

Aislamiento de *Candida dubliniensis* en un adolescente con estomatitis protésica

Christian Oscar Mosca ⁽¹⁾, María Dolores Moragues ⁽²⁾, Sonia Brena ⁽³⁾, Alcira Cristina Rosa ⁽⁴⁾, José Pontón ⁽⁵⁾

(1) Profesor Ayudante de Microbiología y Parasitología. Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires

(2) Catedrática E.U. de Bioquímica y Fisiología. Departamento de Enfermería I. Universidad del País Vasco

(3) Doctoranda. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco

(4) Profesora Titular de Microbiología y Parasitología. Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires

(5) Catedrático de Microbiología. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco

Dirección para la correspondencia:

Dr. José Pontón.

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología.

Facultad de Medicina y Odontología.

Universidad del País Vasco, Apartado 699,

E-48080 Bilbao, Vizcaya, España.

Tel: 34-94-6012855. Fax: 34-94-4649266.

E-mail: oiipposaj@lg.ehu.es

Recibido: 05/11/2003 Aceptado: 01/02/2004

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed
-EMBASE, Excerpta Medica
-Índice Médico Español
-IBECS

Mosca CO, Moragues MD, Brena S, Rosa AC, Pontón J. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en un adolescente con estomatitis protésica. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10:25-31.
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

RESUMEN

Objetivos: Utilizar varios métodos que permiten la diferenciación entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en un intento de conocer si *C. dubliniensis* puede ser aislada de la cavidad oral de adolescentes con prótesis ortopédicas orales.

Materiales y métodos: Se aislaron 12 cepas de género *Candida* procedentes de mucosa palatina y de soporte de prótesis de 12 pacientes adolescentes portadores de prótesis ortopédicas orales. Para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se utilizaron varias pruebas fenotípicas (la asimilación de fuentes de carbono con el método comercial ID 32C, el crecimiento en agar glucosado de Sabouraud a 45 °C, la producción abundante de clamidosporas en agar caseína, y la reactividad mediante inmunofluorescencia indirecta con un antisuero específico para *C. dubliniensis*) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El serotipado de *C. albicans* se realizó con el anticuerpo monoclonal B9E.

Resultados: Los 12 pacientes estudiados presentaron una estomatitis protésica tipo 2 de Newton y en todos los casos se aislaron las mismas especies de la muestra de mucosa y de la de prótesis del mismo paciente. El CHROMagar *Candida* y la prueba de la filamentación en suero permitieron diferenciar los aislamientos que daban lugar a colonias de color verde y filamentaban de los que daban colonias violetas y no lo hacían. Únicamente el aislamiento del paciente 8 fue positivo con el antisuero específico para *C. dubliniensis* y produjo abundantes clamidosporas en agar

caseína, mientras que ocho aislamientos no presentaron crecimiento a 45 °C. La identificación de todos los aislamientos se consiguió con la prueba ID 32C, identificándose *C. albicans* en el 75% de los pacientes, *C. glabrata* en el 16,6% y *C. dubliniensis* en el 8,3%. La PCR con iniciadores específicos para el tipado de *C. dubliniensis* permitió la identificación del aislamiento del paciente 8 como *C. dubliniensis* genotipo 1.

Conclusión: *C. dubliniensis* puede ser aislada de la cavidad oral de adolescentes con estomatitis asociada a prótesis ortopédicas y es posible, y técnicamente asequible, la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante la realización de pruebas como el ID 32C, la observación de abundantes clamidosporas en agar caseína, la reactividad con un antisuero específico para *C. dubliniensis* y la PCR.

Palabras clave: *Candida dubliniensis*, estomatitis protésica, Candidiasis.

INTRODUCCION

La candidiasis oral es una de las presentaciones clínicas de mayor prevalencia entre las infecciones causadas por *Candida*, sobre todo en pacientes infectados por el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o con otras inmunodeficiencias (1). En pacientes con una serie de factores predisponentes como el uso de prótesis dentales, la xerostomía, las terapias múltiples con antibióticos e inmunosupresores y algunas inmunodeficiencias, *C. albicans*

puede convertirse en un patógeno capaz de causar una serie de infecciones orales que incluyen, la candidiasis pseudomembranosa, la candidiasis eritematosa, la candidiasis hiperplásica, así como las lesiones asociadas estomatitis protésica, queilitis angular, glositis rómbica, queilitis exfoliativa y candidiasis mucocutánea crónicas. *Candida* puede estar también implicado en el eritema gingival lineal y la periodontitis necrótica en pacientes con infección por el VIH (1).

El agente etiológico más importante de la candidiasis oral es *Candida albicans*, pero la incidencia de las infecciones causadas por otras especies como *Candida krusei*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* ha ido aumentando progresivamente (2, 3). La razón del cambio epidemiológico que está provocando esta emergencia no está clara, aunque se ha sugerido que la reducida sensibilidad de estas especies a los antifúngicos utilizados comúnmente, como el fluconazol, puede haber llevado a su selección (4).

Candida dubliniensis es una de las especies emergentes que parecía estar asociada principalmente con la infección oral en pacientes infectados por el VIH (2, 5, 6) pero que ha sido aislada también en otras localizaciones anatómicas, de individuos sanos y en casos de infección sistémica (2, 7-9). La estrecha relación fenotípica y genotípica que existe entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* ha llevado a identificar incorrectamente la mayoría de los aislamientos de *C. dubliniensis* como *C. albicans* (2, 5), dificultando un análisis exhaustivo de esta especie (10). En los últimos años se han desarrollado una serie de pruebas fenotípicas y genotípicas que han permitido la identificación rápida y fiable de *C. dubliniensis* en muestras clínicas (11-16). En este estudio hemos utilizado varios métodos que permiten la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* en un intento de conocer si *C. dubliniensis* puede ser aislada de la cavidad oral de adolescentes con prótesis ortopédicas orales.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes. Se estudiaron 24 muestras procedentes de la cavidad bucal de 12 pacientes no relacionados que fueron atendidos en el Hospital Nacional de Odontología (Buenos Aires, Argentina). La observación e historia clínica fue realizada por el mismo odontólogo a todos los pacientes. Los pacientes estudiados tenían entre 12-18 años, portaban prótesis ortopédicas orales y presentaban una historia médica-odontológica clínica no relevante. Los criterios de exclusión fueron la existencia de inmunosupresión o de lesiones asociadas con leucoplasias, liquen erosivo y epitelomas. Las muestras orales se obtuvieron con torunda de la prótesis y de la mucosa palatina en contacto con la prótesis. **Cultivo e identificación.** Las muestras clínicas se sembraron en agar glucosado de Sabouraud (Difco, Detroit, Mich. USA) durante 48 h a 30°C. Como controles para las pruebas de identificación se utilizaron las cepas *C. albicans* serotipo A (NCPF 3153) y *C. dubliniensis* CD36 (NCPF 3949, genotipo 1) de la National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF, Bristol, United Kingdom), así como la *C. albicans* serotipo B (ATCC 90028) de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Para el tipado de *C. dubliniensis* también se utilizaron las cepas CBS 2747 (genotipo 2) del Centraalbureau

voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands), p6265 (genotipo 3) y p7718 (genotipo 4) (17). Los aislamientos obtenidos se identificaron mediante métodos morfológicos y fisiológicos convencionales que incluían tinción de Gram, filamentación en suero, crecimiento en CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, Paris, Francia) y la asimilación de fuentes de carbono con el método comercial ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) (18). El serotipado de *C. albicans* se realizó mediante la técnica descrita por Barturen et al. (19).

Para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se utilizaron varias pruebas fenotípicas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dentro de las primeras, se estudió el crecimiento en agar glucosado de Sabouraud a 45 °C durante 48 h (12), la producción abundante de clamidosporas en agar caseína (14), y la reactividad mediante inmunofluorescencia indirecta con un antisuero específico para *C. dubliniensis* (15). La identificación y caracterización de los genotipos de *C. dubliniensis* se realizó mediante PCR con las parejas de iniciadores G1F/G1R, G2F7/G2R, G3F/G3R y G4F/G4R, esencialmente como ha sido descrito por Brena et al. (17).

RESULTADOS

Los 12 pacientes estudiados presentaron una estomatitis protésica tipo 2 de Newton (hiperémica, lisa y atrófica), aislándose en todos los casos colonias levaduriformes en agar glucosado de Sabouraud. Tras la identificación, se comprobó que en todos los casos se habían aislado las mismas especies de la muestra de mucosa y de la prótesis del mismo paciente.

La observación del color de las colonias en CHROMagar Candida permitió diferenciar los aislamientos que daban lugar a colonias verdes de los que daban colonias violetas (Tabla 1). La misma diferenciación se obtuvo con la prueba de la filamentación en suero, ya que los aislamientos que producían colonias verdes filamentaban en suero, mientras que los que producían colonias violetas no lo hacían. Dado que no es fácil diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* por el color de las colonias y que no se puede diferenciar estas dos especies por la filamentación en suero, los aislamientos que dieron colonias de color verde y filamentaban en suero se identificaron como *C. albicans/C. dubliniensis*, mientras que los que dieron colonias de color violeta como *C. glabrata/C. parapsilosis/C. guilliermondii*.

La diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se realizó por medio de técnicas fenotípicas y genotípicas. Las primeras comprendían la producción de abundantes clamidosporas en agar caseína, la reactividad con un antisuero específico para *C. dubliniensis*, el crecimiento a 45 °C y el ID 32C. Únicamente el aislamiento del paciente 8 fue positivo con el antisuero específico para *C. dubliniensis* y produjo abundantes clamidosporas en agar caseína (Figura 1a y b, Tabla 1), mientras que ocho aislamientos no presentaron crecimiento a 45 °C. La identificación de todos los aislamientos se consiguió con la prueba ID 32C, identificándose *C. albicans* en el 75% de los pacientes, *C. glabrata* en el 16,6% y *C. dubliniensis* en el 8,3% (Tabla 1). El código obtenido para el aislamiento del paciente 8 con el ID 32C a las 48 h fue 7142140015+, que permitía la identificación de *C. dubliniensis* con una probabilidad del 99,4%. El serotipado

se realizó a los aislamientos identificados como *C. albicans*/*C. dubliniensis*, resultando todos del serotipo A (Tabla 1).

La PCR con iniciadores específicos para el tipado de *C. dubliniensis* permitió la identificación del aislamiento del paciente 8 como *C. dubliniensis* genotipo 1 (Figura 1c).

Paciente	Filamentación en suero	Colonias en CHROMagar	Crecimiento a 45°C	ID32C	Serotipo	Reactividad anti- <i>C. dubliniensis</i>	Clamidosporas abundantes en agar Caseína	Identificación
1	+	Verdes	+	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A
2	+	Verdes	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A
3	+	Verdes	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A
4	-	Violetas	-	<i>C. glabrata</i>	NA	-	-	<i>C. glabrata</i>
5	+	Verdes	+	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A
6	-	Violetas	-	<i>C. glabrata</i>	NA	-	-	<i>C. glabrata</i>
7	+	Verdes	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A
8	+	Verdes	-	<i>C. dubliniensis</i>	A	+	+	<i>C. dubliniensis</i>
9	+	Verdes	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A
10	+	Verdes	+	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A
11	+	Verdes	+	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A
12	+	Verdes	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotipo A

NA. No aplicable.

Tabla 1. Características e identificación de las cepas aisladas.

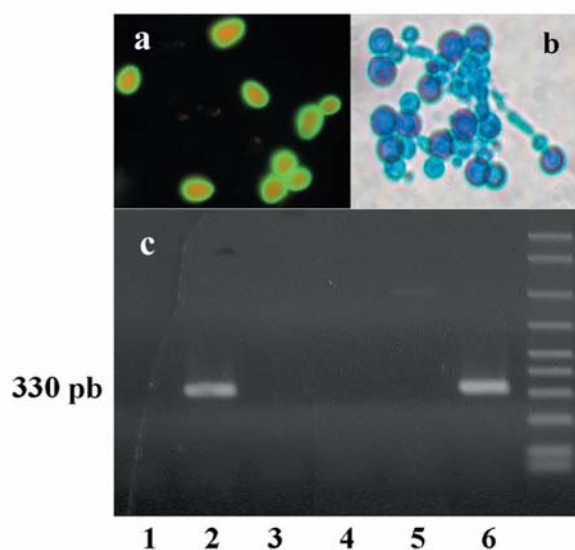


Fig. 1. Identificación y tipado del aislamiento de *C. dubliniensis* del paciente 8. a: Fluorescencia con un antisuero específico para *C. dubliniensis*. b: Producción de abundantes clamidosporas en agar caseína. c: Tipado de *C. dubliniensis* por PCR con la pareja de iniciadores específicos para el genotipo 1. Calles 1-6: *C. albicans* NCPF 3153, *C. dubliniensis* NCPF 3949 genotipo 1, *C. dubliniensis* CBS 2747 genotipo 2, *C. dubliniensis* p6265 genotipo 3, *C. dubliniensis* p7718 genotipo 4 y *C. dubliniensis* aislada del paciente 8.

Identification and typing of *C. dubliniensis* isolate from patient 8. a: Fluorescence with an antiserum specific for *C. dubliniensis*. b: Abundant chlamydospore production on Casein agar. c: Typing of *C. dubliniensis* by PCR using the pair of primers specific for genotype 1. Lanes 1-6: *C. albicans* NCPF 3153, *C. dubliniensis* NCPF 3949 genotype 1, *C. dubliniensis* CBS 2747 genotype 2, *C. dubliniensis* p6265 genotype 3, *C. dubliniensis* p7718 genotype 4 and *C. dubliniensis* isolated from patient 8.

DISCUSION

La estomatitis protésica asociada a *Candida* es un proceso inflamatorio que afecta la mucosa oral del 25-65% de los pacientes portadores de prótesis dentales (20). Aunque la estomatitis protésica se diagnostica generalmente en adultos, también puede ser observada en niños y adolescentes que tienen prótesis ortopédicas orales (21). *C. albicans* es la causa más importante de origen fúngico en la estomatitis protésica, pero otras especies del género *Candida* también pueden estar implicadas (22). En este trabajo, *C. albicans* se aisló en la mayoría de los pacientes con estomatitis protésica, pero también se aislaron *C. glabrata* y *C. dubliniensis*.

A medida que se van realizando más estudios, *C. dubliniensis* se está asociando con un mayor número de presentaciones clínicas de la candidiasis oral. Aunque la presentación clínica más frecuente de la candidiasis oral causada por *C. dubliniensis* es la candidiasis eritematosa (23), también se han descrito casos de eritema lineal gingival en niños y de estomatitis protésica causados por *C. dubliniensis* en adultos, aunque en el caso de la estomatitis protésica, *C. dubliniensis* se coaisló con otras especies del género *Candida* (2, 24), por lo que su participación en la patogenia de la infección no quedó aclarada. A nuestro entender, el paciente descrito en este trabajo es el primer caso de estomatitis protésica causada directamente por *C. dubliniensis* en un adolescente portador de una prótesis oral ortopédica. La presentación clínica de la candidiasis oral de este paciente, que portaba un aparato de disyunción para aumentar el diámetro transversal del maxilar superior, no presentaba características diferenciales con respecto a las observadas en el resto de los pacientes. La diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* requiere pruebas especiales, ya que las pruebas que se utilizan convencionalmente en los laboratorios de Micología no suelen ser eficaces. En este sentido, ni la coloración de las colonias en CHROMagar *Candida* ni la ausencia de crecimiento a 45 °C resultaron eficaces para identificar nuestro aislamiento de *C. dubliniensis*. Las pruebas que permitieron la diferenciación entre ambas especies fueron el ID 32C, la observación de abundantes clamidosporas en agar caseína, la reactividad con un antisuero específico para *C. dubliniensis* y la PCR. De estas cuatro pruebas, las dos primeras son las que más fácilmente pueden realizarse en los laboratorios de Micología ya que el ID 32C puede obtenerse comercialmente y el agar caseína no requiere materiales sofisticados (14). Aunque en este estudio las dos pruebas sirvieron para la identificación de *C. dubliniensis*, el ID 32C no es capaz de identificar todos los aislamientos de *C. dubliniensis* (11) y la identificación presuntiva realizada con el agar caseína es aconsejable confirmarla con otra técnica. Además de la identificación de *C. dubliniensis*, el ID 32C permitió la identificación definitiva de los aislamientos de *C. albicans* y *C. glabrata*.

El análisis por PCR permitió la realización de un doble objetivo. En primer lugar sirvió para confirmar que el aislamiento del paciente 8 era *C. dubliniensis*, ya que estos iniciadores no amplifican los aislamientos de *C. albicans* (17). En segundo lugar permitió conocer el genotipo, lo que proporciona una información de interés epidemiológico. El aislamiento de *C.*

dubliniensis del paciente 8 pertenecía al genotipo 1, que es el genotipo más frecuente (25) y que ha sido detectado mayoritariamente en aislamientos orales en España (17).

En conclusión, los resultados de este estudio demuestran que *C. dubliniensis* puede ser aislada de la cavidad oral de adolescentes con estomatitis asociada a prótesis ortopédicas y que es posible, y técnicamente asequible, la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante la realización de pruebas como el ID 32C, la observación de abundantes clamidosporas en agar caseína, la reactividad con un antisuero específico para *C. dubliniensis* y la PCR.

Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis

MOSCA CO, MORAGUES MD, BRENA S, ROSA AC, PONTÓN J. ISOLATION OF *CANDIDA DUBLINIENSIS* IN A TEENAGER WITH DENTURE STOMATITIS. MED ORAL PATOL ORAL CIR BUCAL 2005;10:25-31.

SUMMARY

Objectives: Test several methods that allow the differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*, in an attempt to assess whether *C. dubliniensis* can be recovered from the oral cavity of teenagers wearing orthopedic oral prostheses. **Material and Methods:** Twelve *Candida* strains were isolated from the prosthesis as well as the palatal mucosa in contact with the dental prosthesis from 12 teenager patients wearing orthopedic oral prostheses. Differentiation between *C. albicans* and *C. dubliniensis* was achieved by a number of phenotypic tests (carbon assimilation by the commercially available ID 32C test, growth at 45°C on Sabouraud glucose agar, abundant chlamyospore production on Casein agar, and reactivity with a *C. dubliniensis* antiserum) and the polymerase chain reaction (PCR). Serotyping of *C. albicans* was performed with monoclonal antibody B9E.

Results: All 12 patients studied presented a Newton's type 2 denture stomatitis and in every patient the same *Candida* species were isolated from the prosthesis and the palatal mucosa in contact with the dental prosthesis. CHROMagar *Candida* and the germ tube test allowed the differentiation of isolates giving green colonies and a positive germ tube test from those giving violet colonies and a negative germ tube test. Only the isolate from patient 8 was stained by the *C. dubliniensis* antiserum and showed abundant chlamyospore production on Casein agar. Eight isolates did not grow at 45 °C. Identification of all isolates was obtained by the ID 32C test. *C. albicans* was identified in 75% of patients, *C. glabrata* in 16,6% and *C. dubliniensis* in 8,3%. By using specific primers for typing *C. dubliniensis*, PCR allowed the identification of patient's 8 isolate as *C. dubliniensis* genotype 1.

Conclusion: *C. dubliniensis* can be isolated from the oral cavity of teenagers wearing orthopedic oral prostheses and it is pos-

sible and technically amenable, the differentiation between *C. albicans* y *C. dubliniensis* using the ID 32C test, the observation of abundant chlamyospore production on Casein agar, the reactivity with a *C. dubliniensis* antiserum and the PCR.

Key words: *Candida dubliniensis*, denture stomatitis, Candidiasis

INTRODUCTION

Oral candidiasis is one of the most prevalent clinical presentations of *Candida* infections, particularly in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals and other immunodeficient patients (1). In patients with a number predisposing conditions such as dental prosthesis, xerostomia, multiple therapies with antibiotics and immunosuppressors, and some immunodeficiencies, member of genus *Candida* can convert into a pathogen capable of causing a variety of oral infections including pseudomembranous candidiasis, erythematous candidiasis and hyperplastic candidiasis, as well as *Candida*-associated denture stomatitis, *Candida*-associated angular cheilitis, rhomboid glossitis, exfoliative cheilitis and chronic mucocutaneous candidiasis. *Candida* may also be implicated in the linear gingival erythema and necrotic periodontitis in HIV-infected patients (1).

Although *Candida albicans* remains the most common cause of oral candidiasis, the incidence of disease caused by other species such as *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, and *Candida glabrata*, has been increasing steadily (2, 3). The reason for the epidemiological change that is causing this emergence is not clear, although it has been suggested that the reduced susceptibility of these species to commonly used antifungal agents, such as fluconazole, may have led to their selection (4).

Candida dubliniensis is one of the emergent species which appeared to be mainly associated with oral disease in HIV-infected individuals (2, 5, 6) but it has also been recovered from other anatomical sites, from healthy individuals and in cases of systemic disease (2, 7-9). The very close phenotypic and genotypic relationship between *C. dubliniensis* and *C. albicans* has led to the misidentification of isolates of *C. dubliniensis* as *C. albicans* (2, 5), hampering comprehensive epidemiological analysis of this species (10). In recent years a number of phenotype-based and molecular tests have been developed which have permitted the rapid and reliable identification of *C. dubliniensis* in clinical samples (11-16). In the present study, we have used several methods that allow for the differentiation between *C. albicans* and *C. dubliniensis* in an attempt to assess whether *C. dubliniensis* can be recovered from the oral cavity of teenagers wearing orthopedic oral prostheses.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Twenty-four oral specimens from 12 unrelated patients attending de Hospital Nacional de Odontología (Buenos Aires, Argentina) were studied. Oral examinations and clinical histories were performed by the same odontologist. Patients had an age range of 12-18, wore orthopedic dental prosthesis and had a non-relevant medical-odontological history. Exclusion criteria

included immunosuppression, and existence of lesions associated with leukoplakia, erosive lichen and epitheliomas.

Oral swabs were obtained from the prosthesis as well as from the palatal mucosa in contact with the dental prosthesis.

Culture and identification. Clinical samples were grown on Sabouraud glucose agar plates (Difco, Detroit, Mich. USA) for 48 h at 30°C. Control strains for identification tests included *C. albicans* serotype A (NCPF 3153) and *C. dubliniensis* CD36 (NCPF 3949, genotype 1) obtained from the National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF, Bristol, United Kingdom) and *C. albicans* serotype B (ATCC 90028) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). For the typing of *C. dubliniensis* strains CBS 2747 (genotype 2) from Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands), p6265 (genotype 3) and p7718 (genotype 4) were also used (17). Conventional morphologic and physiologic methods including Gram staining, germ tube test, growth on CHROMagar *Candida* (CHROMagar Microbiology, Paris, Francia) and carbon assimilation by the ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) (18), were employed to confirm the identity of all isolates. Serotyping of *C. albicans* isolates was performed according to Barturen et al. (19).

Differentiation between *C. albicans* and *C. dubliniensis* was achieved by a number of phenotypic tests and the polymerase chain reaction (PCR). Phenotypic tests included growth at 45°C for 48 h on Sabouraud glucose agar (12), abundant chlamyospore production on Casein agar (14), and reactivity with a *C. dubliniensis* antiserum by indirect immunofluorescence (15). Identification and characterization of *C. dubliniensis* genotypes was performed by PCR with the primers G1F/G1R, G2F7/G2R, G3F/G3R and G4F/G4R, essentially as described by Brena et al. (17).

RESULTS

All 12 patients studied presented a Newton's type 2 denture stomatitis (hyperhemic, smooth and atrophic) and yielded yeast colonies on Sabouraud's dextrose agar. Identification of isolates showed that in every patient the same *Candida* species were isolated from the prosthesis and the palatal mucosa in contact with the dental prosthesis.

Careful observation of the colony color in CHROMagar *Candida* allowed the differentiation of isolates giving green colonies from those giving violet colonies (Table 1). The same differentiation was achieved with the germ tube test, since isolates producing green colonies had a positive germ tube test and those yielding violet colonies had a negative germ tube test. As it is difficult to differentiate *C. albicans* from *C. dubliniensis* by the colony color, and taking into consideration that both species can not be differentiated by the germ tube test, isolates producing green colonies and a positive germ tube test were identified as *C. albicans/C. dubliniensis*, while isolates producing violet colonies were identified as *C. glabrata/C. parapsilosis/C. guilliermondii*. Differentiation between *C. albicans* and *C. dubliniensis* was achieved by a number of phenotypic and genotypic tests. Phenotypic tests included abundant chlamyospore production on Casein agar, reactivity with a *C. dubliniensis* antiserum, growth

at 45°C and the ID 32C test. Only the isolate from patient 8 was stained by the *C. dubliniensis* antiserum and showed abundant chlamydospore production on Casein agar (Figure 1a and b, Table 1). Eight isolates did not grow at 45 °C. Identification of all isolates was obtained by the ID 32C test. *C. albicans* was identified in 75% of patients, *C. glabrata* in 16,6% and *C. dubliniensis* in 8,3% (Table 1). The 48 h ID 32C code for patient’s 8 isolate was 7142140015+, allowing the identification of *C. dubliniensis* with a probability of 99,4%. All isolates identified as *C. albicans*/*C. dubliniensis* belonged to serotype A (Table 1).

By using specific primers for typing *C. dubliniensis*, PCR allowed the identification of patient’s 8 isolate as *C. dubliniensis* genotype 1 (Figure 1c).

DISCUSSION

Candida-associated denture stomatitis is an inflammatory process that affects the oral mucosa of 25-65% of patients wearing removable dental prostheses (20). Although denture stomatitis is usually diagnosed in adults, it can also be observed in children

and teenagers with orthopedic dental prostheses (21). *C. albicans* is the major cause of fungal origin in denture stomatitis but other *Candida* species may also be involved (22). In this study *C. albicans* was isolated from the majority of patients with denture stomatitis but *C. glabrata* and *C. dubliniensis* were also isolated. As new studies are being performed, *C. dubliniensis* is being associated with an increasing number of clinical presentations of oral candidiasis. Although the most frequent clinical presentation of oral candidiasis caused by *C. dubliniensis* is erythematous candidiasis (23), cases of linear gingival erythema in children and denture stomatitis in adults caused by *C. dubliniensis* have also been described. However, in the denture stomatitis, *C. dubliniensis* was co-isolated with other *Candida* species (2, 24), and its participation in the pathogenesis of infection was not clear. To our knowledge, the patient described in this study is the first case of denture stomatitis caused directly by *C. dubliniensis* in a teenager wearing an orthopedic oral prosthesis. The clinical presentation of oral candidiasis in this patient, who wore an orthodontic appliance to increase the transversal diameter of

Patient	Germ tube test	Colony color on CHROMagar	Growth at 45°C	ID32C	Serotype	Reactivity anti- <i>C. dubliniensis</i> antiserum	Abundant chlamydospores on Casein agar	Identification
1	+	Green	+	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A
2	+	Green	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A
3	+	Green	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A
4	-	Violet	-	<i>C. glabrata</i>	NA	-	-	<i>C. glabrata</i>
5	+	Green	+	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A
6	-	Violet	-	<i>C. glabrata</i>	NA	-	-	<i>C. glabrata</i>
7	+	Green	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A
8	+	Green	-	<i>C. dubliniensis</i>	A	+	+	<i>C. dubliniensis</i>
9	+	Green	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A
10	+	Green	+	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A
11	+	Green	+	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A
12	+	Green	-	<i>C. albicans</i>	A	-	-	<i>C. albicans</i> serotype A

NA. Not applicable.

Table 1. Characteristics and identification of strains isolated.

the upper jaw, was not different from those observed in the rest of patients.

Differentiation between *C. albicans* and *C. dubliniensis* needs special tests, since conventional tests used in Mycology laboratories are not usually discriminatory. In this study, neither colony color on CHROMagar Candida nor lack of growth at 45 °C were able to identify the *C. dubliniensis* isolate. The ID 32C test, the observation of the abundant chlamyospore production on Casein agar, the reactivity with a *C. dubliniensis* specific antiserum and the PCR were the only tests which allowed the differentiation between *C. dubliniensis* and *C. albicans*. The ID 32C test and the observation of the abundant chlamyospore production on Casein agar can be performed easily in the Mycology laboratories since the ID 32C is commercially available and Casein agar does not need sophisticated materials (14). However, although both tests allowed the identification of *C. dubliniensis*, the ID 32C test has been reported to be unable to identify all isolates of *C. dubliniensis* (11) and the presumptive identification obtained with the production of abundant chlamyospore production on Casein agar should be confirmed by other technique. In addition to the identification of *C. dubliniensis*, the ID 32C test allowed the accurate identification of *C. albicans* and *C. glabrata* isolates.

PCR analysis yielded two types of information. Firstly, it confirmed the identification of patient's 8 isolate as *C. dubliniensis*, since the primers used did not amplify DNA from *C. albicans* isolates (17). Secondly, it was used to obtain the genotype, an information of epidemiological value. *C. dubliniensis* isolate from patient 8 belonged to genotype 1, which is the most frequent (25) and it has been predominantly detected in oral isolates in Spain (17).

In conclusion, results presented in this study demonstrate that *C. dubliniensis* can be isolated from the oral cavity of teenagers with denture stomatitis associated to orthopedic oral prostheses and that it is possible and technically amenable, the differentiation between *C. albicans* y *C. dubliniensis* using the ID 32C test, the observation of abundant chlamyospore production on Casein agar, the reactivity with a *C. dubliniensis* antiserum and the PCR.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Aguirre JM. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol 2002;19:17-21.
2. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. AIDS 1997;11:557-67.
3. Delgado W, Aguirre JM. Las micosis orales en la era del sida. Rev Iberoam Micol 1997;14:14-22.
4. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. N Engl J Med 1991;325:1274-7.
5. Sullivan DJ, Westermeng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995;141:1507-21.
6. Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S, et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. J Clin Microbiol 1997;35:960-4.
7. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, et al. Antifungal drug susceptibility of oral *Candida dubliniensis* isolates

from HIV-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1997;41: 617-23.

8. Salesa R, Moragues MD, Sota R, Pemán J, Quindós G, Pontón J. Specific antibody response in a patient with *Candida dubliniensis* fungemia. Rev Iberoam Micol 2001;18:42-4.
9. Meis JF, Ruhnke M, De Pauw BE, Odds FC, Siebert W, Verweij PE. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. Emerg Infect Dis 1999; 5:150-3.
10. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B, et al. *Candida dubliniensis*: an update. Rev Iberoam Micol 1999;16:72-6.
11. 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 Clin Microbiol 1999;37:3533-9.
12. Pinjon, E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1998;36:2093-5.
13. Odds, FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994;32:1923-9.
14. Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, Al Mosaid A, Coleman DC, Pontón J. Casein agar: a useful medium to differentiate *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2003;41:1259-62.
15. Bikandi J, San Millán R, Moragues MD, Cebas G, Clarke M, Coleman DC, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. J Clin Microbiol 1998; 36:2428-33.
16. Alonso-Vargas R, Garaizar J, Pontón J, Quindós G. Utilidad de la amplificación aleatoria de ADN en la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol 2000;17:10-3.
17. Brena S, Rubio MC, Salesa R, Iglesias I, Gil J, Rezusta A, et al. Genotipos de *Candida dubliniensis* en aislamientos clínicos. Rev Iberoam Micol 2003;en prensa.
18. Linares MJ, Solís F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoam de Micol 2001;11.1-11.18.
19. Barturen B, Bikandi J, San Millán R, Moragues MD, Regúlez P, Quindós G, et al. Variability in expression of antigens responsible for serotype specificity in *Candida albicans*. Microbiology 1995;141:1535-43.
20. Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. Acta Odontol Scand 1990; 48:61-9.
21. Rosa A. Estomatitis protésica en niños con aparatología ortopédica [abstract 86]. En: Libro de Resúmenes de la División Argentina de Investigación Odontológica, 1984.
22. Budtz-Jørgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. Scand J Dent Res 1974; 82:151-90.
23. 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; 31:2124-33.
24. Velegriaki A, Nicolatou O, Theodoridou M, Mostrou G, Legakis NJ. Paediatric AIDS-related linear gingival erythema: a form of erythematous candidiasis? J Oral Pathol Med. 1999;28:178-82.
25. Gee SF, Joly S, Soll DR, Meis JFGM, Verweij PE, Polacheck I, et al. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo. J Clin Microbiol 2002; 40:556-74.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos 9/UPV 0093.327-13550/2001 de la Universidad del País Vasco e IE019, subproyecto Diamolfun del programa Etortek, del Departamento de Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants 9/UPV 0093.327-13550/2001 from the Universidad del País Vasco and IE019, subproject Diamolfun, from the Departamento de Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco.