). (Figura 7)

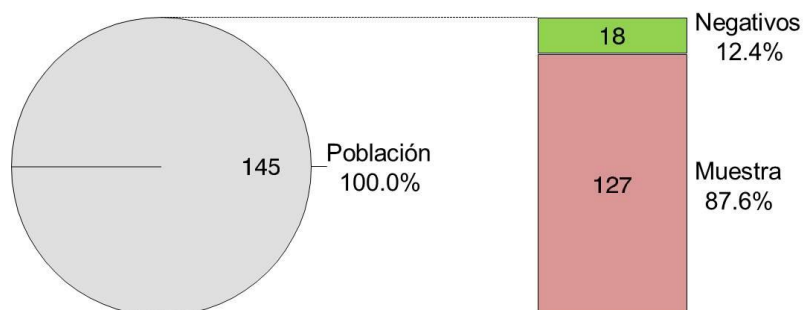


Figura 7: distribución de la población y muestra. Los valores se expresan en frecuencias y porcentajes. n=145

En primer lugar se realizaron EMD en fresco con MO a 200X y 400X, donde se observó presencia de levaduras, blastoconidios y pseudohifas. A continuación se sembró la muestra en tubos con ASG y L con ATB, por duplicado a T ambiente. Del crecimiento obtenido, se suspendió una ansada en SF estéril que se sembró en CHROMagar Candida®. Se prosiguió con la marcha diagnóstica para levaduras que desarrollaron colonias de color verde en el medio cromogénico, propuesta para diferenciar *C.dubliniensis* de *C. albicans* (tablas 2 y 3), también para las que desarrollaron otros colores (tablas 3 y 4) y para la identificación definitiva de ambos casos (tabla 5).

Tabla 2. Cuadro comparativo de las características fenotípicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* observadas con los distintos métodos ensayados.

Método	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
CHROMagar Candida®	Verde oscuro	Verde claro
Agar Sabouraud glucosado a 42°C	Escaso o crecimiento nulo	Crecimiento
Agar leche	TG, SH, clamidoconidios	TG, SH, clamidoconidios
Agar con NaCl al 11%	crecimiento nulo	Crecimiento
Agar opacidad (Tween 80)	ausencia de halo opaco alrededor de la colonia	presencia de halo opaco alrededor de la colonia
Agar tabaco	Colonia dorada u ocre rugosa, borde festoneado. Clamidoconidios abundantes	Colonia blanca o crema lisa, borde liso. Ausencia de clamidoconidios
Agar Pal CHROM	Colonia verde rugosa y borde festoneado. Clamidoconidios abundantes	Colonia verde lisa y borde liso. Ausencia de clamidoconidios

Referencias: TG: tubos germinativos; SH: pseudohifas

Tabla 3. Características fenotípicas observadas de especies *Candida* y otras levaduras no *Candida* en 150 aislamientos obtenidos de la muestra (n=127).

Género y especie	Presencia de SH	Desarrollo a 42 °C	Producción de ureasa	Color CHROMagar Candida®
<i>C. albicans</i> ¹	+	+	NO	Verde claro
<i>C. dubliniensis</i> ²	+	-	NO	Verde oscuro
<i>C. glabrata</i> ³	-	+	-	Rosa fuerte (ND)
<i>C. tropicalis</i> ⁴	+	+	-	Azul
<i>C. parapsilosis</i> ⁵	+	-	-	Blanco/rosado (ND)
<i>C. krusei</i> ⁶	+	+	V	Rosa seco
<i>C. kefyr</i> ⁷	+	+	-	Rosa claro (ND)
<i>C. guilliermondii</i> ⁸	+	-	V	Blanco (ND)
<i>C. norvegensis</i> ⁹	-	-	-	Blanco (ND)
<i>C. intermedia</i> ¹⁰	+	-	-	Blanco (ND)
<i>C. lusitanae</i> ¹¹	+	+	V	Blanco (ND)
<i>C. pararugosa</i> ¹²	+	-	-	Lila (ND)
<i>S. cerevisiae</i> ¹³	*1	-	V	Blanco/rosado (ND)
<i>Trichosporon</i> ^{*2} spp.	*2	-	+	Azul violáceo (ND)

Referencias: V: variable; ND no permite diferenciar por color; NO: no se realizó. *1EMD: células globosas y/o elongadas aisladas y en grupos; Ziehl-Neelsen: ascos y ascoporas. *2EMD: hifas verdaderas, blastoartroconidios y clamidoconidios intercalares; no se realizó asimilación con APIID32C®; no se identificó especie.

Tabla 4. Pruebas fenotípicas con tabletas de trehalosa y de prolina aminopeptidasa Rosco®.

Especies de <i>Candida</i>	Trehalosa	Prolina aminopeptidasa
<i>C. glabrata</i>	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+*	-
<i>C. tropicalis</i>	+*	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	+

Referencias: + positivo; +* positivo después de dos horas; - negativo

La identificación fenotípica definitiva de las levaduras aisladas en este estudio fue realizada mediante el método comercial API ID 32C® (tabla 5).

Tabla 5. Perfil bioquímico de asimilación de las especies de *Candida* y otras levaduras no *Candida* aisladas de candidiasis de la mucosa oral en pacientes inmunocomprometidos mediante método miniaturizado API ID 32C®

Asimilación APIID32C®																															
LE V*	GL U	GAL		S A C	NAG	L A T	ARA		C E L	RAF	M A L	TRE	2 K G	MDG	S O R	XI L	RI B	GL Y	RH A	PL E	ER Y	M EL	G RT	ML Z	G NT	LV T	MA N	LA C	IN O	SB E	GL N
1	+	+	+		V	V	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
2	+	+	+		+	-	-	-	-	+	V*	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-	+	+
3	+	-	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+		+	V	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	V	-	-	+	-	-	-	+	V	-	+	-	-	-	+
5	+	+	+		+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	V	+	-	-	V	+
6	+	-	-		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+		-	+	V	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
8	+	+	+		+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	V	-	+	-	-	+	-	-	+	+
9	+	-	-		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	V	-	+	V	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10	+	+	+		+	V	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-	-	V	+	-	-	V	+	+	V	+	+	-	+	+
11	+	+	+		+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
12*	+	+	-		-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
13	+	V	+		-	V	-	-	+	+	V	-	V	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias:1-*C. albicans*;2-*C. dubliniensis*; 3-*C. glabrata*; 4-*C. tropicalis*;5-*C. parapsilosis*;6-*C. krusei*; 7-*C. kefyr*; 8-*C. guilliermondii*;9-*C. norvegensis*;10-*C. intermedia*; 11-*C. lusitaniae*;12-*C. pararugosa*;13-*S. cerevisiae*. Lev*: levaduras *Candida* y otras levaduras no *Candida*. V: variable. V*: *C. dubliniensis* asimila trehalosa lentamente. 12*: Fue confirmada con espectrometría de masa MALDI-TOF MS® (*Bruker Daltonics Germany*).

El total de aislamientos (únicos y asociados) de especies *Candida* y levaduras no *Candida* fue 150 en el total de casos estudiados (n=127). (Figura 8, Tabla 6 y Figura 9)

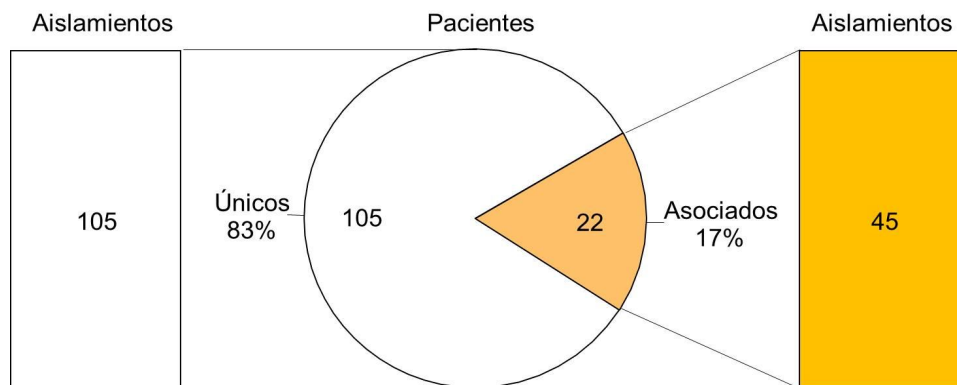
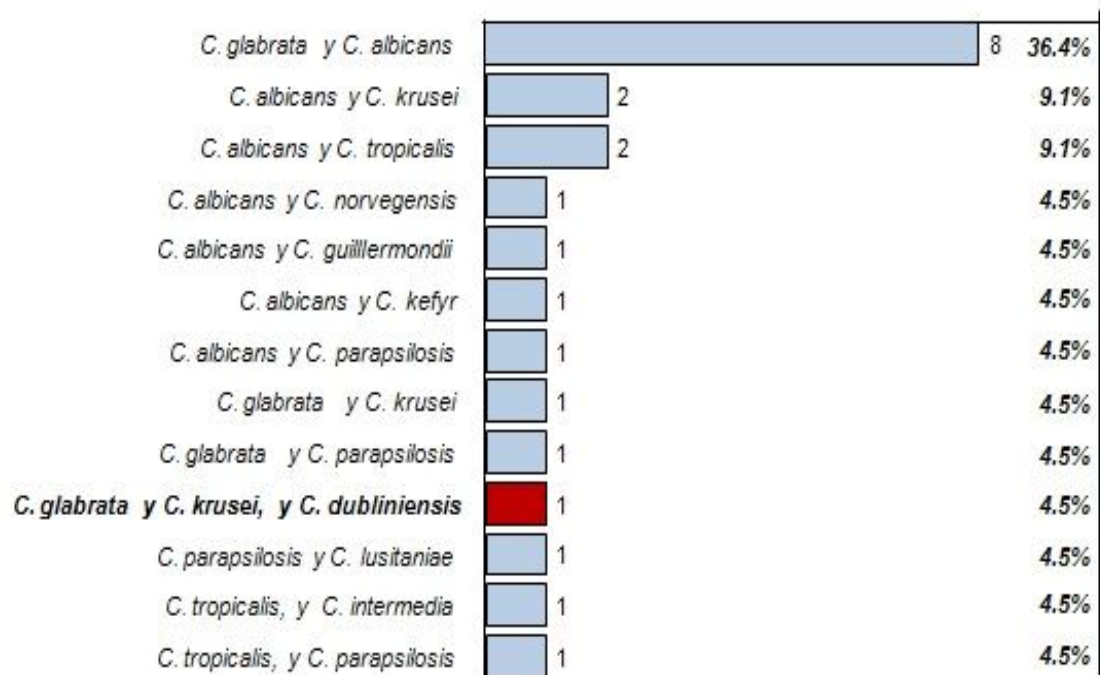


Figura 8: distribución de la muestra según tipo de aislamiento. Los valores se expresan en frecuencias y porcentajes. n=127.

Tabla 6. Frecuencias de aislamientos de especies *Candida* y otras levaduras no *Candida* aisladas en el total de casos. n=150

Especies aisladas únicas / asociadas	Frecuencia	%
<i>C. albicans</i>	78	52.0
<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	6.0
<i>C. krusei</i>	7	4.7
<i>C. guilliermondii</i>	3	2.0
<i>C. kefyr</i>	3	2.0
<i>C. intermedia</i>	2	1.3
<i>C. pararugosa</i>	1	0.7
<i>C. norvegensis</i>	1	0.7
<i>C. lusitaniae</i>	1	0.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0.7
<i>Trichosporon</i> spp.	1	0.7

Figura 9: distribución de aislamientos asociados de especies *Candida* en el total de casos analizados. Los valores se presentan en frecuencias y porcentajes. n=127



ANÁLISIS DESCRIPTIVO

El 23,6% de los pacientes de la muestra correspondió a inmunocomprometidos clínicos y/o quirúrgicos, sin requerimiento de cuidados críticos; el 22,8% fueron pacientes oncológicos (figura 10).

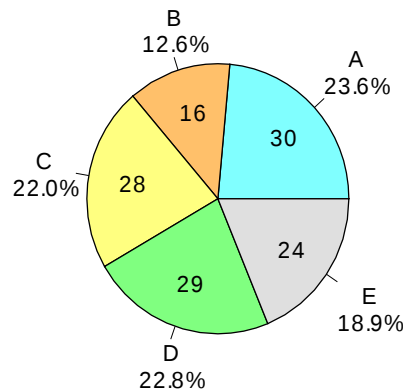


Figura 10: distribución de la muestra según patología asociada. Los valores se representan en frecuencias y porcentajes. Referencias: A: inmunocomprometidos clínicos y/o quirúrgicos, sin requerimiento de cuidados críticos. B: pacientes en unidades de cuidado intensivo: clínicos y quirúrgicos con requerimiento de cuidados críticos. C: pacientes VIH/sida. D: pacientes oncológicos. E: autoinmunes. n=127

Al analizar la muestra según la presentación clínica de la candidiasis oral puede advertirse que los mayores porcentuales correspondieron a la categoría pseudomembranosa (61,4%), seguida de las categorías multifocal y eritematosa con porcentajes bastante inferiores (15,7% y 14,2%, respectivamente) (figura 11).

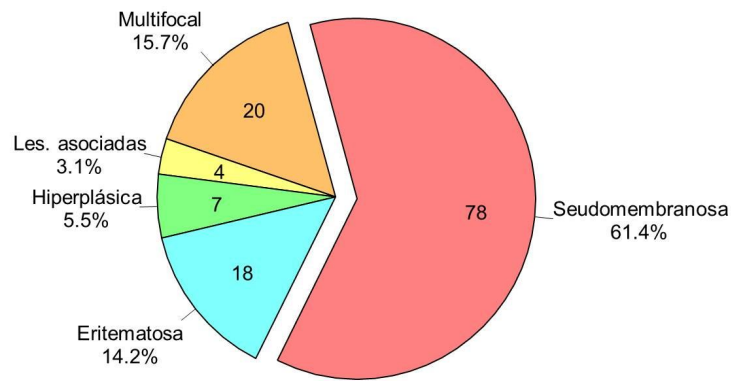


Figura 11: distribución de la muestra según presentación clínica de la candidiasis oral. Los valores se representan en frecuencias y porcentajes. Referencias: Les.: lesiones. n=127

El análisis de los pacientes con candidiasis muestra que aproximadamente el 57% de los pacientes relevados presentó candidiasis con episodios a repetición dentro del año (figura 12).

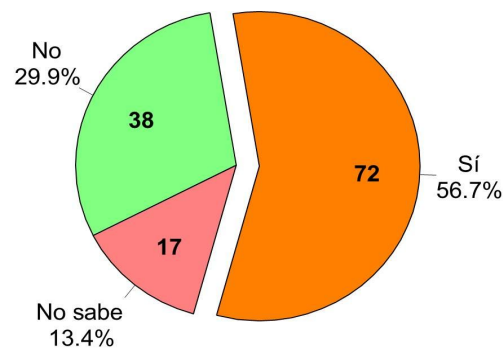


Figura 12: distribución de la muestra según candidiasis oral a repetición. Los valores se representan en frecuencias y porcentajes. n=127

Al examinar las características demográficas se discriminó la muestra según sexo y edad; la primera distribución mostró leve predominio del sexo femenino (55,1%) (figura 13).

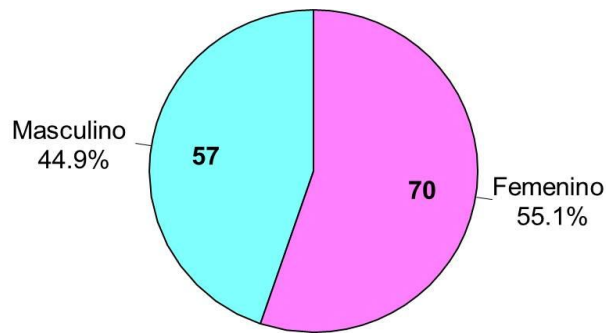


Figura 13: distribución de la muestra según sexo. Los valores se representan en frecuencias y porcentajes. n=127

La dispersión de la muestra según su edad global arrojó valores comprendidos entre los 21 y 91 años, cuya mediana (IC 95%) y media $\pm$ desvío estándar se grafican en la figura 14.

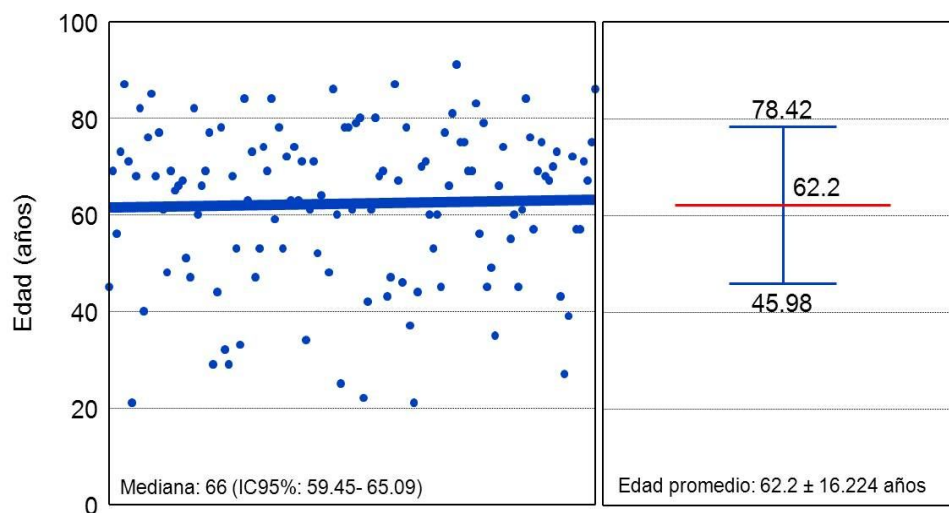


Figura 14: distribución de la muestra según edad. Los valores se representan en: dispersión de casos, mediana (IC 95%) a la izquierda; y media $\pm$ desvío estándar a la derecha. n=127

A continuación se analizó la muestra según su distribución por grupos etarios, en la figura se puede observar que prevalecieron casos entre 60 y 79 años, seguido del rango de 40 a 49 años.

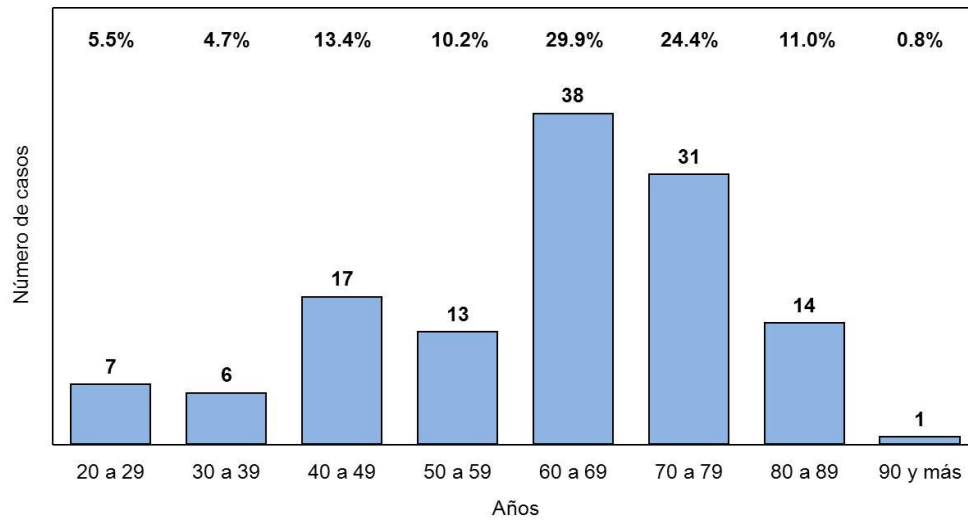


Figura 15: distribución de la muestra según grupos etarios. Los valores se representan en frecuencias y porcentajes. n=127

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

A los fines de analizar la asociación entre diferentes variables y candidiasis a repetición se eliminaron los casos dudosos de esta última variable (correspondientes a la categoría No sabe). Las Tablas de contingencia obtenidas son las siguientes:

Tabla 7. Contingencia de candidiasis a repetición según sexo (n=110)

			Sexo		Total
			Masculino	Femenino	
Candidiasis a repetición	Si	Recuento % de sexo	29	43	72
			60,4%	69,4%	65,5%
	No	Recuento % de sexo	19	19	38
			39,6%	30,6%	34,5%
Total		Recuento % de sexo	48	62	110
			100,0%	100,0%	100,0%

Prueba de Chi-cuadrado: $p=0,328$; $\chi^2= 0,956$

Como se observa en la tabla 7, si bien el porcentual de episodios a repetición fue superior en mujeres (69,4% vs. 60,4% respectivamente), no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,328$).

Tabla 8. Contingencia de pacientes con candidiasis a repetición y aislamientos de *C. dubliniensis* y otras especies de levaduras (n=110)

			Especies aisladas		Total
			C. dubliniensis	Otras	
Candidiasis a repetición	Si	Recuento % de especies	7	65	72
			77,8%	55,1%	56,7%
	No	Recuento % de especies	2	36	38
			22,2%	30,5%	29,9%
Total		Recuento % de especies	9	101	110
			100,0%	100,0%	100,0

Prueba de Chi-cuadrado: $p=0,417$; $\chi^2= 0,658$

Dentro del grupo donde la cepa aislada fue *C. dubliniensis*, casi el 78% registró candidiasis a repetición. Si bien este porcentual fue inferior en el grupo donde la

especie aislada fue otra, no existieron diferencias de significación estadística ($p=0,417$).

Tabla 9. Contingencia de patología asociada a candidiasis a repetición (n=110)

			Candidiasis a repetición		Total
			Si	No	
Patología asociada	VIH/sida	Recuento % de candidiasis	24	3	27
			33,3%	7,9%	24,5%
	Oncológicos	Recuento % de candidiasis	14	14	28
			19,4%	36,8%	25,5%
	Autoinmunes	Recuento % de candidiasis	18	2	20
			25,0%	5,3%	18,2%
	UTI/UCO	Recuento % de candidiasis	2	8	10
			2,8%	21,1%	9,1%
	Inmunocomprometidos	Recuento % de candidiasis	14	11	25
			19,4%	28,9%	22,7%
Total		Recuento % de candidiasis	72	38	110
			100,0%	100,0%	100,0

Prueba de Chi-cuadrado: $p=0,000$; $\chi^2= 24,970$

Como se desprende de la Tabla 9, el 33,3% de los pacientes registró candidiasis a repetición en el estrato VIH/sida, seguido por el 25% de pacientes con enfermedades autoinmunes. El grupo con menor cantidad de episodios de candidiasis a repetición, correspondió a pacientes oncológicos (36,8%); seguido por los pacientes inmunocomprometidos sin requerimiento de cuidados críticos (29%).

En la figura 16 se observa la distribución de casos de candidiasis a repetición oncológicas (n=14) según la localización más frecuente, cabeza y cuello el 64,3% (n=9:14).

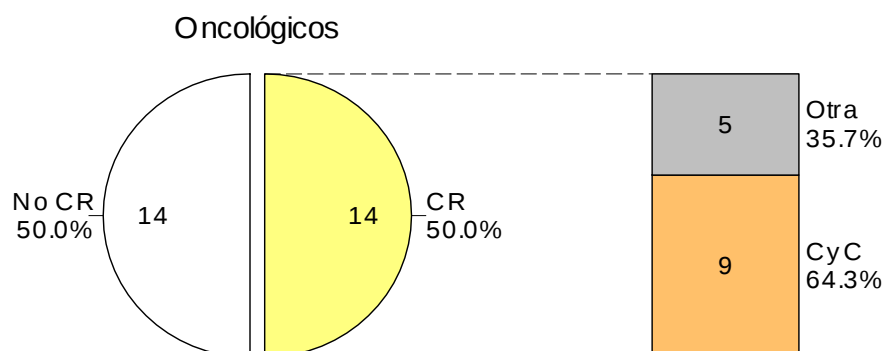


Figura 16: distribución de candidiasis a repetición, patología oncológica y localización. Los valores se representan en frecuencias y porcentajes. Referencias: CR: candidiasis a repetición; C y C: cabeza y cuello; Otra: se refiere a un caso de mieloma múltiple, dos de cáncer de estómago, uno de leucemia mieloide aguda y uno de cáncer de colon. n=28.

Tabla 10. Contingencia de las especies *C. dubliniensis* y otras aisladas según sexo (n=127)

			Sexo		Total
			Masculino	Femenino	
Especies aisladas	C. dubliniensis	Recuento % de sexo	4	5	9
			7,0%	7,1%	7,1%
	Otras	Recuento % de sexo	53	65	118
			93,0%	92,9%	92,9%
Total		Recuento % de sexo	57	70	127
			100,0%	100,0%	100,0%

Prueba de Chi-cuadrado: $p=0,978$; $\chi^2=0,001$

La proporción de pacientes según sexo, a quienes se les aisló *C. dubliniensis*, fue similar, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,978$).

En el grupo donde la cepa aislada fue *C. dubliniensis*, un 44% correspondió a pacientes HIV/sida e igual porcentaje fueron pacientes con enfermedades

autoinmunes. No hubo en este estrato pacientes en unidades de cuidado intensivos ni inmunocomprometidos sin requerimiento de cuidados críticos.

En este caso, el *Test* exacto de Fischer arrojó asociación estadísticamente significativa entre las variables ($p=0,036$). Esto implica vinculación entre especie aislada y patología asociada.

Tabla 11. Contingencia de patología asociada de los casos estudiados por especies:

C. dubliniensis y otras (n=127)

			Especies aisladas		Total
			Candida dubliniensis	otras	
Patología asociada	VIH/sida	Recuento % de especie aislada	4	24	28
			44,4%	20,3%	22,0%
	Oncológicos	Recuento % de especie aislada	1	28	28
			11,1%	23,7%	22,8%
	Autoinmunes	Recuento % de especie aislada	4	20	24
			44,4%	16,9%	18,9%
	UTI/UCO	Recuento % de especie aislada	0	16	16
			0,0%	13,6%	12,6%
	Inmunocomprometidos	Recuento % de especie aislada	0	30	30
			0,0%	25,4%	23,6%
Total		Recuento % de especie aislada	9	118	127
			100,0%	100,0%	100,0%

Test exacto de Fischer $p=0,036$

COMPARACIÓN DE MEDIAS

A fin de comparar la edad promedio según la existencia de episodios a repetición se aplicó el *Test t* de comparación de medias (tabla 12 y figura 17), se procedió de igual manera para comparar la edad en casos de *C. dubliniensis* versus otras (tabla 13 y figura 18).

Tabla 12. Edad por candidiasis a repetición (n=110)

Candidiasis a repetición	Si	No
Nº de casos	72	38
Media	58.264	68.737
Desvío estándar	16.875	13.566
Error estándar	1.989	2.201
Valor mínimo	21.0	32.0
Valor máximo	87.0	91.0
Mediana	61.0	71.0
Intervalo de Confianza 95%	54,2-62,2	64,3-73,1

Valor $p=0,0013$

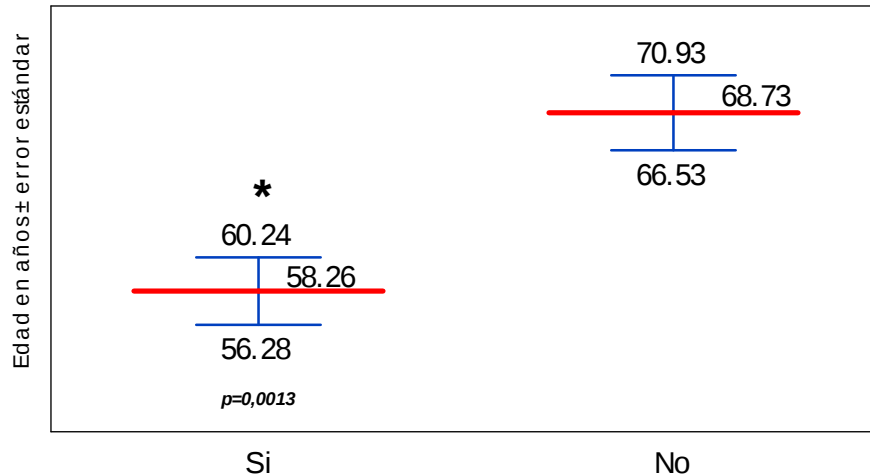


Figura 17: distribución según edad de casos con y sin candidiasis a repetición. Los valores se representan en valores promedio $\pm$ error estándar. El valor $p < 0,05$ surge de la comparación entre grupos. $n=110$

Tabla 13. Edad por especies aisladas: *Candida dubliniensis* y otras especies (n=127)

Edad	Otras	<i>C. dubliniensis</i>
N	118	9
Media	63.220	49.889
Desvío estándar	15.837	17.084
Error estándar	1.458	5.695
Mínimo	21.0	21.0
Máximo	91.0	73.0
Mediana	67.0	49.0
IC 95%	60.3-66.10	36.7-63.02

Valor $p=0,0169$

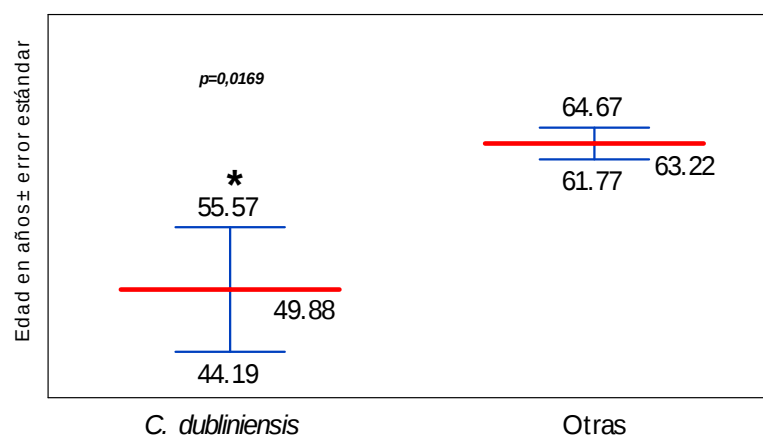


Figura 18: distribución según edad de casos con y sin *Candida dubliniensis*. Los valores se representan en valores promedio $\pm$ error estándar. El valor $p < 0,05$ surge de la comparación entre grupos. $n=127$

DISCUSIÓN

Desde su primer aislamiento y descripción en 1995 por Sullivan y col.¹ *C. dubliniensis*, ha incrementado su participación como agente causal en diferentes procesos patológicos. Desde entonces, son numerosos los artículos que han confirmado su amplia distribución en todo el mundo.^{2,16-18}

Este microorganismo está principalmente asociado a personas infectadas por el VIH/sida y candidiasis oral recurrente; también se ha descrito, aunque en menor proporción, en individuos sanos y pacientes sin VIH pero con enfermedades como la diabetes y el cáncer.⁸⁸⁻⁹¹

Respecto a su nicho anatómico, *C. dubliniensis* se ha aislado en diversas localizaciones del cuerpo humano, tanto en pacientes infectados por el VIH/sida como en individuos sanos, incluyendo: cavidad oral, tracto respiratorio, sangre, sistema nervioso central, vagina y piel.^{27,39-43}

En nuestra investigación elegimos como nicho la mucosa oral de pacientes inmunocomprometidos con clínica de candidiasis oral. En concordancia con lo hallado por otros autores, el grupo más susceptible y con más aislamientos de *C. dubliniensis*, fue el de pacientes VIH/sida, con cuatro aislamientos (con recuentos de CD4+ $\leq 200/\mu\text{L}$), igual que en los autoimunes. Se obtuvo también, un solo aislamiento de *C. dubliniensis* en un paciente oncológico (paciente con leucemia). Dentro del grupo de pacientes oncológicos en y post tratamiento oncológico, el grupo con localización en cabeza y cuello no registró aislamientos de la levadura en cuestión; sin embargo muchos autores afirman haberla aislado en estos pacientes.⁹²

La existencia de aislamientos de *C. dubliniensis* resistentes a algunos antifúngicos, como el fluconazol o la 5-fluorocitosina, determina que sea necesario realizar una correcta identificación de esta especie para evitar un mal manejo de la infección, disminuyendo el riesgo de mortalidad del paciente.^{24,75}

C. dubliniensis crece fácilmente en ASG a 30-37 °C, desarrollando colonias de color blanco cremoso similares a las de *C. albicans*, por ello la identificación eficaz de cepas de la primera suele ser difícil, dado que *C. dubliniensis* y *C. albicans* son especies que comparten características fenotípicas y genotípicas. Sin embargo, las técnicas para discriminar entre estas dos especies, estrechamente relacionadas, se basan en las características fenotípicas, inmunológicas y genotípicas.⁷¹

Las pruebas fenotípicas son las más utilizadas e incluyen métodos de diagnóstico presuntivo como: el estudio de la capacidad para crecer a ≥ 42 °C, el análisis del aspecto del color de las colonias en los medios cromogénicos, la capacidad de formar tubos germinativos, pseudohifas y clamidoconidios, en determinadas condiciones y medios, y de asimilar nutrientes hidrocarbonados y nitrogenados.

La incapacidad de *C. dubliniensis* para crecer a temperaturas más elevadas (42 °C a 45 °C) es una de las pruebas fenotípicas comúnmente utilizada para discriminar entre esta especie y *C. albicans*.⁹³ Sin embargo, varios autores han descrito que ciertos aislamientos de *C. albicans* (entre el 1% y el 23%), no son capaces de crecer a estas temperaturas,^{94,95,96} mientras que otros notificaron que *C. dubliniensis* es capaz de crecer a 42 °C en un 66% de los casos⁹⁷ y débilmente a 45 °C, en un 10% de los casos²¹. En nuestro caso ninguno de los aislamientos de *C. dubliniensis* fue capaz de crecer a 42 °C. No obstante dada la baja sensibilidad de esta prueba para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, no consideramos que este aspecto fenotípico fuera lo suficientemente concluyente como para poder determinar la especie de estos aislamientos atípicos.

Bajo ciertas condiciones, *C. dubliniensis* puede producir tubos germinales, pseudohifas y clamidoconidios de una manera similar a *C. albicans*. La capacidad para formar tubos germinativos es un método simple, eficiente y económico para la identificación de *C. albicans*. Como también publican otros autores, demostramos que la utilización de agar-leche y temperaturas de 37 °C, fueron condiciones favorables para inducir la

formación de tubos germinativos, en aproximadamente entre el 95% y el 97% de los aislamientos de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.^{71,89,90}

Otro rasgo fenotípico que comparten *C. albicans* y *C. dubliniensis* es la producción de clamidoconidios. Si bien hay diferencias en su disposición en la hifa, no es tan claro como para diferenciar entre ambas especies. Se han propuesto diferentes medios de cultivo tales como agar Staib,⁵⁶ agar Pal,^{89,99} agar de harina de maíz o agar de caseína, que se han desarrollado para estimular la formación de clamidoconidios en *C. dubliniensis* con una elevada eficiencia. Sin embargo, varios autores han descrito su preocupación por la baja sensibilidad de estos medios para la formación de clamidoconidios, más aún cuando se utilizan como única prueba de identificación de *C. dubliniensis*.^{83,84}

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo medio de cultivo elaborado a partir de tabaco de pipa o cigarrillos que permite diferenciar entre aislamientos de

C. dubliniensis y *C. albicans*, por sus características macro-micromorfológicas.

C. dubliniensis es capaz de producir abundantes clamidoconidios, con colonias de aspecto ocre y rugoso, mientras que *C. albicans* crece sin cambiar su macro-micromorfología.⁸¹ También otros autores^{78,83} probaron el agregado de CHROM al agar Pal mejorando su *performance*. Este medio permite observar desarrollo de clamidoconidios patrimonio de *C. dubliniensis* desarrollando colonias de color verde azulado oscuro característico y de aspecto rugoso, a diferencia del verde claro, liso y brillante que desarrolla *C. albicans*. La eficacia de este medio, según sus autores, presenta una sensibilidad del 96,2%. Tanto el agar tabaco como el Pal CHROM resultaron óptimos para la identificación y diferenciación de *C. dubliniensis* de

C. albicans en los aislamientos clínicos; no registraron inconvenientes a la hora de su lectura, resultando 100% específicos para diferenciar entre estas especies. Esto fue verificado por Raut y col.,¹⁰⁰ como ya se mencionó en el marco teórico, la producción de clamidoconidios es un proceso morfogenético que se induce en medios de cultivos

pobres, condiciones de limitación de oxígeno, bajas temperaturas y depende de una variedad de genes.

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 posee esterases y lo forma.⁸⁰

En nuestro estudio algunas cepas de *C. albicans* no lo hicieron (aproximadamente el 10%) a diferencia de lo publicado (13%);⁸² pero si coincidimos con los resultados de Slifkin⁸⁰ quien no registró actividad lipolítica en el 100% de las cepas de *C. dubliniensis* evaluadas.

Respecto al medio hipersalado con NaCl al 11%,⁷⁹ empleado en este estudio, los resultados fueron los esperados, ya que no se obtuvo crecimiento en ninguna de las 9 cepas identificadas como *C. dubliniensis* y en el caso de *C. albicans* solo un muy pequeño número (5%) experimentó un débil crecimiento; Camacho y col. obtuvieron un 21% de crecimientos pobres o negativos de *C. albicans*, pero cabe destacar que emplearon una concentración de NaCl al 6,5% en el agar.⁸² Sin embargo, autores como Akgul y col. en 2009 encontraron que este medio es 100% específico para demostrar presencia de *C. dubliniensis*.¹⁰¹

En definitiva es importante destacar que el uso de un único método no garantiza resultados confiables y que al menos deben usarse cuatro métodos fenotípicos para diferenciar ambas especies; de allí que el algoritmo utilizado en esta investigación contemple este postulado (ver anexo IV).

Las cepas de *Candida* son capaces de asimilar diversos compuestos hidrocarbonados y nitrogenados. Las variaciones en el perfil de utilización de hidratos de carbono pueden utilizarse para diferenciar *C. dubliniensis*. La realización de la prueba comercial API ID 32C®, para identificación fenotípica definitiva, reveló los perfiles numéricos correspondientes para las 9 cepas de *C. dubliniensis*, coincidentes con lo descrito por Cardenes-Perera y col. ,¹⁰² y Moran y col.⁴²

La mayoría de las cepas de *C. dubliniensis* no asimilan metil- α -D-glucósido, lactato, trehalosa o xilosa, en cambio, si lo hace *C. albicans*. Este método comercial (API ID 32C®) basado en 29 pruebas de asimilación, de alta especificidad, diagnostica correctamente el 96% de *C. dubliniensis*.^{102,103}

En nuestra investigación, con 150 aislamientos obtenidos de la mucosa oral con candidiasis oral confirmada clínica y microbiológicamente en 127 pacientes, 87 cepas crecieron como colonias verdes en CHROMagar Candida®, y se identificaron 78

C. albicans, 9 *C. dubliniensis* y 61 cepas fueron identificadas como otras especies *Candida* y 2 como levaduras no *Candida*. Si bien en este estudio se investigó prevalencia de *C. dubliniensis* en mucosa oral de pacientes inmunocomprometidos con clínica de candidiasis oral, y sin tratamiento en curso de ATF, también fueron identificadas otras especies del género *Candida*. La especie de *Candida* más aislada, después de *C. albicans*, fue *C. tropicalis* (n=20), seguida por *C. glabrata* (n=13); esto concuerda con lo descrito por otros autores.² Otras especies aisladas además de las mencionadas fueron: *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. pararugosa*, *C. lusitaniae*, *C. intermedia*, *C. kefyr*, y otras levaduras no *Candida*. Las dos levaduras no *Candida* aisladas fueron *Saccharomyces cerevisiae* de un paciente con linfoma y *Trichosporon* spp. de una paciente diabética internada, esta última no fue identificada a nivel de especie.

Un hallazgo para mencionar fue el aislamiento *C. pararugosa*, de un paciente con mieloma múltiple y candidiasis de la mucosa oral a repetición. Este hallazgo fue muy importante porque encontramos en la bibliografía analizada sólo un caso clínico de candidiasis oral por *C. pararugosa*.¹⁰⁴

Esta levadura fue identificada por espectrometría de masa MALDI-TOF MS® (Bruker Daltonics Germany), porque no existe en la base de datos del API ID 32C®.

El 52% (n=78) de los aislamientos correspondió a la especie *C. albicans*, quien colonizó sola y/o asociada otras especies. En este estudio, el 83% correspondió a

aislamientos únicos y el 17% a asociados, esta última muy habitual en la localización estudiada. La asociación más frecuente correspondió al binomio

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. Hubo un único triple aislamiento de *C. dubliniensis* y dos especies más: *C. krusei* y *C. glabrata*, en un paciente VIH/sida con LT CD4+ ≤ 200 μ L. En este estudio no se registraron otros aislamientos mixtos entre *C. dubliniensis* con otras especies como se ha descrito, especialmente en pacientes VIH/sida.^{2,28,48}

Con respecto a los medios cromogénicos que nos permitieron diferenciar en este estudio entre colonias verdes y no verdes, su utilización amerita algunos comentarios.

El medio cromogénico comercial utilizado para la identificación presuntiva y la diferenciación de las especies de *Candida* en aislamientos mixtos y únicos fue CHROMagar Candida®. En este medio las colonias de *C. dubliniensis* desarrollan un característico color verde oscuro mientras que las de *C. albicans*, son de color verde claro.^{105,106}

Sin embargo, algunas colonias de *C. dubliniensis* mostraron diferentes tonalidades de color verde que imposibilitaron su alineamiento con el patrón de referencia. En la literatura revisada están descritos algunos aislamientos de *C. dubliniensis* cuya tonalidad de verde no permite distinguirlos de *C. albicans*.¹⁰⁷ Por este motivo, algunos autores se muestran críticos con la especificidad de este medio para discriminar entre ambas especies de *Candida*.¹⁰⁸

Incluso Odds y Davidson¹⁰⁹ han descrito que algunos aislamientos de *C. albicans* eran capaces de desarrollar colonias de color rosa en el medio CHROMagar Candida®.

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 altos niveles de proteinasa y su gran capacidad de formar adherencias, tanto en células epiteliales de la mucosa oral como en prótesis orales.¹¹⁰

La clasificación clínica de la candidiasis oral que seguimos en esta investigación fue la de Hoslmüt y Axel modificada.² La más frecuente fue la pseudomembranosa (61,4%), seguida de las multifocal y eritematosa con porcentajes bastante inferiores (15,7% y 14,2%, respectivamente). La forma pseudomembranosa, si bien es la de presentación más frecuente, se ve fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos quienes fueron elegidos para este estudio. Fue en esta forma clínica donde más se aisló *C. dubliniensis* con cuatro (45%) casos, seguida con tres (33%) en la multifocal y dos (22%) en la forma eritematosa. No hubo recuperación de esta levadura en las otras formas de presentación clínica.

Las variables edad y sexo con respecto a la frecuencia de distribución de especies *Candida* no ofrecieron una información relevante. El sexo femenino (55,1%) predominó ligeramente respecto al masculino (49,1%); y el grupo etario más afectado fue entre 60 y 79 años, con una edad promedio de 62,2 años de edad. La distribución de

C. dubliniensis según sexo en la muestra (n=127), también fue casi similar (femenino 7,1% vs. masculino 7,0%). En realidad, no hay trabajos que demuestren que estos factores epidemiológicos sean importantes en la prevalencia de *C. dubliniensis*.

El ligero predominio femenino se explicaría por el hecho ya conocido, de que son las mujeres quienes más concurren a los centros de salud; el grupo etario está muy influenciado por el tipo de público que asiste al Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba, ya que dicho nosocomio tiene convenio con una obra social nacional (Programa de Atención Médica Integral - Instituto Nacional de Servicios Sociales para Jubilados y Pensionados, PAMI-INSSJP). En cambio el cálculo de la media de edad vs especies *C. dubliniensis* aisladas, fue de casi 50 años; existe una mayor amplitud del intervalo correspondiente a la media del grupo donde la cepa aislada es

C. dubliniensis, debido en parte a los pocos casos que caen en este grupo. Este valor que es más bajo que el promedio de edad general (62,2 años), puede estar también influenciada por el hecho de que los pacientes con patologías asociadas con mayor

cantidad de estos aislamientos, fueron los grupos HIV/sida y pacientes autoinmunes, Estas enfermedades se caracterizan en general por afectar personas adultas jóvenes. Se aisló *C. dubliniensis* en el 44% de pacientes HIV/sida e igual porcentaje correspondió a pacientes con enfermedades autoinmunes. No hubo en este estrato pacientes en unidades de cuidado intensivos ni inmunocomprometidos. Esto implica que hay relación entre la especie *C. dubliniensis* aislada y la patología asociada.¹¹¹⁻¹¹³

Respecto a las recidivas, en este trabajo definidas como más de tres episodios de candidiasis oral tratados con ATF en un lapso de tiempo no mayor de un año del episodio actual, se halló que el 57% del total de pacientes (n=127) padecieron candidiasis oral recidivante; un 30% no la padeció y un pequeño grupo (13%) ignoraba si lo había tenido; especialmente aconteció esto último, entre los pacientes internados en UTI y UCO; en estos casos quienes aportaban dicha información y firmaban el consentimiento, eran los familiares. La media de edad calculada para el paciente (n=72) que manifestó haber tenido episodios de candidiasis a repetición fue 58,26 años de edad, vs. 68,73 años en el grupo que no los tuvo (n=38); si bien estos valores difieren significativamente, hay que tener en cuenta que el número de pacientes para cada grupo es muy diferente. Los 7:9 (78%) aislamientos de *C. dubliniensis* correspondieron a pacientes con recidivas.

El sexo predominante, en episodios a repetición, fue ligeramente superior en mujeres respecto a los varones (69,4% vs. 60,4%, respectivamente). Así mismo también se observó que el 33,3% de los pacientes que registró candidiasis a repetición correspondieron al estrato VIH/sida, seguido por el 25% de pacientes con enfermedades autoinmunes. En el grupo de pacientes oncológicos (n=28) el 50% registró episodios a repetición, dentro de este grupo se estudió qué localización presentó más episodios; la más prevalente fue cabeza y cuello con 9 (64,3%) casos seguida de dos casos con cáncer de estómago, lo llamativo fue que en éstos también se documentaron episodios frecuentes de candidiasis esofágica. Dato oncológico que concuerda con el de diversos autores.^{90,114-116}

CONCLUSIONES

- En la muestra de 127 casos correspondientes a pacientes inmunocomprometidos, con candidiasis oral sin tratamiento con ATF en curso, confirmados clínica y microbiológicamente, se confirmó en 9 casos la presencia de la levadura *C. dubliniensis* como agente casual.
- Con la marcha fenotípica, propuesta en este trabajo, se identificaron 150 aislamientos en los 127 casos correspondiendo el 6% a *C. dubliniensis* y el 52% *C. albicans*, y el resto fueron identificadas como otras especies *Candida* y como levaduras no *Candida*. Entre las especies aisladas más frecuentes después de *C. albicans* fueron: *C. tropicalis* y *C. glabrata*.
- El 17% de los aislamientos fueron asociados y el 83% únicos. Las asociaciones son habituales en la localización estudiada. La más frecuente correspondió a *C. albicans*-*C. glabrata* con, seguida por *C. albicans*-*C. tropicalis*, y *C. albicans*-*C. krusei*. *C. dubliniensis* es un microorganismo que se aísla frecuentemente de cultivos mixtos y en este trabajo hubo un único triple aislamiento conjuntamente con las especies *C. krusei* y *C. glabrata*.
- Las cepas de *C. dubliniensis* fueron aisladas principalmente de los grupos de pacientes VIH/sida y con enfermedades autoinmunes. Esto último constituye un hallazgo de importancia dentro de la población en estudio y de alto impacto epidemiológico para nuestro hospital, ya que no lo hallamos descrito en la literatura.
- El 78% de las cepas de *C. dubliniensis* fueron aisladas de pacientes con candidiasis oral a repetición.
- En el total de pacientes las formas clínicas más frecuente fueron las pseudomembranosas, seguida de las multifocales y eritematosas. Las cepas de *C. dubliniensis* aisladas estuvieron vinculadas, cuatro casos a la forma pseudomembranosa, tres a las multifocales y dos a la eritematosa.

- Con respecto a las variables edad y sexo, referidas al total de pacientes no arrojó resultados significativos. Respecto a pacientes con *C. dubliniensis*, la edad promedio fue significativamente menor con respecto a los otros aislamientos. Esto seguramente porque los pacientes más afectados fueron los que presentaron VIH/sida y enfermedades autoinmunes, en su mayoría jóvenes y adultos jóvenes.
- Por último, recomendamos para diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*, debido a que comparte características fenotípicas, el algoritmo aquí propuesto para aislar e identificar correctamente *C. dubliniensis*. Exhortamos utilizar al menos cuatro pruebas de la marcha fenotípica propuesta para identificar levaduras. En el caso de aislamientos atípicos de esta especie, que aquí no se obtuvieron, es conveniente recurrir a técnicas de biología molecular para una correcta identificación.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Coronado-Castellote L, Jiménez Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. Review. *Journal section: Oral Medicine and Pathology. J ClinExp Dent* 2013; 5:279-86.
3. Scherer S, Stevens DA. A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc Natl AcadSci USA* 1988; 85:1452-1456.
4. Sullivan D, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulcahy F, et al. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2124-2133.
5. Odds, FC. *Candida* infections: An overview. *Crit Rev Microbiol* 1987; 15:1-5.
6. Schauer F, Hanschke R. Taxonomy and ecology of the genus *Candida*. *Mycoses* 1999; 42:12-21.
7. 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.
8. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms, proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1990; 87:4576–4579.
9. Whittaker, RH. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 1969; 163:150–160.
10. Cavalier-Smith, T. A revised six-kingdoms of life. *Biol Rev* 1998; 73:203-266.
11. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, et al. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J Eukaryot Microbiol* 2000; 52:399–451.
12. Cavalier-Smith, T. Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Phil Tans R Soc B* 2010; 365:111-132.
13. Cavalier-Smith, T. Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Louksozoa, Sulcozoa and Choanozoa. *Eur J Protistol* 2013; 49:115–178.
14. Guarro, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30:33-9.
15. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. Fifth edition. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2010.
16. Loreto ES, Scheid LA, Nogueira CW, Zeni G, Santurio JM, Alves SH. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia* 2010; 169:431-43.
17. Alves SH, Milan EP, Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K, Oliveira LO, et al. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 20012; 39:165-168.
18. Brandt ME, Harrison LH, Pass M, Sofair AN, Huie S, Li RK, et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg Infect Dis* 2000; 6:46-49.
19. Reiss E, Shadomy HJ, Marshall GL III. Part Three. Chapter 2: Systemic Mycoses Caused by Opportunistic Yeasts and Pneumocystis. *Fundamental Medical Mycology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012, pp 257, 258, 264, 267, 268, 273–280.

20. Jansons VK, Nickerson WJ. Chemical composition of chlamydospores of *Candida albicans*. J Bacteriol 1970; 104:922-932.
21. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J Clin Microbiol 1998; 36:329-334.
22. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, et al. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. Genome Res 2009; 19:2231-2244.
23. Moran G, Stokes C, Thewes S, Hube B, Coleman DC, Sullivan D. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA. Microbiology 2004; 150:3363-3382.
24. Coleman DC, Moran GP, McManus BA, Sullivan DJ. Mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida dubliniensis*. Review. Future Microbiol 2010; 5:935-949.
25. Bosco-Borgeat ME, Taverna CG, Córdoba S, Isla MG, Murisengo OA, Szusz W, Vivot W, Davel G. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia in Argentina: identification by novel multiplex PCR and comparison of different phenotypic methods. Mycopathology 2011; 172:407-414.
26. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. FEMS Microbiol Lett 2005; 253:9-17.
27. Meis JFGM, Ruhnke M, De Pauw BE, Odds FC, Siegert W and Verweij PE. *Candida dubliniensis* Candidemia in Patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. Emerging Infectious Diseases 1999; 5:150-153.
28. Aguirre-Urizar, JM. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol 2002; 19:17-21.
29. Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, Sordelli N, Malzone MC, Pola SJ, Lovannitti CA, Rosa AC. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. Oral Microbiol Immunol 2008; 23:505-509.
30. 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.
31. Khlif M, Sellami A, Sellami H, Makni F, Ayadi A. *Candida dubliniensis*: Identification methods and epidemiologic implication. Pathol Biol (Paris) 2011; 59:166-72.
32. Paugam A, Baixench MT, Viguié C. An update on *Candida dubliniensis*. Med Mal Infect 2008; 38:1-7.
33. Anane S, Kallel K, Kaouech E, Belhaj S, Chaker E. *Candida dubliniensis*: une nouvelle espèce émergente. Ann Biol Clin (Paris) 2007; 65:13-9.
34. Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. J Basic Microbiol 2002; 42:207-27.
35. Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Mühlischlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-infected individuals. Crit Rev Microbiol 2000; 26:59-68.
36. Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. J Clin Microbiol 2003; 4:1838-1842.
37. 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.
38. Odds FC. Ecology of *Candida* and epidemiology of candidosis. In *Candida* and Candidosis: A Review and Bibliography. 2nd ed. In: Odds FC, Ed. Paris Balliere Tindall, 1988, pp 88-89.
39. Ryosuke T, Yasutaka O, Hidekazu M, Hirotaka H, Takashi N, Shunji K, Tsuyoshi M. *Candida dubliniensis* Isolated from the Sputum of a Patient with end-stage. Liver Cirrhosis. Intern Med (Tokyo, Japan) 2007; 46:597-600.
40. 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.

41. Hartung de Capriles C, Mata-Essayag S, Pérez C, Colella MT, Roselló A, Olaizola C, Abate SM. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycopathologia* 2005; 160:227-34.
42. 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; 41:617-623.
43. Khan ZU, Ahmad S, Joseph L, Chandy R. *Candida dubliniensis*: An Appraisal of Its Clinical Significance as a Bloodstream Pathogen. *PLoS One* 2012; 7:1-6.
44. Sánchez-Vargas OL, Pérez-Ríos P, Romo-García J, Corona-Izquierdo PF, Hidalgo-Perena HO, Franco Martínez F. Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal VIH positivos y VIH negativos. *Rev IberoamMicol* 2002; 19:155-160.
45. 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.
46. Rivero-Román A, et al. Capítulo 3: Infecciones fúngicas en pacientes infectados por el VIH. Sección de enfermedades infecciosas. Córdoba. España: Pfizer SA Ed. TAFICS SL, 2008, pp 53-63.
47. Quesada-Gómez C, Murilo-Hidalgo L, Ureña-Varela M, Vargas-Monges E. *Candida dubliniensis*: caracterización, diagnóstico, importancia en pacientes inmunocomprometidos y diferenciación de *C. albicans*. *Rev Med Costa Rica y Centroam* 2007; LXIV:43-48.
48. Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Kelley JI, Baqui AAMA, Meiller TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *J ClinMicrobiol* 1999; 37:1464–1468.
49. Scully C, El-Kabir M, Lakshman-Samaranayake P. *Candida* and Oral Candidosis: A Review. *Crit Reviews Oral Biol Med* 1994; 5:125-157.
50. Rodríguez-Ortega J, Miranda-Tarragó J, Morejón-Lugones H, Santana-Garay JC. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. *Rev Cubana Estomatol* 2002; 39:187-233.
51. 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*. *EnfermInfeccMicrobiolClin* 2011; 29:660–665.
52. Brand, A. Hyphal Growth in Human Fungal Pathogens and its Role Virulence. Review. *Int J Microbiol* 2012; 2012:517-529.
53. 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.
54. Guillarte C, Pardi G. Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana* 2009; 47:1-7.
55. Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 2003; 149:3629-3637.
56. Staib P, Morschhauser J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*-an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 2007; 50:1-12.
57. Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 1985; 230:666-669.
58. Porterla MB, Souza PR, Abreu CM, Bertolini M, Holandini C, et al. Effect of serine-type protease of *Candida spp.* Isolated from linbear gingival erythema of HIV-positive children: critical factors in the colonization. *J Oral Pathol Med* 2010; 39:753-760.
59. Pomes R, Gil C, Nombela C. Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. *J Gen Microbiol* 1985; 131:2107-2113.

60. Winner HJ, Hurley R. *Candida albicans*. Londres: Churchill, 1964.
61. Rosen von Rosenstein, N. Underrattelse om Barmes Sjukdomar och Deras Botemedel. Estocolmo: Wenneberg & Nordstrom, 1771.
62. Underwood, M. A treatise on the disease of children. London: J Mathews, 1784.
63. Roux G, Linossier G. Reserches morphologiques sur le champignon du muguet. Arch Med Exp Anat Pathol 1890; 2:62-87.
64. Véron, P. Memoire sur le Muguet. Arch Gen Med 1835; 8:466.
65. Langenbeck, B. Auffindung von Pelzen aus der Schleimhaut der Speiseröhre einer Typhus Leiche. Neue Nat Gebr Natur-u-Heik (Froriep) 1839; 12:145-147.
66. Gruby, D. Recherches anatomiques sur une plante éryptogame qui constitue le vrai muguet des enfants. C R AcadSci (Paris) 1842; 14:634-636.
67. Berg, F. Om torsk hos Barn. Stockholm: L J Hjerta, 1846.
68. Robin, C. Histoire Naturelle des Vegetaux. Parasites qui croissent-sur l'homme et sur les animaux vivants. Paris, Bailliere: New York: J.-B. Ballière, 1853.
69. Trousseau, A. Lectures on Clinical Medicine, delivered at the Hotel-Dieu, Paris. London: Trans by Cormack JR (ed) from 1868 ed. New Sydenham Society, 1896.
70. Parrot, J. Clinique des nouvea-nés. L'athrepsie. Lecons recueillies par le Dr. Troisier. Paris. Paris: G Massoonet, 1877.
71. Sullivan DJ, Coleman D. Minireview: *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. J Clin Microbiol 1995; 36:329-334.
72. Sullivan DJ, Henmans MC, Moran GI, O'Neill LO, Bennett DE, et al. Review article: molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. J Med Microbiol 1996; 44: 399-408.
73. 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.
74. 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.
75. Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral Diseases 2014; 20:329-344.
76. Ellis R, Kock JL, Pohl CH. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*? Mycoses 2011; 54:1-16.
77. Koneman EW, Roberts GD. Micología: práctica de laboratorio. 3ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1987.
78. Sahand IH, Moragues MD, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindós G, Pontón J. Supplementation of CHROM agar *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2005; 43:5768-70.
79. 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. Palais Rouge, Buenos Aires, Argentina: Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. 2012.
80. Slifkin, M. Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. J Clin Microbiol 2000; 38:4626-8.
81. 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.

82. Camacho LD, Mata ES, Pardi G, Pineda V, Roselló A, Collela MT. Evaluación de métodos fenotípicos para la diferenciación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*. *Kasmera* 2012; 40:47–58.
83. Al MA, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J ClinMicrobiol* 2003; 41:4787-4789.
84. Al MA, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and Caffeic acid-ferric citrate agar. *J ClinMicrobiol* 2001; 39:323-327.
85. Fernandez A, Jewtuchowicz VM, Malzone MC, Lopez Daneri G, Saa G, Iovannitti CA, Tokumoto M, Mujica MT. Phenotypic and genotypic characterization of *Candida dubliniensis* isolate in a patient with disseminated candidiasis. *Mycoses* 2011; 54:602–605.
86. Gadea I, Cuenca-Estrella M. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos; MICOMED, GESITRA, SEIMC. *EnfermInfeccMicrobiolClin* 2004; 22:32-9.
87. Elpoal ANB, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11:172-198.
88. Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al 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.
89. Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnelly S, Salkin IF, Coleman DC. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J ClinMicrobiol* 2000; 38:170-174.
90. Sebt A, Kiehn TE, Perlin D, Chaturvedi V, Wong M, Doney A, et al. *Candida dubliniensis* at a cancer center. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1034-1038.
91. Sanchez VI, Ortiz LN, Villar M, Moragues Md, Aguirre JM, Quindos GP. Prevalence microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolated colonizing or infecting Mexican HIV /AIDS patients and healthy persons. *Rev IberoamMicol* 2005; 22:83-92.
92. Redding SW, Bailey CW, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Fothergill AW, Rinaldi MG, Patterson TF. *Candida dubliniensis* in radiation-induced oropharyngeal candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:659-62.
93. Coleman D, Sullivan D, Harrington B, Haynes K, Henman M, Shanley D, 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.
94. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J ClinMicrobiol* 1998; 36:2093-2095.
95. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, 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 ClinMicrobiol* 1999; 37:3804-3808.
96. Kurzai O, Korting HC, Harmsen D, Bautsch W, Molitor M, Frosch M, et al. Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. *J Mol Med (Berl)* 2000; 78:521-529.
97. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. 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.
98. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* 1997; 11:557-567.
99. 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.

100. Raut SH, Varaiya A. Differentiation of *Candida dubliniensis* on CHROMagar and Pal's agar. Indian J Med Microbiol 2009; 27:55-58.
101. Akgul O, Cerikcioglu N. Hypertonic Sabouraud dextrosa agar as a substrate for differentiation of *Candida dubliniensis*. Mycopathology 2009; 167:357-359.
102. Cardenes-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.
103. 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.
104. Giammanco GM, Melilli D, Pizzo G. *Candida parapsilosis* isolation from the oral cavity of an Italian denture wearer. Res Microbiol 2004; 155:571-4.
105. Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMagar Candida for presumptive identification of clinically important *Candida* species. DiagnMicrobiol Infect Dis 1998; 32:201-4.
106. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J ClinMicrobiol 1994; 32:1923-1929.
107. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. J ClinMicrobiol 2000; 38:1599-1608.
108. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. J ClinMicrobiol 1999; 37:3533-3539.
109. Odds FC, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar Candida. DiagnMicrobiol Infect Dis 2000; 38:147-150.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. Ángel N, Echeverry N, Restrepo P, González L, Rodríguez L, Vásquez G. Manifestaciones bucales en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. Rev Colomb Reumatol 2010; 17:13-21.
114. Wingard, JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis 1995; 20:115-125.
115. Bulacio L, Paz M, Ramadán S, Ramos L, Pairoba C, Sortino M, Escovich L, López C. Oral infections caused by yeasts in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. Identification of the yeasts and evaluation of their antifungal susceptibility. J Mycol Med 2012; 22:348-53.
116. Bensadoun RJ, Patton LL, Lalla RV, Epstein JB. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: update 2001. Support Care Cancer 2011; 19:737-44.

ANEXOS

Anexo I: Hoja de captura de datos

DATOS PERSONALES

Apellido, Nombres									
D.N.I.		HC:							
Edad		Sexo							
Domicilio									
Teléfonos									
Servicio									
Médico									
Tipo de paciente	<table><tr><td>Ambulatorio</td><td>Internado</td><td>Días Internación</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>			Ambulatorio	Internado	Días Internación			
Ambulatorio	Internado	Días Internación							

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PREVIOS

Descripción antecedentes	(Describir tiempo de evolución de la patología inmunosupresora)	
Candidiasis oral previa		
Tratamientos recibidos		

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS ACTUALES

Descripción enfermedad actual	(Describir tiempo de evolución)	
Tratamiento actual		
Perfil Bioquímico		

ESPECIFICACIONES DE LA MUESTRA OBTENIDA

Localización		
Características clínicas		
Profesional interviniente		
Fecha		

Anexo II:

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TITULO DEL ESTUDIO

Identificación fenotípica de Candida dubliniensis, aislada de candidiasis de mucosa oral en pacientes inmunocomprometidos en el Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba

INTRODUCCIÓN

Usted ha sido invitado a participar en este proyecto de investigación de tesis. Es importante que lea la descripción del estudio y su posible función en él en caso de que decida participar.

En este estudio se incluirán pacientes inmunosuprimidos (inmunidad alterada), ≥ 18 años de edad, de ambos sexos, con manifestaciones clínicas de candidiasis oral, ambulatorios y /o internados provenientes de servicios del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba. La candidiasis oral es una enfermedad causada por un hongo unicelular del género *Candida*, quien habita normalmente la mucosa oral de todas las personas. Dicho hongo ante factores locales o generales del individuo (huésped) puede aumentar su número y causar infección en el ser humano. Muchas especies del género *Candida* pueden ser causa de esta enfermedad. Las mismas para ser estudiadas de la mucosa oral deben ser aisladas e identificadas, en el laboratorio, mediante técnicas basadas en aspectos macromicromorfológicos de los hongos y sus propiedades bioquímicas (aspectos fenotípicos). Si bien otros hongos que no pertenecen al género *Candida* también pueden causar esta enfermedad, en este estudio solo se investigarán las especies del género *Candida*.

Asimismo, usted debe entender la naturaleza y los riesgos de su participación y proporcionar su consentimiento informado por escrito. Su decisión de participar es completamente voluntaria.

OBJETIVO

Identificar fenotípicamente *C. dubliniensis*, en muestras obtenidas de mucosa oral, de pacientes inmunosuprimidos hospitalizados y ambulatorios, con clínica de candidiasis de la mucosa oral, provenientes de 5 servicios del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Si usted está de acuerdo en participar, se le tomarán muestras de mucosa oral mediante hisopado en tubos con solución fisiológica estéril. Los mismos serán trasladados al Laboratorio de Micología y Diagnóstico de las Enfermedades de Piel. Cátedra de Clínica Dermatológica. Hospital Nacional de Clínicas (HNC). Facultad de Ciencias Médicas (FCM). Universidad Nacional de Córdoba (UNC), para su procesamiento.

En el laboratorio se realizará el procedimiento de aislamiento e identificación para levaduras del género *Cándida*

POSIBLES RIESGOS E INCOMODIDADES

Ardor o algún tipo de molestia en el momento de la recolección de la muestra, incomodidad al sacarse prótesis dental o por mantener la boca abierta por unos pocos segundos mientras se realiza el hisopado.

No está prevista la aparición de daños por su participación en este estudio porque los procedimientos que se efectuarán son los habituales para la toma de muestras para

cultivo de micosis de la cavidad oral. En caso de presentarse, los investigadores proporcionarán la atención médica que requiera.

BENEFICIOS POSIBLES

El estudio no posee beneficios directos para usted.

Para la sociedad en su conjunto, identificar la levadura *C. dubliniensis* como agente causal de candidiasis orales en pacientes inmunocomprometidos, será un llamado de atención entre los médicos tratantes de estos pacientes, especialmente infectólogos, sobre el rol de la misma como agente causal y su respuesta frente a los tratamientos antifúngicos habituales ; y al mismo tiempo concientizar a los laboratorios microbiológicos, sobre la necesidad de la puesta a punto de la marcha de identificación fenotípica pertinente, que permita diferenciarla de *C. albicans*.

GRATUIDAD

La participación en este estudio no tendrá costo para Usted.

COMPENSACIÓN

Este estudio no realiza compensaciones monetarias ni de otro tipo.

CONFIDENCIALIDAD

Mediante la firma del consentimiento informado usted estará de acuerdo en permitir, al personal que participa de la investigación, las dependencias sanitarias del gobierno y los Consejos de Ética de la investigación, que examinen su historia clínica y datos personales. Si usted recibe tratamiento médico en alguna otra situación, puede existir la necesidad de revisar sus datos médicos en dicha institución. Su nombre se mantendrá como confidencial hasta el punto que la ley lo permita sin revelar su identidad. Los resultados de esta investigación podrán ser presentados en reuniones científicas o publicadas en revistas de la especialidad manteniéndose confidencial la identidad de todos los participantes.

PARTICIPACION VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es plenamente voluntaria y Usted puede negarse a participar o puede retirarse del estudio en cualquier momento sin perder la atención médica que tiene derecho a recibir y sin necesidad de explicar los motivos de su decisión. Su participación puede ser interrumpida por su médico, si se ha determinado que Ud de continuar participando, podría dañar su salud.

OTRA INFORMACIÓN

1. Ante cualquier pregunta que tenga respecto a los procedimientos del estudio antes, durante o después del mismo, puede comunicarse con:

Investigadora: Dra. Graciela Mariel Carballo

Cargo: jefa del Laboratorio de Micología y Diagnóstico de Enfermedades de la Piel. Cátedra de Clínica Dermatológica. Hospital Nacional de Clínicas (HNC). Facultad de Ciencias Médicas (FCM). Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

Número de teléfono: 0351 433-7014

Horario de atención: lunes a jueves de 9:30 a 12:30 hs.

2. Este estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba. Si tiene duda acerca de sus derechos como paciente que participa en este estudio puede comunicarse con los miembros del Comité de Ética:

Coordinadora: Prof. Dra. Hilda Montrull

Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba. Santa Rosa 1564.

Horario de atención: lunes a viernes de 10 a 16 hs.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha: _____

Lugar: _____

Yo _____

Declaro: haber leído y comprendido la hoja de información, haber podido hacer las preguntas pertinentes, estar satisfecho con la información recibida, haber sido informado por el/la investigador/a: _____.

Conozco que mi participación es libre y voluntaria. Puedo retirarme sin perjuicio en el momento que yo lo decida sin dar explicaciones del motivo y expreso conformidad para la participación en la investigación: *"Identificación fenotípica de Candida dubliniensis, aislada de candidiasis de mucosa oral en pacientes inmunocomprometidos en el Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba"* dirigida por la Dra. Mariel Carballo.

Por lo tanto, doy mi consentimiento para la extracción de muestras mediante hisopado bucal, así como utilizar los resultados de la investigación y fotos, siempre y cuando se resguarde mi identidad, para fines científicos y educativos.

Firma: _____

Firma: _____

DNI: _____
(Paciente, tutor o responsable legal)

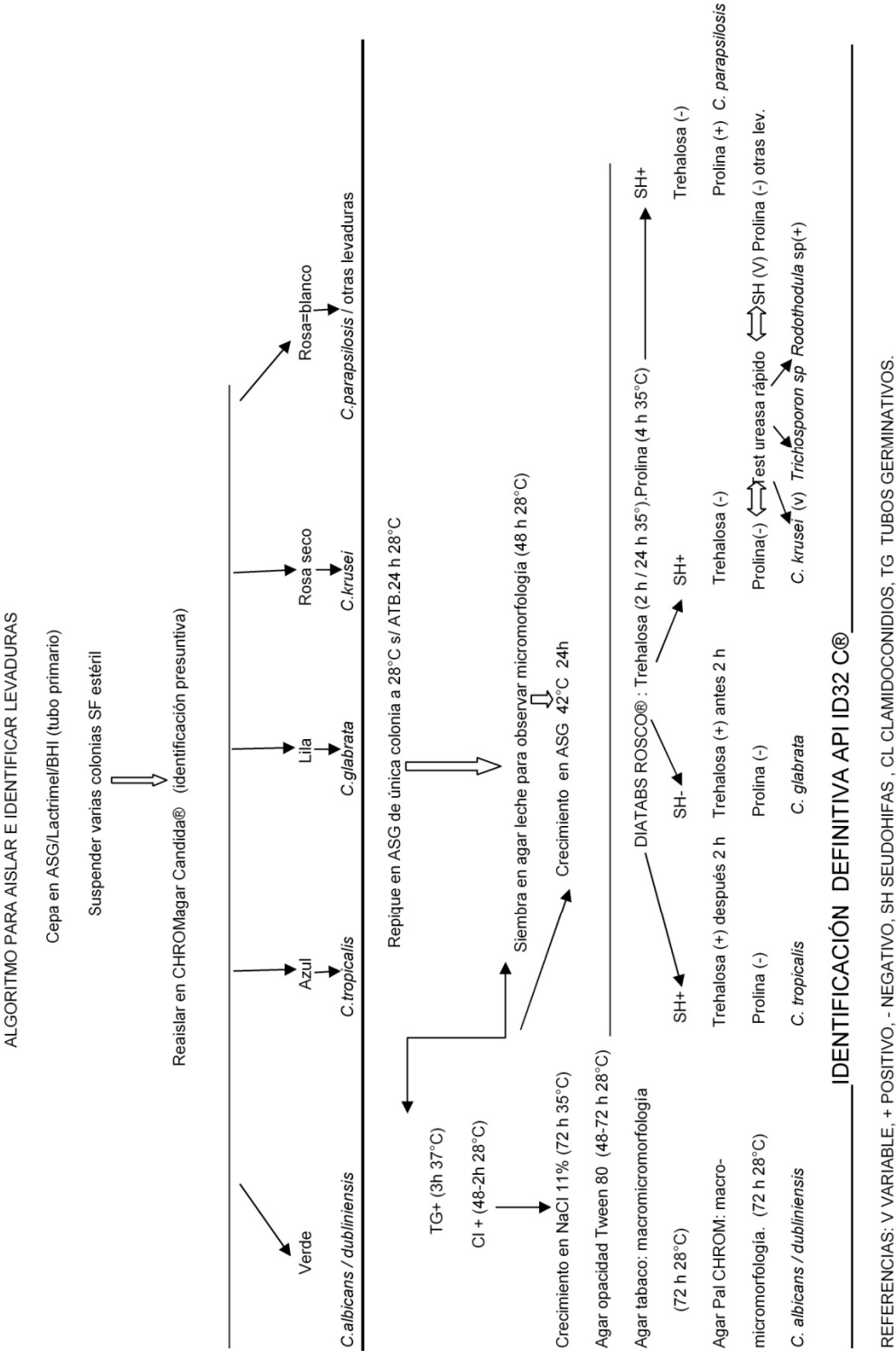
DNI: _____
(Profesional Informante)

Anexo III:

PLANILLA DE IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS			
PROTOCOLO:		Fecha:	
Nombre del paciente:			
Material :			
E.M.D.			
CHROM			
Siembra en Sabouraud:			

COLONIAS VERDES				COLONIAS NO VERDES			
AGAR LECHE				AGAR LECHE			
Siembra	TG	CI		Siembra	SH	Aspecto microscópico	
PAL´S CROMAGAR				TREHALOSA 2-4-24 Horas			
Siembra	Aspecto	CI		Siembra 35/37°C	Viraje		
NaCL 11%				UREA			
Siembra		Crecimiento		Siembra 37°C		Resultado	
AGAR TABACO				PROLINA 4 HORAS			
Siembra	Aspecto	Color	CI	Siembra 35/37°C	Resultado		
Siembra 42°C				Siembra 42°C			
Siembra		Crecimiento		Siembra		Crecimiento	
OPACIDAD							
Siembra		Halo					
API				API			
CODIGO				CODIGO			
GENERO				GENERO			
ESPECIE				ESPECIE			

Anexo IV:



Anexo V:

MATERIALES :

Agar leche en portaobjetos^{75,82}

Agar	2 g
Agua destilada	100 mL
Tween 80%	1 mL
Autoclavar a 121 °C, 15 min; conservar en heladera fraccionado en tubos de vidrio con 10 mL.	
Leche descremada estéril 0,1 mL (en el momento de utilizar, luego de disolución del medio base, agregar a 45-50 °C). Extender con pipeta el medio sobre portaobjetos, dejar solidificar dentro de una cápsula de Petri estéril.	

Agar hipersalado con NaCl 11%⁷⁹

Extracto de levadura	1 g
Peptona	2 g
Glucosa	2 g
Cloruro de sodio	11 g
Agar	3 g
Agua	100 mL
Autoclavar	a 121 °C, 15 minutos

Agar opacidad⁸⁰

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Cloruro de calcio	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
Autoclavar	a 121 °C 15 minutos y dejar enfriar hasta 50 °C,
Agregar 5 ml de Tween 80	

Agar tabaco⁸¹

Tabaco de 2 atados de cigarrillos marca Marlboro® o tabaco para pipa (Exceter®, Nobleza-Picardo SRL, Argentina).	50 g
Agua destilada	1000 mL
Hervir en baño María	30 min
Filtrar con varias capas de gasa.	
Luego se añade al filtrado:	agar 20 g
Agua c.s.p. completar	1000 mL
Llevar a pH	5,4
Autoclavar	a 121 °C durante 15 minutos.

Agar Pal CHROM^{78,83}

Polvo de semillas de girasol	50 g
Hervir	30 min en 1000 mL de agua
Filtrar	por gasa (extracto de semilla).
Añadir:	
Creatinina	1 g
Glucosa	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Agar	15 g
Llevar a	pH 5,5
Agregar el agar y autoclavar	a 110 °C por 20 minutos.

Preparar el CHROMagar Candida® según las indicaciones del fabricante.
Se mezclan partes iguales de ambos medios a 45-55 °C y luego se vierte en placas y se deja solidificar.

Prueba rápida de detección de ureasa.⁷⁷

Solución A	urea al 10%
Solución B	madre de rojo de fenol: pesar 0,1 g de fenolftaleína disolverlo en 100 mL de alcohol etílico al 96% (indicador ácido-básico).
Guardar en heladera	

Anexo VI:

Imágenes complementarias de Laboratorio

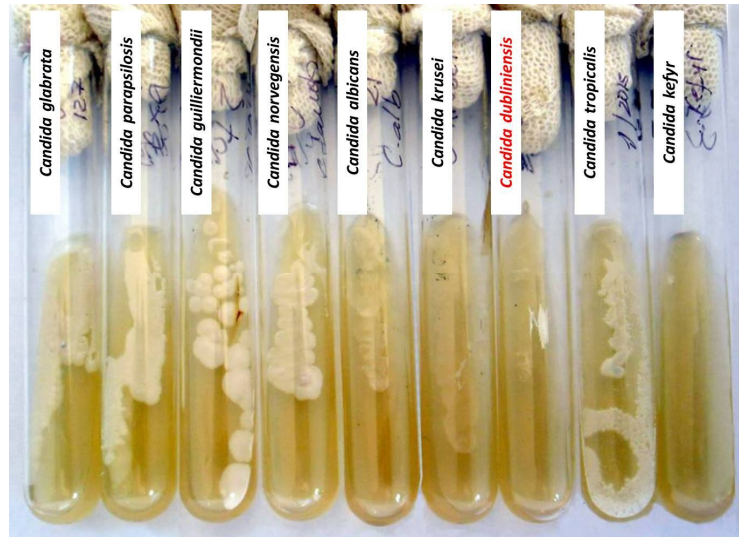


Figura A5.01: aspecto macroscópico de colonias de especies *Candida* en ASG, provenientes de muestras de mucosa oral de pacientes inmunocomprometidos.

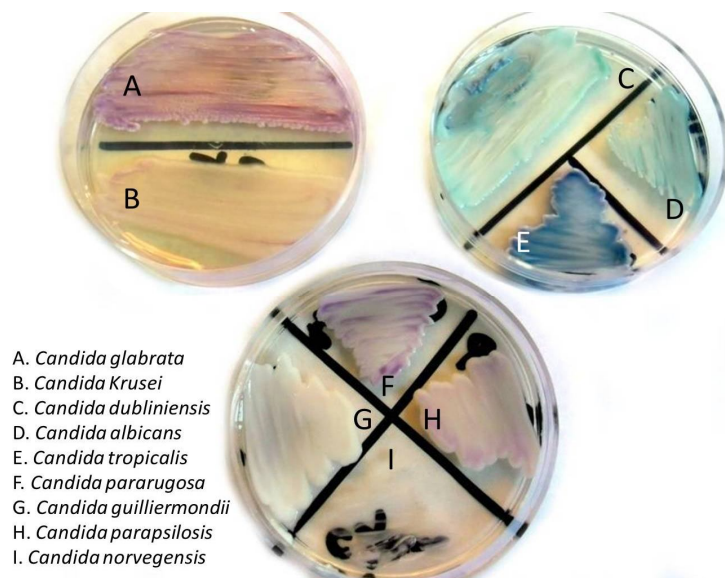


Figura A5.02: crecimiento de distintas especies *Candida* en CROMagar Candida®.

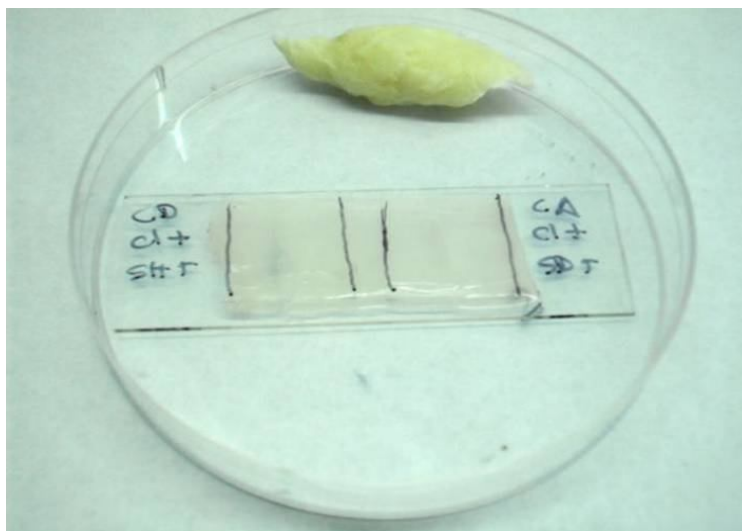


Figura A5.03: agar leche en portaobjetos para la observación de pseudohifas (SH) y clamidoconidios (Cl) de *Candida dubliniensis* (CD) y *Candida albicans* (CA).

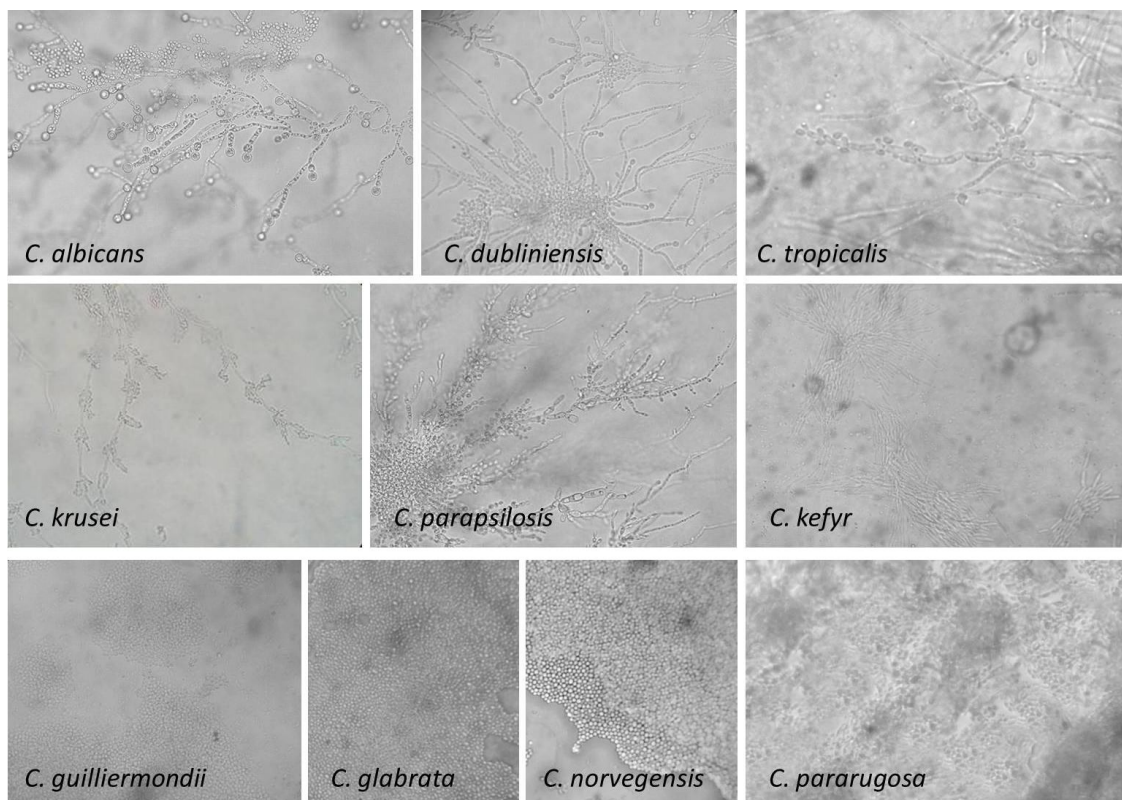


Figura A5.04: fotomicrografía: aspecto micromorfológico de especies *Candida* observadas en agar leche (200x y 400x).



Figura A5.05: estufa de cultivo a T ambiente: se observan placas con diferentes medios para identificar levaduras.



Figura A5.06: medio agar opacidad: A y B: colonia de *Candida albicans* conformación de halo; C: colonia de *Candida dubliniensis* sin formación de halo.

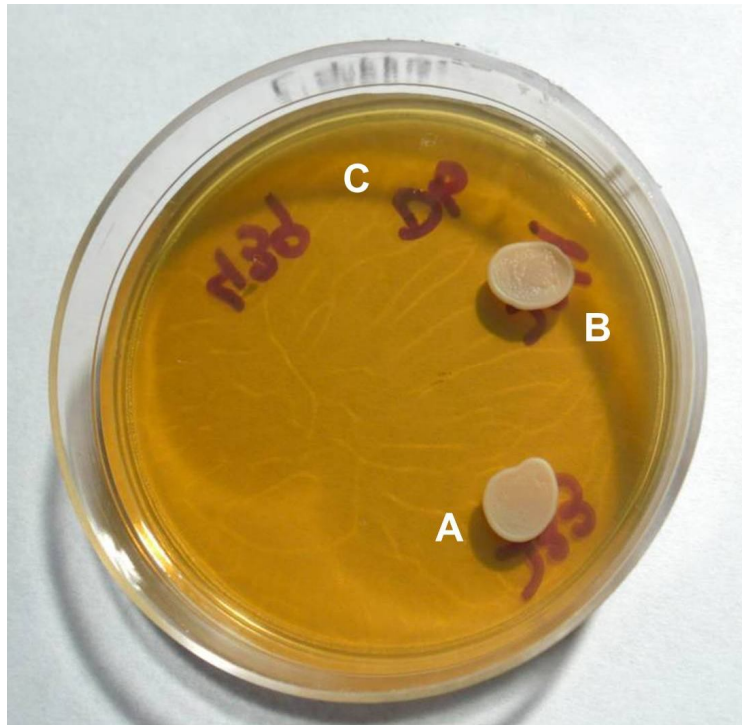


Figura A5.07: A y B: desarrollo de *Candida albicans* en agar NaCl al 11%; C: *Candida dubliniensis* no desarrolla en agar NaCl al 11%.

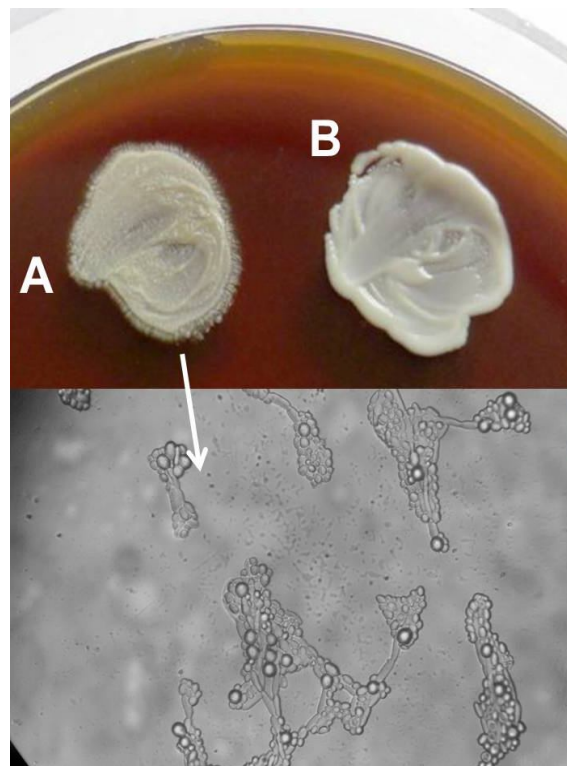


Figura A5.08: A aspecto macroscópico de colonia *Candida dubliniensis* y fotomicrografía 400X de clamidoconidios, en agar tabaco; B: aspecto macroscópico de colonia de *Candida albicans* en agar tabaco.

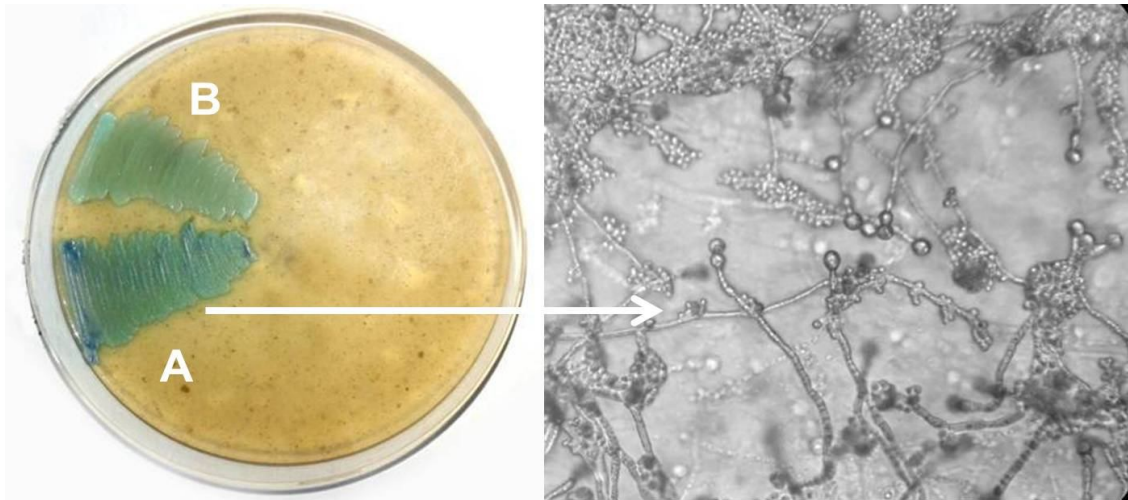


Figura A5.09: crecimiento de: A: *Candida dubliniensis* (verde oscuro) y B: *Candida albicans* (verde claro) en agar Pal CHROM (izquierda); fotomicrografía 400X de clamidoconidios, dela colonia de *Candida dubliniensis* en agar Pal CHROM (derecha).

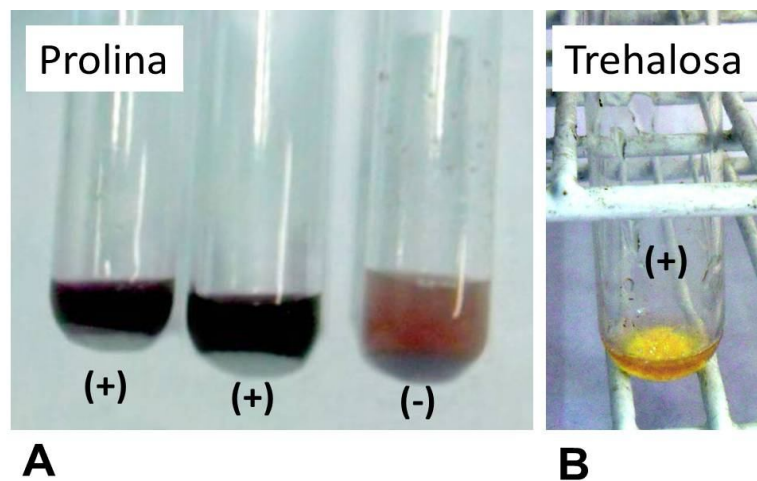


Figura A5.10: A: prueba de Prolina con tabletas ROSCO®, (+) para *Candida parapsilosis*. B: prueba de Trehalosa rápida con tabletas ROSCO®, (+) para *Candida glabrata*.



Figura A5.11: identificación definitiva de *Candida dubliniensis* con método miniaturizado comercial API ID 32 C®.

Imágenes clínicas complementarias



Figura A5.12: candidiasis seudomembranosa en paciente HIV/sida.



Figura A5.13: candidiasis eritematosa crónica (atrófica), lengua de aspecto vegetante, en paciente con pénfigo vulgar.



Figura A5.14: candidiasis multifocal, aspecto pseudomembranoso en carrillo con queilitis angular, en paciente oncológico.



Figura A5.15: candidiasis leucoplásica o leucoplasiforme, en paciente de UTI.



Figura A5.16: candidiasis seudomembranosa crónica, en paciente con pénfigo vulgar y diabetes.

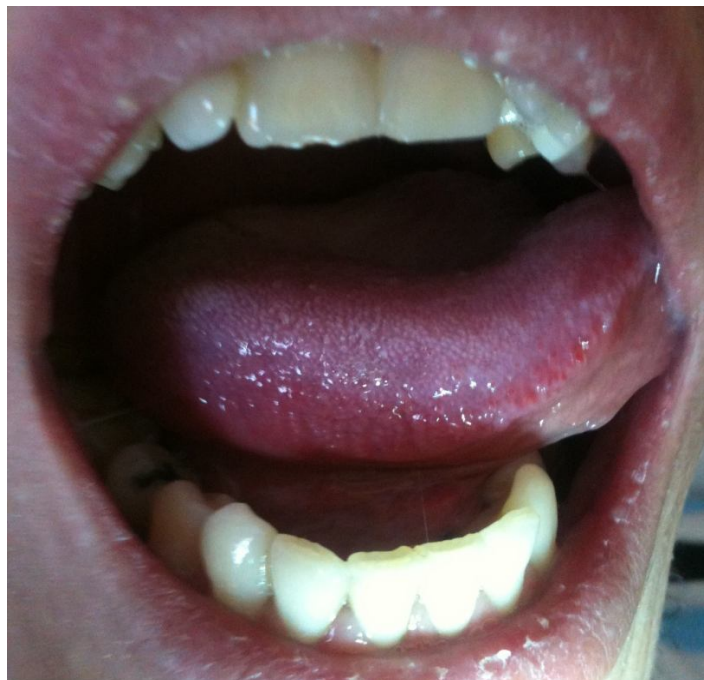


Figura A5.17: candidiasis eritematosa en paciente HIV/sida.



Figura A5.18: candidiasis seudomembranosa en lengua y paladar asociada a estomatitis palatina en paciente con enfermedad autoinmune.

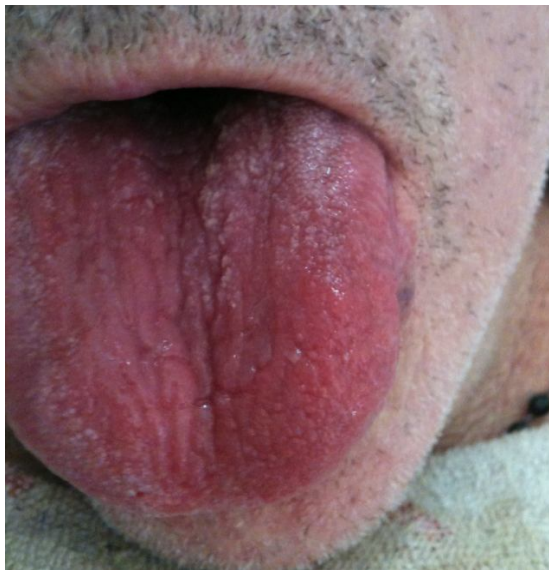


Figura A5.19: candidiasis eritematosa en paciente internado en UTI.

Anexo VII:

LISTADO DE ABREVIATURAS DE GENES

(Inglés-Español)

EAP1: Enhanced adhesion Polystyrene Protein
MNT1: Mannosyl Transferase
HWP1: Hyphal Wall Protein
*HYR1: **H**ydroperoxide **R**esistance. (Hyphally Regulated)*
PHR1: PH regulated
ACT1: Actin
MET6: Methionine Synthase
ALS: Agglutinin-Like Sequence
SAP: Secreted Aspartyl Proteinase
*HOG1: Mitogen-Activated **P**rotein **K**inase **H**omolog*
NGR1: Negative Growth Regulatory protein
EFG1: Transcription factor Enhanced Filamentous Growth
OLE1: Fatty Acid Desaturase
RIM13: Cysteine-type endopeptidase
ISW2: ATP-dependent chromatin remodeler
SCH9: Protein serine/threonine kinase
SUV3: ATP –dependent ARN helicase
SFL2: Suppressor gene for Flocculation
ECE1: Endothelin-Converting Enzyme (Extend Cell Elongation)
INT1: Leukocyte Integrin Protein

EAP1: Proteína incrementadora de la adherencia al poliestireno
MNT1: Manosil-transferasa
HWP1: Proteína de la pared de hifa
HYR1: Regulador de la adhesión de las hifas
PHR1: Regulador del PH
ACT1: Actina
MET6: Metionina sintasa
ALS: Proteína adhesina de la pared celular
SAP: Aspartil proteinasa secretada
HOG1: MAP quinasa de respuesta al estrés osmótico
NGR1: Factor de transcripción inhibidor del crecimiento filamentoso
EFG1: Factor de transcripción potenciador del crecimiento filamentoso
OLE1: Ácidos grasos desaturasa
RIM13: Cistein-proteasa de tipo calpaína
ISW2: Componente ATPasa del complejo remodelador de la cromatina
SCH9: Serina / treonina proteína quinasa
SUV3: ARN helicasa ATP-dependiente
SFL2: Factor de transcripción regulador de la morfogénesis
ECE1: Inductor del alargamiento de las células de hifas
INT1: Proteína integradora