

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**



**IDENTIFICACIÓN, NIVELES SALIVALES Y PREVALENCIA DE  
LEVADURAS DEL GÉNERO CÁNDIDA EN GRUPOS DE  
PACIENTES CHILENOS CON Y SIN CANDIDIASIS.**

**Nombre del Alumno:  
Giannina Picasso Yaeger**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Leyla Gómez Carranza**

**TUTORES ASOCIADOS  
Prof. Nora Silva Steffens  
Prof. Dra. Gloria García Moreno**

**Santiago - Chile  
2006**



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**



**IDENTIFICACIÓN, NIVELES SALIVALES Y PREVALENCIA DE  
LEVADURAS DEL GÉNERO CÁNDIDA EN GRUPOS DE  
PACIENTES CHILENOS CON Y SIN CANDIDIASIS.**

**Nombre del Alumno:  
Giannina Picasso Yaeger**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Leyla Gómez Carranza**

**TUTORES ASOCIADOS  
Prof. Nora Silva Steffens  
Prof. Dra. Gloria García Moreno**

**Santiago - Chile  
2006**

*A mi familia,  
Carlitos y mi  
amor*

Gracias

## AGRADECIMIENTOS

- A mi familia por apoyarme durante estos 6 años, por estar conmigo incondicionalmente durante toda la carrera.

- A mi hermana Camila por su compañía durante todos los momentos difíciles.

- A Jorge que con su paciencia y cariño, hizo posible la impresión de esta tesis.

- Agradezco a mi profesora titular, profesora Leyla Gómez, por su preocupación y buena voluntad.

- A la profesora Nora Silva por su alegría y paciencia para enseñarme, que cada día me ayudó a trabajar con más ganas.

- A la Sra. Angélica Carrasco y a Jaimito por ayudarme cada vez que lo necesité haciendo posible la realización de este trabajo.

-A la doctora Gloria García del departamento de Patología de la Facultad de odontología de la Universidad de Chile, por haberme facilitado la toma de muestras.

-A mis amigos Dustin Greenhill y Diana Botella por haberme ayudado durante la realización de este trabajo.

## ÍNDICE

Introducción.....	pág.	1
Aspectos teóricos.....	pág.	6
Hipótesis.....	pág.	19
Objetivos.....	pág.	19
Materiales y métodos.....	pág.	21
Resultados.....	pág.	41
Tablas, Gráficos y Fotografías.....	pág.	45
Discusión.....	pág.	61
Conclusiones.....	pág.	72
Sugerencias.....	pág.	74
Resumen.....	pág.	75
Referencias bibliográficas.....	pág.	77
Anexos .....	pág.	84

## INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, relacionado fundamentalmente con el incremento de pacientes inmunodeprimidos, uso generalizado de antibacterianos, utilización de inmunosupresores, maniobras diagnósticas invasivas y el uso de catéteres para alimentación parenteral. Estos nuevos tratamientos y técnicas diagnósticas presentan, como efectos colaterales infecciones oportunistas tales como las infecciones fúngicas. <sup>(1,5,24,26)</sup>

Los hongos generalmente no inducen enfermedad, sin embargo se ha comprobado que *Cándida albicans* y *Cándida tropicalis* poseen mecanismos de virulencia suficientes como para provocar enfermedad cuando son inoculadas en animales. <sup>(28)</sup> Las levaduras del género *Cándida* son microorganismos comensales del ser humano, se encuentran a lo largo del tracto gastrointestinal, en el tracto urogenital y cavidad bucal. <sup>(1,24,26)</sup> Cuando diversos factores alteran el equilibrio hospedero-parásito como por ejemplo el uso de fármacos, enfermedades crónicas, infecciones por virus como el VIH o una fuente endógena, *Cándida spp.* de esta manera asume el papel de patógeno y causa manifestaciones clínicas notorias. Las infecciones oportunistas afectan por lo general a personas que tienen alterados los

mecanismos de defensa del organismo.<sup>(1,3,26,28,29)</sup> de igual manera en pacientes severamente inmunosuprimidos siendo en estos últimos, impresionantes las tasas de Mortalidad y Morbilidad.<sup>(29)</sup> Las enfermedades causadas por levaduras del género *Cándida* no son transmisibles de un paciente a otro, aunque se han reportado casos de transmisión entre compañeros sexuales, a través de las manos de personal de salud y durante el nacimiento donde la infección va desde la vagina a la orofaringe.<sup>(26,28)</sup>

La Candidiasis es una de las enfermedades más frecuentes de la mucosa bucal y, sin duda, la afección micótica más común en esta localización. La magnitud de la infección micótica depende fundamentalmente de las condiciones del hospedero, pues el establecimiento del cuadro clínico ocurre cuando se perturban los parámetros de equilibrio fisiológico que mantienen la homeostasis del medio bucal.<sup>(2,5)</sup> Esta enfermedad se puede manifestar de diferentes formas; así, cuando se inspecciona la mucosa bucal, los signos principales son el eritema y los depósitos blanquecinos que se desprenden al raspado, a veces podemos encontrar fisuras o queilitis asociadas. La sintomatología es variable y generalmente mínima, desde asintomática hasta cuadros de disgeusia, ardor o quemazón de variada intensidad.<sup>(3,24,26,27)</sup>

La gran mayoría de las infecciones fúngicas orales son producidas por *Cándida albicans* (más del 50%), aunque hay que destacar el aislamiento, con

una frecuencia cada vez más elevada, de otras especies como *Cándida tropicalis*, *Cándida glabrata*, *Cándida parapsilosis*, *Cándida krusei*, *Cándida lusitaniae*, *Cándida guilliermondii*, *Cándida kefyr*, *Cándida famata*, *Cándida zeylanoides* y *Cándida dubliniensis*.<sup>(4,6,7,8,10,14,22,23,24,25)</sup>

Las levaduras del género *Cándida* pueden causar un gran número de cuadros clínicos, con manifestaciones variadas que dependen del lugar de la infección y del tipo de paciente. Diferenciar entre colonización e infección es un punto clave a la hora de realizar el diagnóstico microbiológico a partir de las distintas muestras clínicas.<sup>(24,25)</sup>

El Odontólogo debe ser capaz de diagnosticar las manifestaciones bucales clínicas de Candidiasis y establecer pautas terapéuticas para evitar complicaciones que puedan repercutir en un deterioro físico de los pacientes y mejorar así su calidad de vida.

Hay reportes como los estudios realizados y evaluados por Panagakos y cols, en donde certifican que en las fuentes de agua que surten la unidad odontológica es frecuente aislar colonias de *Cándida albicans* en aquellos equipos con mantenimiento deficiente.<sup>(26)</sup>

Las infecciones micóticas por *C. albicans* se localizan en la cavidad bucal y es muy poco frecuente que se extiendan hacia la faringe y esófago, algunos casos evolucionan hacia una candidiasis mucocutánea crónica. Tan solo se

puede establecer que este tipo de patología es localizada y benigna asociada con alteraciones poliendocrinas y defectos de los mecanismos inmunitarios. En la mayoría de los casos estas son lesiones benignas, superficiales y restringidas. Este tipo de infecciones en su totalidad no son mortales, aunque pueden atacar a nivel sistémico. La afección del Sistema Nervioso Central (SNC) por *C. albicans* suele producirse por una Candidiasis diseminada; puede existir afección del parénquima cerebral y de las meninges. Las lesiones suelen ser microabscesos y la sintomatología es variable pudiendo manifestarse inicialmente como un coma. En el corazón *C. albicans* puede causar endocarditis, miocarditis y pericarditis con una alta tasa de mortalidad, de aquí la importancia de realizar un diagnóstico oportuno y un tratamiento correcto de la candidiasis superficiales, como es el caso de la Candidiasis oral evitando así la diseminación del microorganismo a otros órganos en el hospedero. <sup>(24,28)</sup>

El diagnóstico microbiológico de la enfermedad micótica, se realiza en el Laboratorio de Microbiología, aquí es donde las muestras son procesadas para identificar el agente etiológico de esta enfermedad infecciosa. <sup>(23,24)</sup>.

En la actualidad, debido al diferente patrón y grado de sensibilidad de las distintas especies de *Cándida*, y al aumento que se ha registrado en la resistencia a los antifúngicos, es aconsejable la identificación de especie de las

levaduras aisladas de muestras clínicas con el fin de realizar un adecuado tratamiento.<sup>(27)</sup>

De acuerdo a los antecedentes expuestos el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de microorganismos del género *Cándida* en la cavidad oral por medio de un estudio microbiológico, simultáneamente cuantificar e identificar las especies presentes en saliva y mucosa oral de un grupo de pacientes con Candidiasis bucal y de un grupo de pacientes sin Candidiasis bucal, con el fin de obtener esta información en pacientes chilenos y poder adecuar las terapias de tratamiento a la realidad de nuestro país, debido a que la mayor parte de los estudios de prevalencia e identificación de estos microorganismos en la cavidad bucal se han llevado a cabo en otros países, donde la población difiere de la nuestra en hábitos de vida y nivel socioeconómico-cultural; lo cual incide en la salud bucal de los individuos.<sup>(30)</sup>

## **MARCO TEÓRICO**

En los últimos años se ha observado un aumento importante en la prevalencia de las infecciones micóticas, lo que junto con las especiales características biológicas de estos microorganismos, hace que se constituyan en un atractivo tema de estudio. <sup>(1,7,8)</sup>

Las levaduras del Género *Cándida* son microorganismos eucarióticos unicelulares imperfectos, aerobios que pertenecen al Reino Hongo, poseen forma ovalada, se tiñen con Gram de color violeta y forman parte de la microbiota normal de la mucosa de la cavidad bucal, intestino, vagina y zona perianal de algunos individuos.<sup>(2)</sup> Estos microorganismos se reproducen por medio de yemas; pueden aparecer bajo ciertas condiciones microambientales, como levaduras en su forma unicelular o bien, como pseudomicelio en su forma pluricelular. Sus extremos se pueden elongar en largos filamentos llamados pseudohifas; estos filamentos se originan por un simple proceso de geminación o brotación, sin separación de las células, quedando unidas por los polos y no por un crecimiento longitudinal de los tubos germinativos como un micelio verdadero. <sup>(3,4,5)</sup>

Existen variadas opiniones en relación a si es habitual su presencia en boca como representante de la microbiota normal, o bien, si su aparición sería consecuencia de una invasión secundaria debida a diversos factores, tales

como, nutricionales, traumáticos, fisiológicos, endocrinos, antibioticoterapia u otros. <sup>(1,5,8,13)</sup> Sin embargo, hoy existe información referente a que un alto porcentaje de la población adulta está colonizada por *Cándida*, <sup>(23)</sup> aproximadamente el 60% de los adultos sanos y un 45% a un 50% de los niños sanos tienen *Cándida spp.* como microorganismos comensales, sin presentar ningún signo o síntoma de enfermedad en las mucosas. <sup>(22)</sup> Por lo tanto, la sola presencia de este microorganismo no es indicativo de enfermedad, para que esto ocurra, es necesario que se conjuguen una serie de elementos como alteraciones en las defensas del hospedero, la capacidad patogénica del microorganismo y factores predisponentes, los cuales normalmente se encuentran en equilibrio. <sup>(1,2,4,5)</sup>

En general, la literatura entrega variados porcentajes de aislamiento de levaduras del género *Cándida* en la cavidad bucal de individuos sanos. Es así como Baile y Hernández obtuvieron de su estudio 26% de *Cándida* con un 93,3% de la especie *albicans*. Bartel y Blecman, en tanto, encontraron prevalencia de *Cándida* en individuos sanos que variaba entre un 33% a un 40%. T.M. Arendorf y D.M.Walkers, por su parte, hallaron que el 44,4% de los pacientes sanos examinados presentaban *Cándida* en la cavidad oral, y el 88% correspondía a la especie *albicans*. <sup>(2,4,8,10,11,12)</sup>

Un estudio determinó que los pacientes que padecen desórdenes sistémicos e ingieren medicamentos que provocan hiposalia como reacción adversa, presentan altos niveles de *Cándida* en la saliva. <sup>(22,23)</sup> Otro estudio, determinó que valores mayores a 400 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de saliva, provocaban la aparición de los signos clínicos de Candidiasis. Sin embargo, existía una minoría de pacientes con niveles mayores a ese valor, que no padecían la enfermedad, lo cual puede indicar el rol contribuyente de otros factores tanto locales como sistémicos, que junto con la presencia de *Cándida* desarrollan Candidiasis. <sup>(22)</sup> Numerosas publicaciones han demostrado altos niveles de *Cándida* en saliva asociados a presencia de signos clínicos de Candidiasis. <sup>(12,23)</sup> Epstein et al, estableció que recuentos superiores a 400 U.F.C./ml. de saliva, era indicativo de Candidiasis. <sup>(22,23)</sup>

Otro estudio planteó que los pacientes que manifestaban signos clínicos de la enfermedad tenían recuentos que iban entre los  $3,8 \times 10^3$  UFC/ml y  $1 \times 10^4$  UFC/ml, además se determinó a *Cándida albicans* como la especie más frecuente con un 84,8%, el porcentaje restante se repartía entre las especies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. <sup>(22,23)</sup>

Las investigaciones antes mencionadas no son coincidentes entre sí, por lo tanto, es importante realizar este estudio en la población chilena, con el fin de que esto permita establecer la prevalencia y la cantidad de levaduras del género

*Cándida* en la población sana que pueda considerarse normal, como también cuantificar las U.F.C./ml en saliva y a su vez determinar las especies presentes. Toda esta información permitirá establecer la prevalencia de este microorganismo en un grupo de pacientes chilenos con Candidiasis y comparar con individuos sanos, afín de establecer nuestros propios patrones de tratamiento.

### **Relación hospedero-parásito**

El organismo humano, está provisto de sistemas de protección específicos e innatos para asegurar su integridad. Los sistemas innatos constituyen una primera barrera defensiva, la cual, puede ser sobrepasada por los agentes infecciosos. Cuando esto ocurre, se desencadena la respuesta adquirida, como reacción específica del hospedero frente a la infección. Esta respuesta es de 2 tipos, celular y humoral. <sup>(1,5,12)</sup> Según Budtz-Jøergensen en el caso de las infecciones por *Cándida*, la respuesta fundamental sería de orden celular, lo que estaría avalado por múltiples estudios que muestran los bajos niveles de anticuerpos circulantes en comparación a infecciones bacterianas o virales. Además, se ha visto que la *Cándida* tendría un bajo poder de invasión o penetración de los tejidos. <sup>(2,12,14)</sup>

*Cándida*, se considera un hongo oportunista, ya que puede causar enfermedad cuando las condiciones del hospedero son óptimas para su proliferación; causando una micosis conocida como Candidiasis.<sup>(2)</sup>

*Cándida albicans* es la especie de *Cándida* con mayor capacidad de adhesión a las células epiteliales bucales y vaginales, hecho que está relacionado con su mayor presencia como colonizador de estas mucosas humanas puesto que la adhesión a células y superficies es el primer paso para la posterior invasión a los tejidos. La adhesión de *Cándida* a la mucosa bucal está favorecida por diferentes factores del hongo, como la transición fenotípica, ya que las hifas se producen en el momento de la invasión a los tejidos, y a la producción de enzimas extracelulares como proteinasas y fosfolipasas.

Los materiales biomédicos pueden ser colonizados por microorganismos que forman un biofilm adherente sobre la superficie de éstos. *Cándida albicans* y *parapsilosis* son las especies que con más frecuencia forman biofilm, aunque *Cándida dubliniensis*, con un hábitat preferentemente oral, es una eficaz productora de biopelículas sobre superficies acrílicas.<sup>(11)</sup>

Como ya se mencionó, la frecuencia de infecciones causadas por hongos, tanto cutáneas como mucosales han aumentado en el mundo en los últimos años.<sup>(1)</sup> Las enfermedades fúngicas más frecuentes son aquellas causadas por especies del género *Cándida*; *Cándida albicans* es la especie principal asociada a

estas patologías, siendo la más patógena del género gracias a sus mecanismos de virulencia <sup>(1,6,7)</sup>

El proceso de cambio desde agente comensal a patógeno depende de la existencia de una serie de factores predisponentes que se clasifican en sistémicos o locales, los cuales descompensan la relación hospedero-parásito. <sup>(2,3,11)</sup> Dentro de los factores predisponentes que han sido identificados jugando un rol significativo en el desarrollo de Candidiasis oral, se encuentra: baja secreción salival, pobre higiene oral, prótesis orales removibles, terapia con corticoides, antibiótico terapia, antidepresivos, diuréticos, analgésicos-antiinflamatorios; enfermedades sistémicas tales como diabetes, hipertensión, inmunosupresión, anemia, leucemia. <sup>(3,12)</sup>

Candidiasis oral es una de las presentaciones clínicas de mayor prevalencia entre las infecciones causadas por hongos unicelulares, sobre todo en pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) u otras inmunodeficiencias como el Síndrome de Job o síndrome del leucocito "flojo", la enfermedad granulomatosa crónica o en el síndrome de Chediak-Higashi, los portadores de neoplasias malignas generalizadas que reciben quimioterapia, el síndrome de Goodpasture o la granulomatosis de Wegener y los receptores de trasplantes alogénicos. <sup>(4,5)</sup>

*Cándida albicans* puede convertirse en un patógeno capaz de causar una serie de infecciones orales como candidiasis pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica, así como lesiones asociadas; estomatitis protésica, queilitis angular y glositis rómbica. Este microorganismo puede ser el agente causante del eritema gingival lineal y periodontitis necrótica en pacientes con infecciones por VIH. <sup>(5)</sup>

La estomatitis subprotésica asociada a *Cándida albicans* es un proceso inflamatorio de la mucosa bucal. En los casos de prótesis mal adaptadas se manifiesta como placas eritematosas pudiendo ser este un factor de predisposición al igual que la reacción inflamatoria en la Queilosis de las comisuras de los labios. <sup>(1)</sup> Sus principales formas clínicas son la atrófica y la hiperplásica. Se observa con mayor frecuencia en mujeres, principalmente con localización maxilar, en la superficie del paladar en contacto con la prótesis dental. Esta lesión tiene una etiología multifactorial y ha sido asociada con la presencia de *Cándida albicans* y otros microorganismos bucales. <sup>(11,12)</sup>

Como ya se mencionó, el agente etiológico más importante de la Candidiasis oral es *Cándida albicans*, pero, la incidencia de las infecciones causadas por otras especies como *Cándida krusei*, *Cándida tropicales*, *Cándida glabrata* y *Cándida dubliniensis* ha ido aumentando progresivamente. 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 comúnmente utilizados como el fluconazol, puede haber llevado a su selección. <sup>(4,6)</sup>

### **Características específicas de *Cándida albicans***

Las levaduras en general, necesitan medios especiales para su cultivo: una fuente de Carbono, Nitrógeno y Fosfato además de un ph adecuado. El Agar Sabouraud es el medio de cultivo más usado, ya que posee un alto contenido de glucosa y ph 5, todo lo cual favorece el desarrollo de las levaduras. El cultivo de *Cándida albicans* puede realizarse en un rango de temperatura de 20 a 40°C, siendo óptimo los 37°C, y a un pH entre 2 y 8, lo cual indica un gran poder de adaptación de este microorganismo.

Entre las 24 y 48 hrs se podrán visualizar los cultivos positivos. *Cándida albicans* se caracteriza por formar colonias cremosas, lisas, opacas, blanquecinas y con olor característico. Microscópicamente la podemos observar como estructuras redondas u ovaladas, se tiñen con Gram de color violeta, poseen un diámetro aproximado de 2,5 a 6u, o bien formando pseudomicelio, el cuál está constituido por pseudohifas, las cuales a su vez se forman por la elongación de las blastoconidias o unidades celulares de levaduras.

*Cándida albicans* y *Cándida dubliniensis* poseen una característica diferencial en relación a las otras especies de *Cándida*, esta es la capacidad de

formar clamidosporas en condiciones adversas o bien en medios de cultivos pobres. Estas estructuras son formas de resistencia de estas especies, presentan un aspecto esférico con un diámetro aproximado de 6 a 17u, que se ubican generalmente en el extremo de las pseudohifas. <sup>(8,9,13,20)</sup>

Otra característica exclusiva de esta especie es lo que ocurre al cultivarla en plasma humano a 37°C donde se puede observar a los 90 minutos aproximadamente la producción de un tubo germinal, un apéndice elongado, que tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble de largo de la célula con paredes paralelas y sin constricciones en el inicio. <sup>(5,6,11,12,31,32)</sup>

### **Cándida dubliniensis**

La estrecha relación fenotípica y genotípica que existe entre *Cándida albicans* y *Cándida dubliniensis* ha llevado a identificar incorrectamente la mayoría de los aislamientos de *Cándida dubliniensis* como *Cándida albicans* dificultando un análisis exhaustivo de esta especie. Ambas especies son capaces de formar tubo germinativo y clamidosporas, debido a ello, hoy en día no es suficiente hacer estas pruebas para identificar *Cándida albicans*, siendo necesario realizar nuevas técnicas diagnósticas. <sup>(6,8 -10,14,17,18,21)</sup>

Como consecuencia del aumento de reportes de aislamiento de esta especie de *Cándida* es importante contar con métodos rápidos y efectivos que permitan identificarla en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico micológico.

*Cándida dubliniensis* fue descrita por primera vez en Dublín en 1995 en aislamientos procedentes de pacientes infectados con el VIH que presentaban signos clínicos de Candidiasis oral. La manifestación clínica más común causada por *Cándida dubliniensis* en la población infectada con VIH en Irlanda, es Candidiasis eritematosa. <sup>(6)</sup>

Este hongo que principalmente coloniza cavidad oral en individuos infectados ha sido aislado también en sangre, esputo, vagina, orina, y materia fecal. <sup>(8,19,21)</sup>

Hasta la fecha no hay reportes que indiquen la participación de esta especie en desórdenes sistémicos tanto en individuos inmunocompetentes como en inmunodeprimidos. Esto sugiere que la cavidad oral debe ser el nicho ecológico natural para *Cándida dubliniensis*, aunque es posible que este microorganismo ocupe otros sitios anatómicos y esté presente en otras especies animales. Aunque han sido descritas infecciones en pacientes sanos causadas por *Cándida dubliniensis*, esto es hasta el momento de muy baja incidencia. Esto sugiere que el sistema inmune en conjunto con la microbiota normal mantienen un equilibrio con este microorganismo evitando su crecimiento, y solo

se pierde en condiciones de inmunosupresión como es el caso de los pacientes con SIDA, donde los linfocitos T disminuyen y la habilidad del sistema de mantener *Cándida dubliniensis* en niveles bajos también disminuye. <sup>(6)</sup>

A pesar de que este hongo ha sido aislado principalmente en cavidad oral de individuos infectados por el VIH, el número de reportes en individuos sanos ha ido aumentando. <sup>(6,8,14,15)</sup> En 1997 Coleman y Sullivan, reportaron aislamiento de un 18-32% en Irlanda en individuos infectados por el VIH. En 1998 en USA se reportó un 11,17% para el mismo grupo de individuos. En 1999 Meiller y otros reportan un 25% para individuos infectados por VIH <sup>(21)</sup> y alrededor de un 3% en individuos sanos. <sup>(19,20,21)</sup> En Brasil Junio de 2003 Priscila de Late y otros reportan un 81.8% de *Cándida dubliniensis* en cavidad oral de individuos infectados por VIH. <sup>(19,20)</sup>

En los últimos años se han desarrollado una serie de pruebas fenotípicas y genotípicas que han permitido la identificación rápida y fiable de *Cándida dubliniensis* en muestras clínicas. <sup>(4)</sup> Estos métodos de identificación deben poder ser aplicados a un volumen amplio de muestras, ser de bajo costo, fáciles de aplicar y reproducibles. Debido a las similitudes fenotípicas entre *Cándida dubliniensis* y *Cándida albicans* se ha preferido utilizar métodos genéticos más sofisticados ya que, las diferencias genotípicas entre estas 2 especies son más marcadas. Sin embargo, las técnicas utilizadas para detectar estas diferencias

genéticas consumen mucho tiempo, son de alto costo y no son aplicables a un gran número de muestras. Afortunadamente varias pruebas fenotípicas pueden ser utilizadas para diferenciar *Cándida dubliniensis* y *Cándida albicans* del resto de especies de *Cándidas* por el hecho que solo estas 2 especies producen tubo germinativo y clamidosporas. <sup>(6,8)</sup>

La capacidad de formar clamidosporas en agar caseína a 24°C por 48 horas provee un método de diferenciación entre *Cándida albicans* y *Cándida dubliniensis*. Las clamidosporas de *Cándida dubliniensis* son abundantes, dobles y triples, mientras que *Cándida albicans* no forma clamidosporas en este medio, y cuando se forman, son simples y escasas. <sup>(14,16)</sup> Además, *Cándida dubliniensis* no presenta crecimiento a 45°C o más, lo cual la diferencia de *Cándida albicans*. <sup>(6,15,16,20)</sup>

La introducción de un nuevo medio de cultivo para analizar *Cándida* ha sido de gran utilidad, este medio es el CHROMagar. Es un medio de cultivo sólido que contiene sustratos cromogénicos, permite diferenciar varias especies distintas dentro del género, basándose en el color de la colonia. La colonia que forma *Cándida albicans* es de color verde, lo cual la diferencia claramente de las formadas por otras especies las cuales son de color violeta a blanco pasando por distintos tonos según la especie. Cuando se cultiva *Cándida dubliniensis* en este medio forma colonias de color verde oscuro a diferencia de *Cándida*

*albicans* que forma colonias verde-azul claro; pero esta leve diferencia es muy subjetiva por lo que no es suficiente para hacer una identificación entre *Cándida albicans* y *Cándida dubliniensis*.<sup>(7,17)</sup>

Por otra parte, se ha demostrado la habilidad de *Cándida dubliniensis* de desarrollar rápidamente resistencia *in vitro* estable al fluconazol, si esto ocurre “*in vivo*”, puede explicar, por lo menos en parte, su emergencia reciente como patógeno oportunista en la cavidad oral de pacientes con SIDA, los cuales son tratados a menudo con esta droga.<sup>(6)</sup>

## **HIPÓTESIS**

*Cándida albicans* se aísla en niveles estadísticamente significativos en la cavidad bucal de un grupo de pacientes chilenos con Candidiasis comparado con control sano.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Identificar especies de levaduras del género *Cándida* en grupos de pacientes chilenos con y sin Candidiasis bucal. Establecer su prevalencia y determinar los niveles salivales.

### **Objetivos Específicos:**

- 1.- Aislar e identificar especies de levaduras del género *Cándida* obtenidos de saliva y mucosa bucal, en pacientes con y sin Candidiasis.
- 2.- Establecer la prevalencia de levaduras del género *Cándida* obtenidos de

saliva y mucosa bucal, en pacientes con y sin Candidiasis.

3.- Determinar niveles salivales de levaduras del género Cándida obtenidos en pacientes con y sin Candidiasis.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **I.- Descripción del Grupo humano:**

El presente trabajo comprendió un total de 120 pacientes de ambos sexos, cuyas edades fluctuaban entre 33 y 89 años, estos eran atendidos en el área de prótesis removibles de los hospitales El Salvador y San José, de Santiago; durante el periodo mayo - septiembre de 2005.

Del total de pacientes, 60 presentaron Candidiasis oral, los que se agruparon en el grupo experimental, el grupo control lo formaron los 60 pacientes restantes que no presentaban Candidiasis oral.

Previo consentimiento informado, examen clínico y llenado de la ficha clínica diseñada para este estudio, a cada paciente, de ambos grupos, se le tomaron dos muestras diferentes. **(Anexo)**

#### **1- Criterios de inclusión grupo control:**

- a).-No presentar enfermedades sistémicas. (Diabetes, Cáncer, Sida, Alcoholismo)
- b).-No presentar condición de inmunosupresión.
- c).-No presentar Candidiasis bucal.

- d).-No haber estado sometido el último mes a tratamiento antibiótico, tanto con antibacterianos como con antimicóticos.
- e).-No usar antidepresivos o inhaladores bucales.
- f).-No usar aparatos protésicos.
- g).-No presentar aftas ni otras lesiones de la mucosa bucal.
- h).-No presentar hiposialia.
- i).-No estar embarazada.

2- Criterios de exclusión grupo control:

- a).-No aceptar la participación en el estudio.
- b).-Presentar enfermedades sistémicas (Diabetes, Cáncer, SIDA, alcoholismo, drogadicción, asma bronquial, bronquitis obstructiva)
- c).-Presencia de aftas u otras lesiones de la mucosa bucal.
- d).-Presentar alguna condición de inmunosupresión.
- e).-Candidiasis bucal.
- f).-Tratamiento antibiótico anterior (menos de un mes) con antibacterianos o antimicóticos.
- g).- Uso de antidepresivos, inhaladores.
- h).-Uso de aparatos protésicos.
- i).-Hiposialia

j).-Embarazo

3- Criterios de inclusión grupo experimental:

- a).-Aceptar la participación en este estudio (firma de consentimiento informado).
- b).-Cursar un cuadro clínico de Candidiasis bucal, independiente de la causa.
- c).- Edad superior a 25 años.

4- Criterios de exclusión grupo experimental:

- a).- No aceptar participar en el estudio
- b).- No presentar Candidiasis
- c).- Edad inferior a 25 años

**II.- Análisis clínico**

A todos los pacientes, se les realizó una anamnesis previa, la historia clínica general de cada paciente fue revisada minuciosamente. A los pacientes del grupo control, la anamnesis buscó descartar del estudio a aquellos que tuvieran alguna enfermedad sistémica debilitante o estuvieran ingiriendo algún

medicamento, como se describe en los criterios de inclusión y exclusión para este grupo. Se confeccionó una ficha clínica diseñada especialmente para este estudio considerando los criterios de inclusión y exclusión respectivos.

Diagnóstico clínico de Candidiasis:

Se realizó por 2 personas calibradas (G.P y C.T), con la supervisión de un Cirujano Dentista especialista en Patología Oral de la Universidad de Chile, según los parámetros clínicos descritos por Pindborg, quien describe 4 tipos clínicos importantes; Candidiasis seudomembranosa, Candidiasis hiperplásica, Candidiasis eritematosa y Queilitis angular.

Se consideraron clínicamente sanos a aquellos individuos que presentaban una mucosa palatina, bucal y lingual de aspecto y coloración normal.

### III.-Toma de Muestras

Para la obtención de una muestra apropiada, a cada paciente se le solicitó suspender el uso de colutorios bucales 15 días antes de la toma de la muestra, el día de la citación debía estar en ayunas de 2 horas, sin haber fumado ni realizado ningún procedimiento de higiene bucal en las 2 horas previas a la toma de las muestras.

- Muestra de saliva no estimulada:

A cada individuo se le solicitó que depositara en un tubo de ensayo estéril aproximadamente 2 ml. de saliva, el tubo fue sellado y rotulado. Las muestras fueron trasladadas refrigeradas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, siendo procesadas en un plazo inferior a 12 horas.

- Muestra de mucosa bucal:

Se frotó con tórula estéril humedecida con 100  $\mu$ l de buffer fosfato de potasio pH 7.4 estéril, la zona vestibular del maxilar inferior, cara ventral de lengua y mucosa palatina. Las tómulas con muestra se depositaron en tubos de ensayo estériles rotulados y sellados, las muestras fueron trasladadas

refrigerados al laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, siendo procesadas en un plazo no mayor a 12 horas.

#### IV.- Procesamiento de las Muestras

- Muestra de saliva no estimulada:

Para obtener la cantidad de colonias de levaduras por ml de saliva unidades formadoras de colonias (UFC), se realizó el método de recuento viable en placa de agar, para ello, se realizaron diluciones en base 10 de las muestras de saliva en buffer fosfato de potasio pH 7.4 estéril.

Cada muestra de saliva fue agitada en un Vortex (Thermolyne Maxi Mix II) por 30 segundos con el fin de homogeneizar la muestra; 100 µl de la saliva se diluyeron en 900 µl de buffer fosfato de potasio pH 7.4 estéril, se homogeneizó en Vortex, de esta dilución se tomaron 100 µl diluyendo nuevamente en 900 µl de buffer fosfato de potasio pH 7.4 estéril, que también se agitó en Vortex a velocidad máxima. De esta última dilución(1/100) se sembraron 100 µl en placa de agar Sabouraud más Cloramfenicol (0,5mg/ml)

Las muestras así procesadas fueron incubadas en estufa Pasteur a 37°C por 24 a 48 hrs, en condiciones de aerobiosis.

**Análisis microscópico:** a las placas que presentaron desarrollo microbiano, se realizó frotis y tinción Gram a una colonia representativa. Se observó con microscopio de transmisión (Zeiss, Axiostar plus) con 100X, para verificar presencia de levaduras (**Foto N° 2**). Posteriormente se procedió a hacer el recuento a ojo desnudo de las colonias de levaduras, el resultado de cada recuento se multiplicó por el factor de dilución obteniendo de esta forma las UFC de levaduras por ml de saliva (**Foto N° 1**).

- Muestra de mucosa bucal:

La muestra fue sembrada con la misma tórula directamente, sin diluciones, en agar Sabouraud más Cloramfenicol (0,5mg/ml). Se incubó en estufa Pasteur a 37°C por 24 a 48hrs, pasado el período de incubación se analizaron las colonias.

**Análisis macroscópico:** se realizaron las observaciones directas de las placas de agar para verificar el desarrollo de colonias. Aquellas placas donde había desarrollo se consideraron positivas para prevalencia de levaduras en mucosa oral. (**Foto N° 1**)

**Análisis microscópico:** a las placas que presentaron desarrollo, se realizó frotis y tinción de Gram a una colonia representativa, se observó con microscopio de transmisión a 100X, para verificar presencia de levaduras. **(Foto N° 2)**

Los aislados así obtenidas tanto de saliva como de mucosa bucal fueron criopreservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realizar posteriormente la identificación de especie utilizando diversas pruebas de laboratorio.

#### **Criopreservación de los aislados obtenidos en agar Sabouraud**

A partir de una colonia de levadura identificada por Gram se sembró en 2 ml de caldo Todd Hewitt, se incubó en estufa Pasteur a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Luego de verificar el crecimiento en el caldo y realizar un Gram para verificar la pureza del aislado, se procedió a homogeneizar el cultivo, éste se envasó en viales para criopreservar, que contenían glicerol estéril. En cantidades que permitían obtener una concentración final de 20%, cada vial fue correctamente rotulado y guardado en freezer a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## V.- Identificación de especie

Los aislados estaban criopreservados por lo que hubo que descongelarlos, de cada uno se sembró 100 µl en 2 ml de caldo Todd Hewitt, se incubó en estufa Pasteur a 37°C por 24 horas. A partir del caldo con desarrollo se sembró 50 µl en placas de Agar Sabouraud más Cloramfenicol (0,5 mg /ml) y se incubó en estufa Pasteur a 37°C por 24 horas para obtener aislados frescos.

A cada aislado obtenido en el agar Sabouraud se realizó las siguientes pruebas de laboratorio:

- Microcultivo en agar Maiz
- Prueba del tubo germinativo
- Siembra en CROMO agar
- Auxonograma
- API 20 C AUX bioMérieux® sa
- Siembra en Agar Caseína
- Crecimiento a 45°C

### 1- Microcultivo:

Al interior de una placa de Petri se colocó un pedazo de papel filtro y dos varillas de vidrio como soporte, cortadas de un tamaño adecuado en forma de U. Se colocó un portaobjeto sobre las varillas y se esterilizó todo junto. Bajo campana de flujo laminar, en ambiente estéril, se depositó sobre cada portaobjeto 2 ml de agar maíz y se dejó enfriar para permitir solidificar. De una colonia de levadura fresca crecida en agar Sabouraud (de 24 a 48 h de desarrollo), se sembró en líneas paralelas sobre la superficie del agar Maíz, sobre la siembra se colocó un cubreobjeto estéril y se agregó agua destilada estéril al fondo de la placa, mojando totalmente el papel filtro; la placa de petri se tapó (cámara húmeda); y se incubó a 25°C por 48 horas.

Transcurrido este tiempo, se observó el portaobjeto con la siembra en el microscopio de transmisión a 10X y 40X, verificando la presencia de Clamidosporas terminales o subterminales, blastosporas y pseudohifas. Si se observaban Clamidosporas se consideró la prueba positiva para la identificación parcial de *Cándida albicans*. Las muestras que no presentaron Clamidosporas fueron clasificadas parcialmente como no albicans. <sup>(2,3,4,16,17,18)</sup>

**(Foto N° 3)**

## 2- Tubo germinativo:

Se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

A partir de una colonia aislada de levaduras de un cultivo fresco de 24 a 48 h de desarrollo, se sembró un inóculo en 0,5 ml de suero humano, procedente de un individuo sano, se incubó a 37° C por 2 horas, se tomó una gota de la suspensión y se depositó sobre un portaobjetos, cubriendo la preparación con cubreobjetos se observó al microscopio de transmisión con 10X y 40X la presencia de tubos germinativos. Un tubo germinativo se definió como un apéndice con la mitad de ancho y 3 a 4 veces el largo de la célula de la cual emerge, se consideró positiva la prueba cuando había formación de un tubo delgado de paredes rectas, paralelas sin puntos de constricción en el inicio del tubo.

Ambas especies: *C. dubliniensis* y *C. albicans* producen estos tubos germinales. <sup>(8,13)</sup> Las muestras que presentaron tubo germinativo fueron consideradas parcialmente como *C. albicans*, las muestras que no presentaron tubo germinativo fueron consideradas parcialmente como no albicans.

**(Foto N° 4)**

### 3- CHROMagar:

#### **Identificación mediante criterios bioquímicos basados en sistemas enzimáticos**

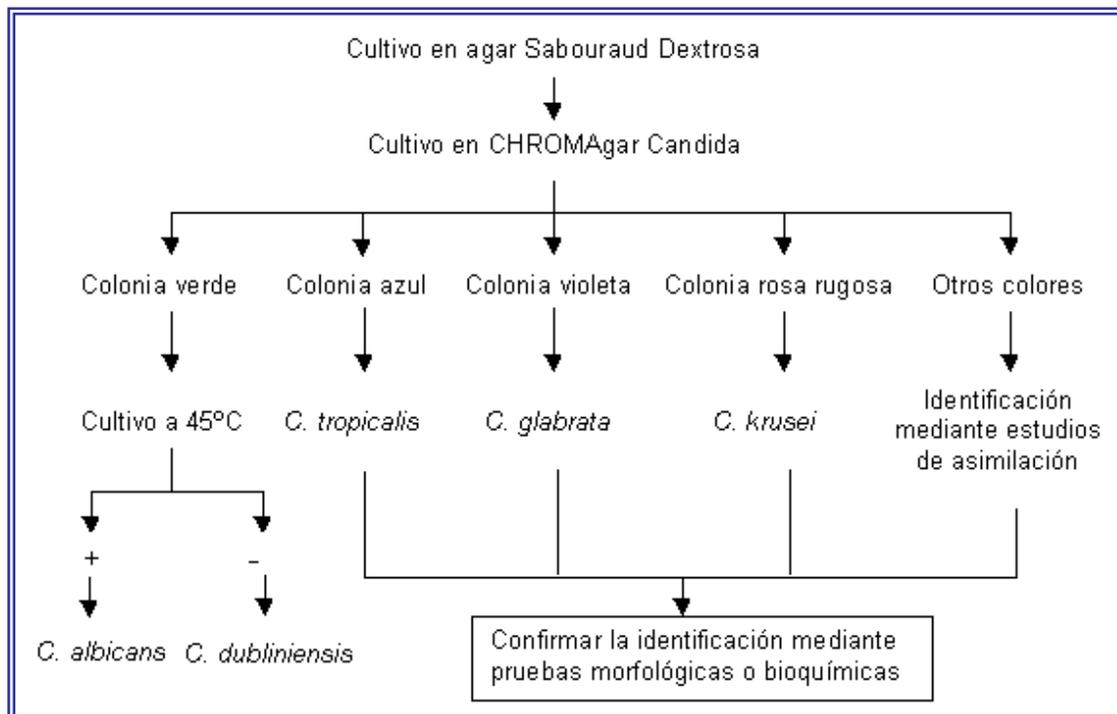
**-Medios de cultivo cromogénicos:** se trata de medios diseñados para aislar e identificar simultáneamente especies del género *Candida*, tras 24-48 h de incubación a 35-37°C. El fundamento es la capacidad de hidrolizar sustratos cromogénicos en presencia de un indicador.

Para la identificación de las especies de levaduras en agar cromogénico, se inoculó una asada de un cultivo fresco en agar Sabouraud en una placa de Cromo Agar. Los cultivos fueron incubados a 37° C y examinados visualmente a las 48 y 72 h para evaluar la morfología y el color de las colonias. Las cepas fueron identificadas en este medio de acuerdo a instrucciones del fabricante y a las características de las colonias publicadas por Odss y Bernaerts. *C. albicans* da origen en este medio a colonias verdes, *C. glabrata* genera colonias rosa a rojizo púrpura, *C. tropicalis* desarrolla colonias azules, *C. krusei* forma colonias rosadas pálidas con bordes blancos y *C. parapsilosis* da origen a colonias blanco marfil. (7,8,16,17)

**Diferenciación de las colonias de *Candida* en CHROMagar.**

<b>Especie</b>	<b>Característica de la colonia</b>	<b>Color</b>
<i>C. albicans</i>	Lisa, crece a 45°C	Verde esmeralda
<i>C. dubliniensis</i>	Lisa, no crece a 45°C	Verde esmeralda
<i>C. tropicalis</i>	Lisa	Azul oscuro con halo marrón
<i>C. krusei</i>	Rugosa	Rosa con halo blanco
<i>C. glabrata</i>	Brillante y cremosa	Violeta

**Esquema de Identificación de especie del género *Cándida* en  
CHROMagar *Cándida*.**



Las colonias de color verde se consideraron *Cándida albicans*, temporalmente, en espera de realizar otros métodos de identificación. Las colonias de color diferente al verde fueron consideradas no albicans hasta realizar otras técnicas para identificación de estos aislados.

**(Foto N° 5)**

#### 4- Auxonograma: <sup>(18)</sup>

##### **Identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes**

Se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo. En nuestro estudio se utilizó medio de cultivo C (Sulfato amónico, Fosfato monopotásico, Sulfato de magnesio y Agar) como medio base y glusidiscos (discos de papel filtro embebidos en diferentes azúcares) para identificar las diferentes especies de levaduras.

##### **Procedimiento:**

a).- La levadura a identificar se sembró previamente en agar Sabouraud más cloramfenicol (0,5mg/ml) a 37 °C durante 48 hrs, para la obtención de colonias frescas.

b).- Se realizó una suspensión de la levadura en estudio en 2 ml de suero fisiológico estéril hasta obtener una turbidez igual a la escala 5 de McFarland.

c).- Se transfirió esta suspensión a un tubo con 20 ml de medio C fundido y se homogeneizó, obteniendo una solución 1/10; luego la mezcla se dispensó en placas de Petri estériles de 13 cm de diámetro y se esperó que solidificara.

d).- Sobre el agar solidificado se colocaron los glucidiscos equidistantes unos de otros, en el siguiente orden y se cultivó durante 48 hrs a 25°C.

<b>Rafinosa</b>	<b>R</b>
<b>Celiobiosa</b>	<b>C</b>
<b>Trehalosa</b>	<b>T</b>
<b>Glucosa</b>	<b>G</b>
<b>Galactosa</b>	<b>O</b>
<b>Dulcitol</b>	<b>D</b>
<b>Sacarosa</b>	<b>S</b>
<b>Maltosa</b>	<b>M</b>
<b>Lactosa</b>	<b>L</b>
<b>Manita</b>	<b>A</b>
<b>Xilosa</b>	<b>X</b>
<b>Melibiosa</b>	<b>B</b>
<b>Inositol</b>	<b>N</b>
<b>L- Arabinosa</b>	<b>RB</b>

e).- La turbidez alrededor de los discos, indicó que la levadura asimilaba el azúcar correspondiente; por el contrario, no se observó desarrollo de esta alrededor de los glucidiscos que no asimilaba.

Cada especie de levaduras del género *Cándida* tiene un patrón determinado de los azúcares que asimila, de esta forma se determinó la especie. <sup>(18)</sup> **(Foto N° 6)**

#### 5- API: 20 C AUX bioMèrieux® sa

Este sistema de identificación de especie de levaduras del género *Cándida* es de tipo comercial y se fundamenta en la capacidad de asimilación de las diversas azucares por parte de las distintas especies de levaduras.

#### **Procedimiento:**

- a).- A partir de un cultivo joven de *Cándida* a identificar, se realizó una suspensión en 2 ml de suero fisiológico estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.
- b).- Se transfirió 100 µl de esta suspensión a una ampolla de C Medium y se homogeneizó evitando la formación de burbujas.
- c).- Se llenó las cúpulas de cada uno de los pocillos de la galería comercial del kit con la suspensión anterior evitando la formación de burbujas y creando un

nivel horizontal para generar resultados correctos. Se depositó la galería sobre una base húmeda y se colocó una cubierta especial sobre ella.

d). Se incubó a 25 °C durante 48hrs.

### **Lectura e interpretación**

Se observó el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que se anotó en la hoja de resultados. En esta hoja las observaciones se consignan en grupos de tres y se adjudica a cada uno, en caso de ser positivo, un valor diferente: 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar. Sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico, el cual es característico para cada especie de *Cándida*.

La identificación se realizó mediante el Catálogo Analítico o el Programa Informático de Identificación suministrado por el fabricante. <sup>(18)</sup>

### **(Foto Nº 7)**

A todos los aislados que fueron identificadas mediante las pruebas anteriores como *C. albicans* se sometieron a otras técnicas de diagnóstico para diferenciar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, debido a que ambas especies dan

los mismos resultados para microcultivo, tubo germinativo, cromoagar, API 20 C AUX bioMérieux ® sa y auxonograma.

Las técnicas que nos permitirán en este estudio hacer la diferenciación son la formación de Clamidosporas en Agar Caseína y el crecimiento a 45°C.

#### 6- Formación de Clamidosporas en Agar Caseína:

Para la producción de Clamidosporas en agar caseína utilizando el método de Larone. <sup>(4,8)</sup>

A partir de cultivos frescos de levaduras en agar Sabouraud se sembró en agar Caseína con un asa de platino, hiriendo el agar en líneas paralelas, se incubó a 24°C por 48 horas. Posteriormente, se colocó en un portaobjetos un inóculo pequeño de levadura crecida en el agar caseína más una gota de lactofenol azul algodón, las placas fueron observadas al microscopio de transmisión con 10X y 40X.

Las Clamidosporas de *C. dubliniensis* son abundantes, dobles y triples, mientras que las de *C. albicans* son muy escasas o ausentes. Esto permite una simple diferenciación de *Cándida albicans* y de *Cándida dubliniensis*. <sup>(4,8,14,15,16)</sup>

**(Foto N° 8)**

### 7- Crecimiento a 45 Grados Celsius: <sup>(4,8,10)</sup>

*Cándida albicans* es capaz de crecer a temperaturas sobre 45°C, sin embargo *Cándida dubliniensis* no crece a esta temperatura.

Todos los aislados que fueron identificadas como *C. dubliniensis* con la prueba anterior fueron evaluados por su capacidad de crecimiento a 45°C. Los aislados en estudio se sembraron en placas de agar Sabouraud más Cloramfenicol (0,5mg./ml.) por 48 horas, junto con controles positivos para *Cándida albicans* ATCC10231 y *Cándida dubliniensis* CD 36. La formación de colonias después de transcurrido este periodo a 45°C, es característico de *Cándida albicans*, lo cual la diferencia de *Cándida dubliniensis*, como lo describe Pinjon et al. y otros. <sup>(8,10, 14)</sup>

Las muestras que no crecieron a esta temperatura se identificaron finalmente como *Cándida dubliniensis*, y los controles positivos crecieron abundantemente a 45°C.

#### **(Foto N° 9)**

Los datos obtenidos fueron relacionados entre sí y sometidos a un análisis estadístico mediante la prueba de  $\chi^2$  (Chi cuadrado), se consideró que existía una diferencia estadísticamente significativa cuando  $\underline{P}$  calculado resultó ser igual o menor a 0,05.

## **RESULTADOS**

Los pacientes estudiados en este trabajo fueron 120, de los cuales 60 presentaban Candidiasis clínica (grupo experimental), los otros 60 no presentaban la patología (grupo control). La edad de ellos fluctuaba entre los 33 y los 89 años.

En el grupo experimental 45 pacientes eran portadores de prótesis acrílicas.

En el grupo experimental (n=60) se aisló levaduras en muestras de saliva de 60 pacientes (100%). En el grupo control (n=60) solo 19 pacientes presentaron desarrollo de levaduras en las muestras obtenidas de saliva, obteniendo una prevalencia de 31.67% para este grupo. **(Gráfico N° 1)**

Al analizar la prevalencia de este microorganismo en mucosa oral en el grupo experimental (n=60) se obtuvo un total de 55 muestras positivas para el hongo (92%) y en el grupo control 7 pacientes presentaron *Cándida spp.* (11,66%) en su mucosa oral. **(Gráfico N° 2)**

Al identificar las especies aisladas en las 60 muestras salivales del grupo experimental se obtuvo *C. albicans* en 36 muestras (59%) y *Cándida* no albicans en los otros 24 aislados. (41%) **(Gráfico N° 3)**

La identificación de estos últimos fue de 9 aislados de *C. dubliniensis* (15%), 5 aislados de *C. glabrata* (8%), 4 aislados de *C. krusei* (7%), 3 aislados de *C. famata* (5%) y 1 aislado de *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*, con un 2% del total de las muestras aisladas. (n=60)

**(Gráfico N° 4)**

Al Identificar las especies de levaduras del género *Cándida* presentes en mucosa oral del grupo experimental, se obtuvo aislamiento de levaduras del género *Cándida* en 55 muestras (92%), donde se identificó *C. albicans* en 30 pacientes (54%) y *Cándida* no *albicans* en 25 muestras. (46%)

**(Gráfico N° 5)**

Las especies identificadas en el grupo no *albicans* fueron *C. dubliniensis* en 13 muestras (24%) *C. glabrata* y *C. krusei* en 4 muestras (7%), *C. famata* en 2 muestras (4%) y *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii*, en una muestra (2%) del total de las muestras aisladas. (n=55) **(Gráfico N° 6)**

Al Identificar las especies de levaduras del género *Cándida* presentes en saliva en el grupo control se obtuvo *Cándida spp* en 19 pacientes (31,67%), en las cuales se identificó *C. albicans* en 17 muestras (89,5%), y *Cándida* no *albicans* en 2 muestras (10,5%) **(Gráfico N° 7)**

Los 2 aislados no *albicans* correspondieron a *C. glabrata* (10,5%). (n=19)

**(Gráfico N° 7)**

Al Identificar las especies de levaduras del género *Cándida* presentes en mucosa oral del grupo control se obtuvo desarrollo de colonias de levaduras del género *Cándida* en 7 muestras (n=7), de las cuales se identificó *C. albicans* en las 7 muestras, representando un 100% de los aislados. **(Gráfico N° 8)**

En las tablas I y II pueden apreciar los porcentajes de cada especie aislados tanto en el grupo experimental y control, para saliva y mucosa oral. De este modo se realizó una comparación real de los datos expuestos anteriormente.

Al analizar las especies aisladas tanto en saliva como en mucosa oral de los 55 pacientes con Candidiasis clínica (grupo experimental) se obtuvo en 9 pacientes 2 especies diferentes de *Cándida* en boca (16,4%). 5 pacientes presentaron *C. glabrata* en saliva y *C. albicans* en mucosa oral, 1 paciente presentó *C. albicans* en saliva y *C. krusei* en mucosa oral, otro paciente presentó *C. krusei* en saliva y *C. famata* en mucosa oral, otro *C. albicans* en saliva y *C. glabrata* en mucosa oral y por último 1 paciente presentó *C. parapsilosis* en saliva y *C. albicans* en mucosa oral. En los 46 pacientes restantes se aisló la misma especie de *Cándida* spp. En ambos tipos de muestras (83,6%). **(Tabla III, gráfico N° 9)**

5 pacientes del grupo experimental presentaron desarrollo únicamente en saliva y no así en mucosa oral.

Al realizar un análisis comparativo entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* identificadas en saliva, se obtuvo que 9 pacientes presentaron *C. dubliniensis* (20%) y 36 presentaban *C. albicans* (80%) haciendo un total de 45 aislados. (n=45)

En mucosa oral, se obtuvo *C. dubliniensis* en 13 pacientes (30%) y en 30 individuos se aisló *C. albicans* (70%) haciendo un total de 43 aislados. (n=43) **(Gráfico N° 10)**

Estos datos arrojaron una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ )

La cuantificación de levaduras en saliva del género *Cándida*, en el grupo experimental versus el grupo control fue en promedio de  $4,2 \times 10^4$  U.F.C./ml. saliva (n=60), determinándose un intervalo de  $3,4 \times 10^4 - 5,0 \times 10^4$  U.F.C./ml. saliva y  $2,8 \times 10^3$  U.F.C./ml. saliva y el intervalo  $1,6 \times 10^3 - 4,0 \times 10^3$  U.F.C./ml. saliva respecto a un n=19 respectivamente. **(Tabla IV)**

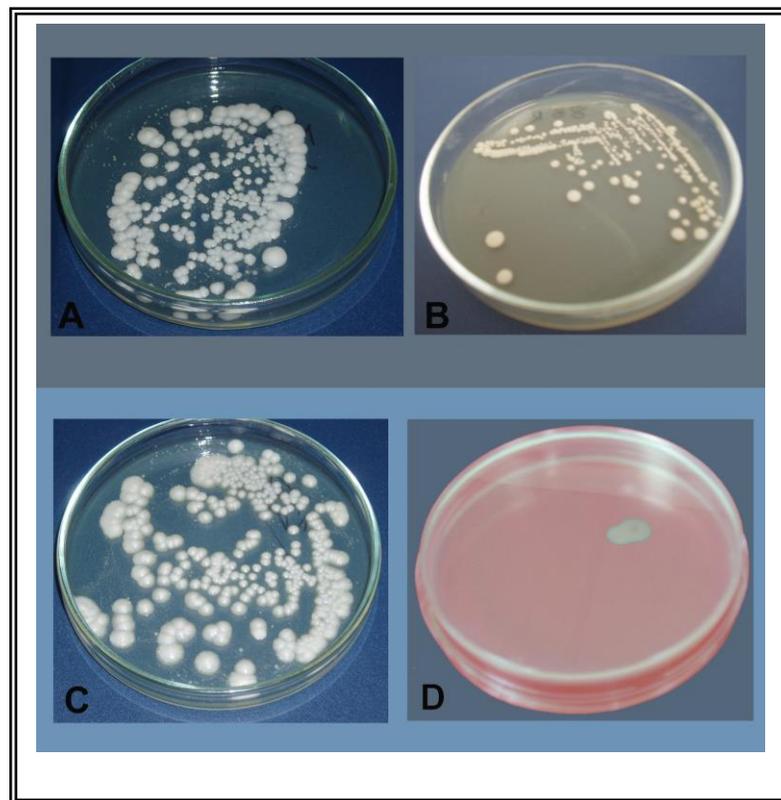
Estos resultados fueron estadísticamente significativos ( $p < 0,005$ )

Al comparar el nivel en saliva de levaduras del género *Cándida* en el grupo experimental en aquellos pacientes portadores de prótesis acrílica comparada con un grupo que no usaban este aparato protésico, se obtuvo un promedio de  $4,43 \times 10^4$  U.F.C./ml. saliva y  $3,58 \times 10^4$  U.F.C./ml. saliva respectivamente. Estos valores son estadísticamente significativos, nivel de confianza 95%. ( $p < 0,05$ ) **(Gráfico N° 11)**

## TABLAS, GRÁFICOS Y FOTOGRAFÍAS

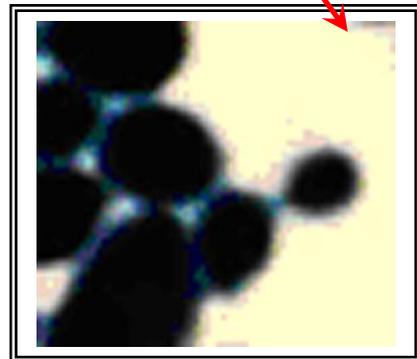
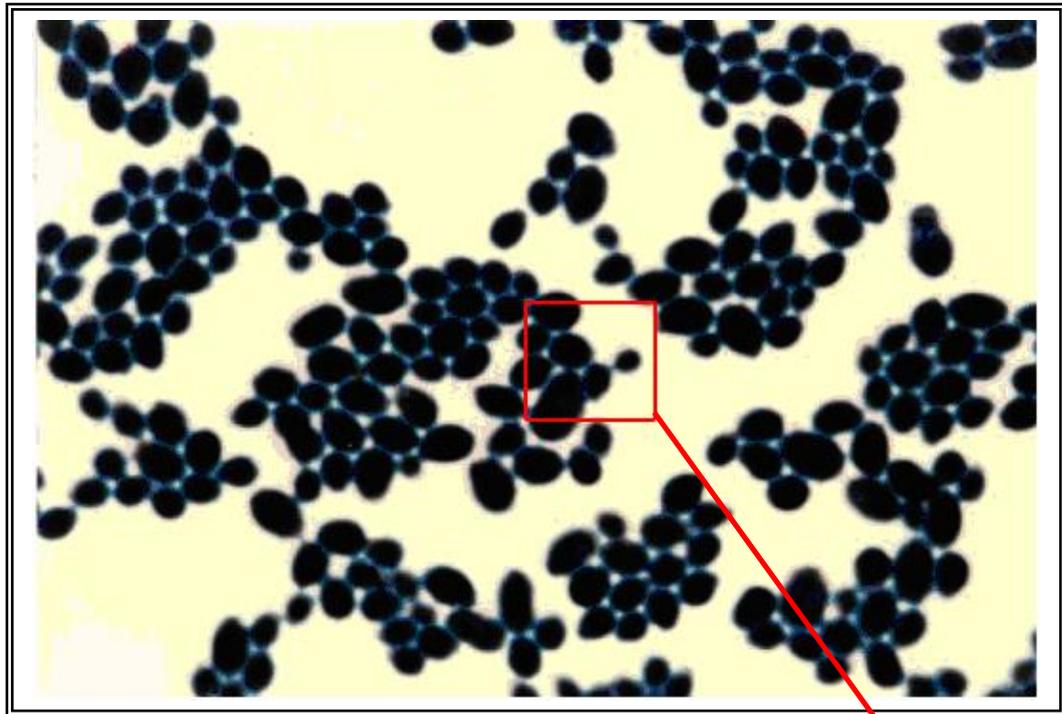
### Prevalencia de microorganismos del género *Cándida* en saliva y mucosa oral

**Foto N° 1:** Colonias de *Cándidas* aisladas en Agar Saboureaud-Cloramfenicol.

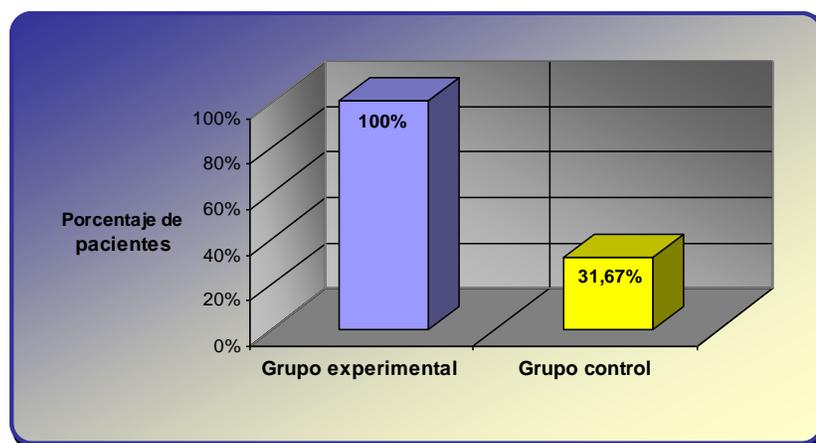


- **A:** Muestra de saliva de un paciente del grupo experimental.
- **B:** Muestra de saliva de un paciente del grupo control.
- **C:** Muestra de mucosa oral de un paciente del grupo experimental.
- **D:** Muestra de mucosa oral de un paciente del grupo control.

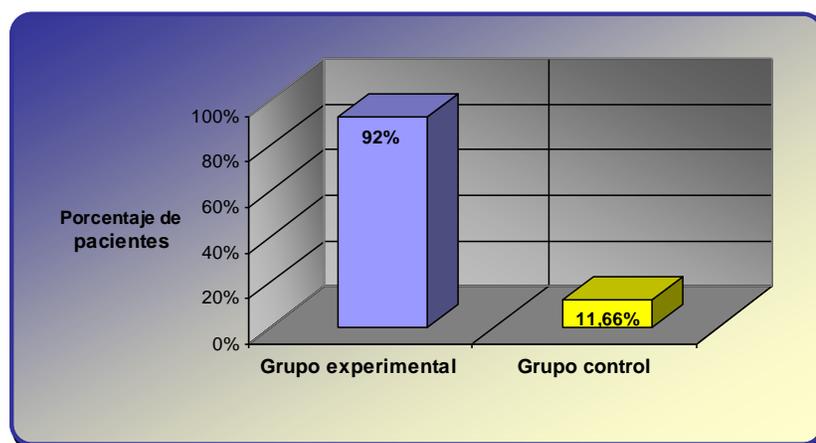
- **Foto N° 2:** Frotis de levaduras con Tinción de Gram. (100X)



- **Gráfico N° 1:** Prevalencia de microorganismos del género *Cándida* en saliva en un grupo de pacientes con candidiasis clínica (grupo experimental n=60) y 60 pacientes sin Candidiasis. (Grupo control)



- **Gráfico N° 2:** Prevalencia de microorganismos del género *Cándida* en mucosa oral en un grupo de pacientes con candidiasis clínica (grupo experimental n=60) y 60 pacientes sin Candidiasis. (Grupo control)

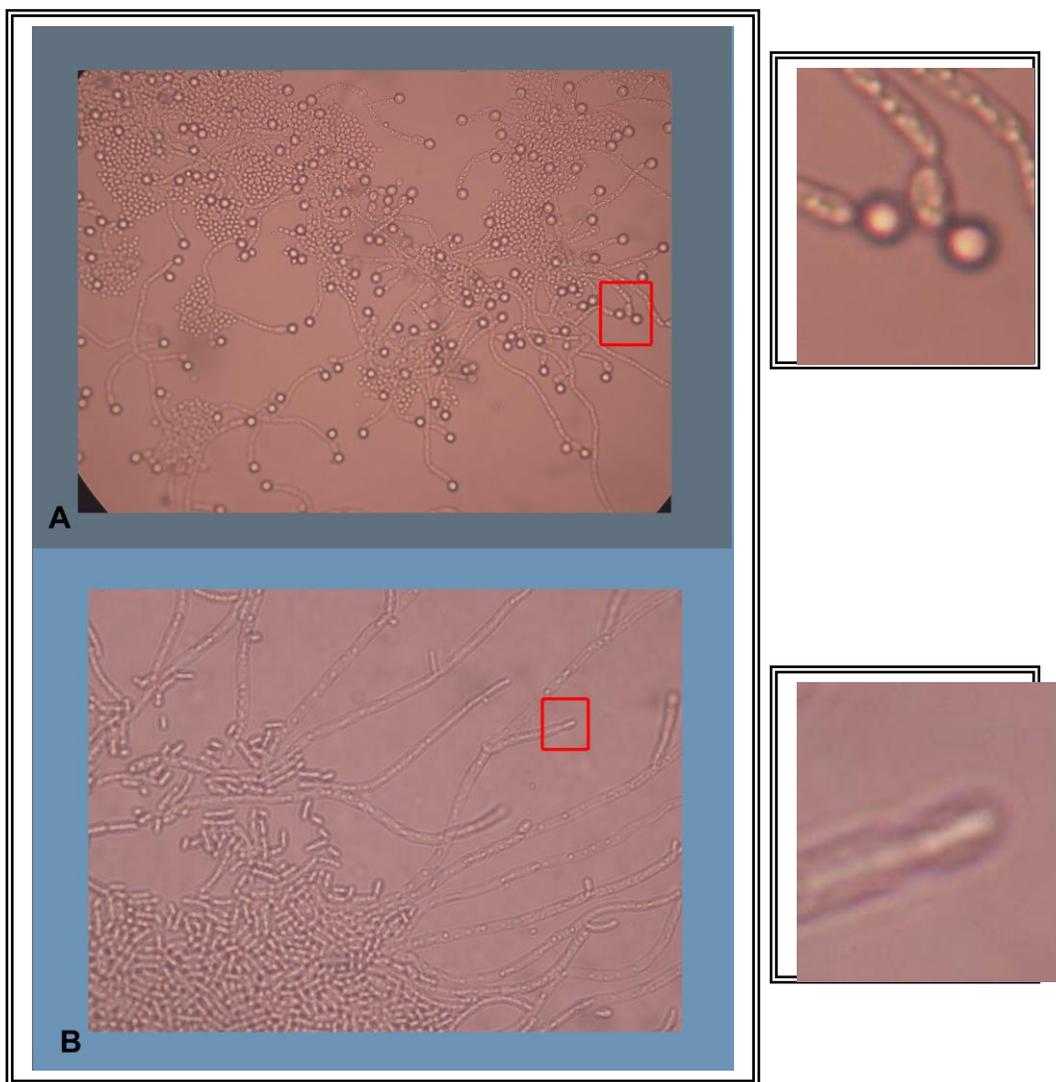


**Identificación de microorganismos del género *Cándida* en saliva y mucosa oral**

- **Foto N° 3:** Microcultivo en agar Maíz (40X)

**A:** presencia de Clamidosporas

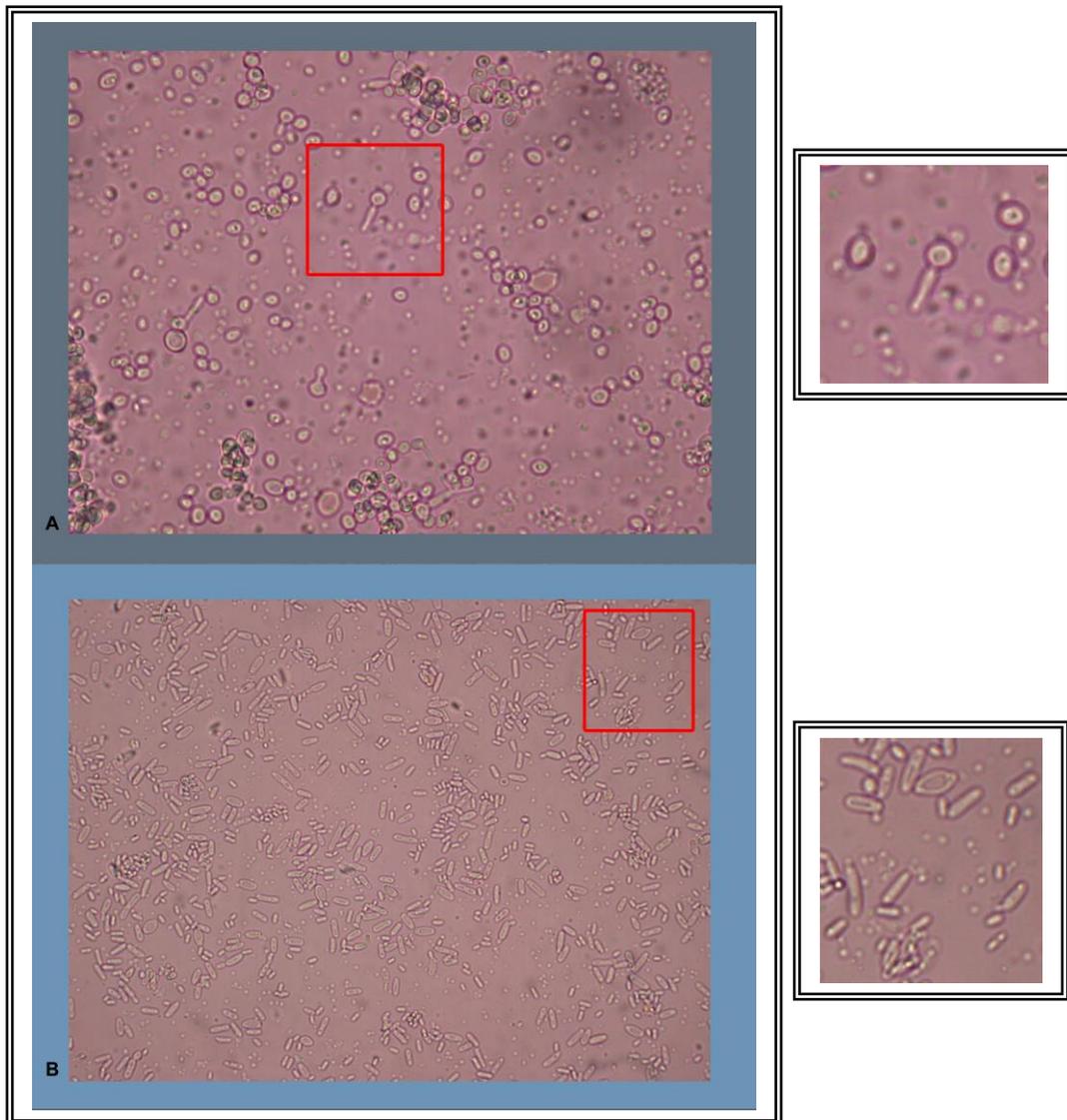
**B:** ausencia de Clamidosporas



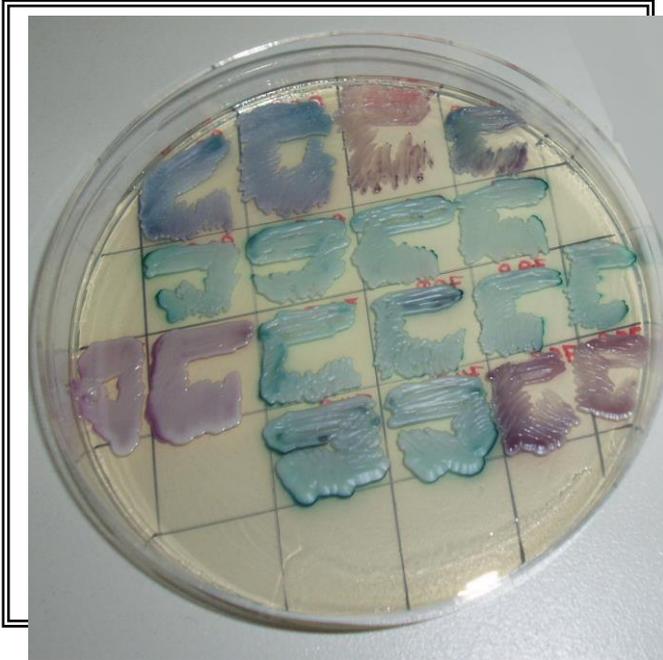
- **Foto N° 4:** Prueba del tubo germinativo (40X)

**A:** presencia de tubos germinativos

**B:** ausencia de tubos germinativos

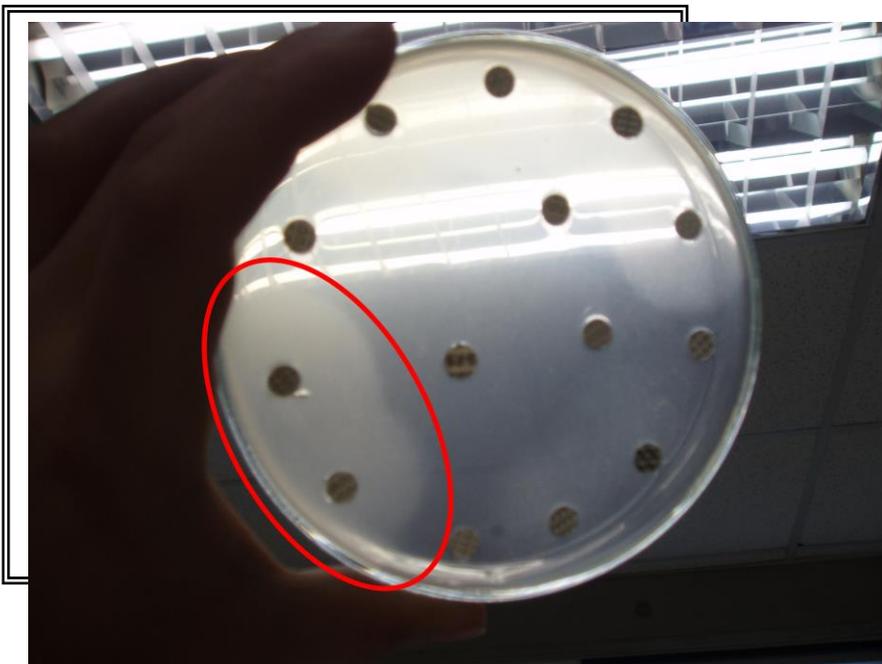


- **Foto N° 5:** Siembra en CROMO agar



- Se observan distintos tonos.

**Foto N° 6:** Auxonograma



- Se observa halo de crecimiento.

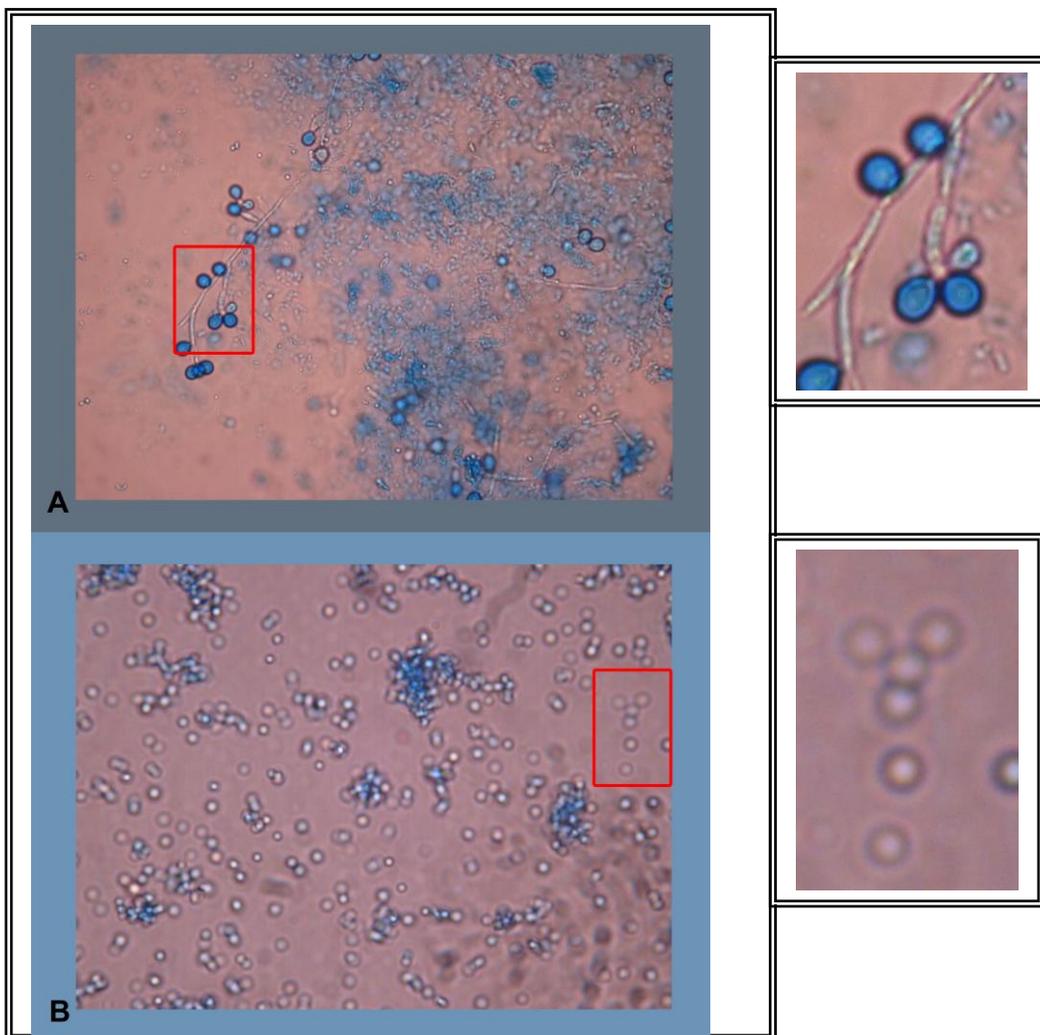
- **Foto Nº 7:** API 20 C AUX bioMérieux ® sa



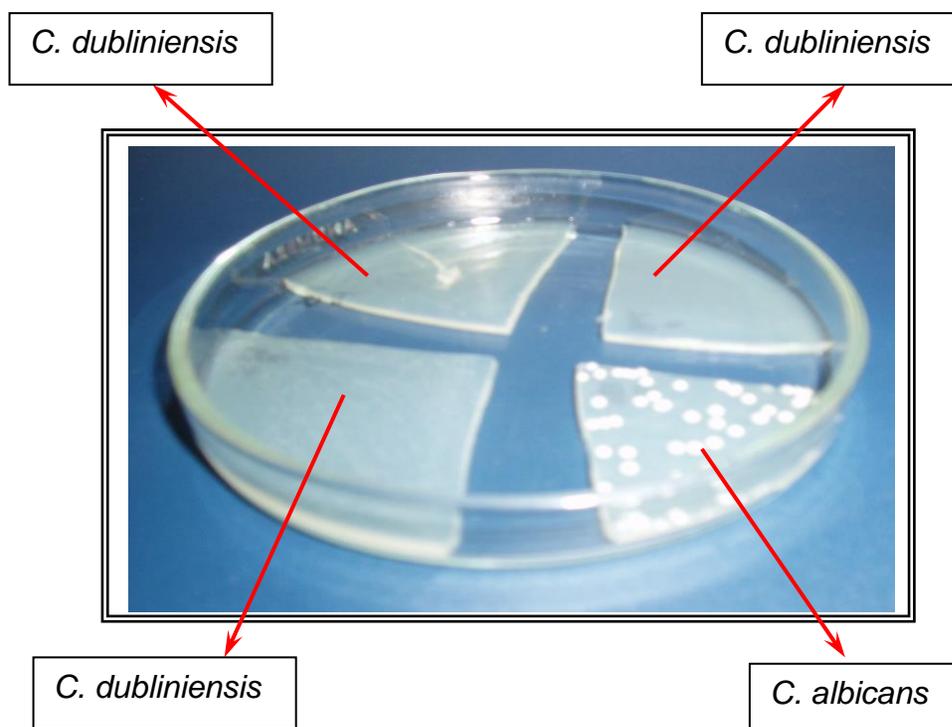
- **Foto Nº 8:** Siembra en Agar Caseína (40X)

**A:** presencia de clamidiosporas

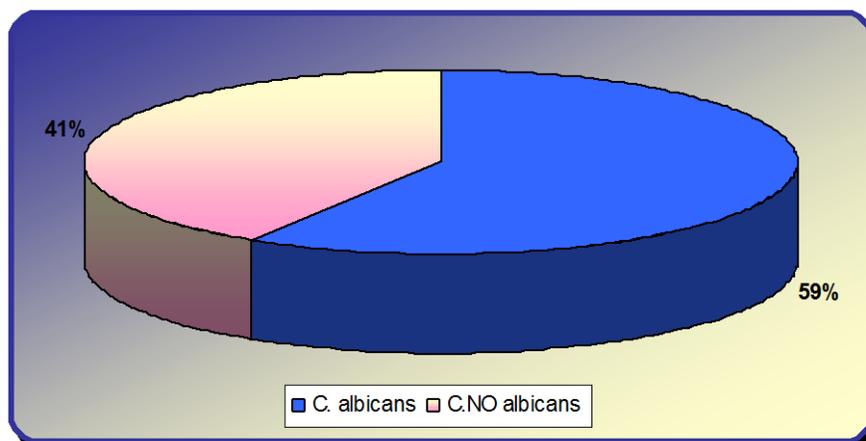
**B:** ausencia de clamidiosporas



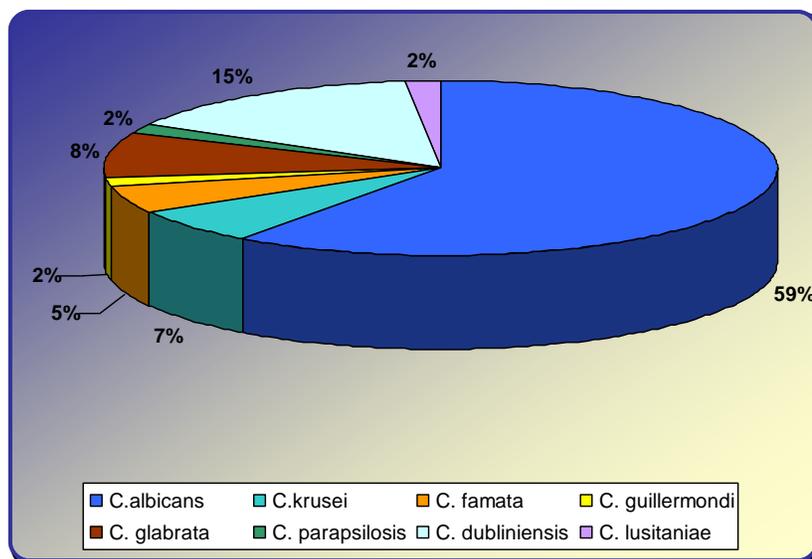
**Foto N° 9:** Crecimiento a 45



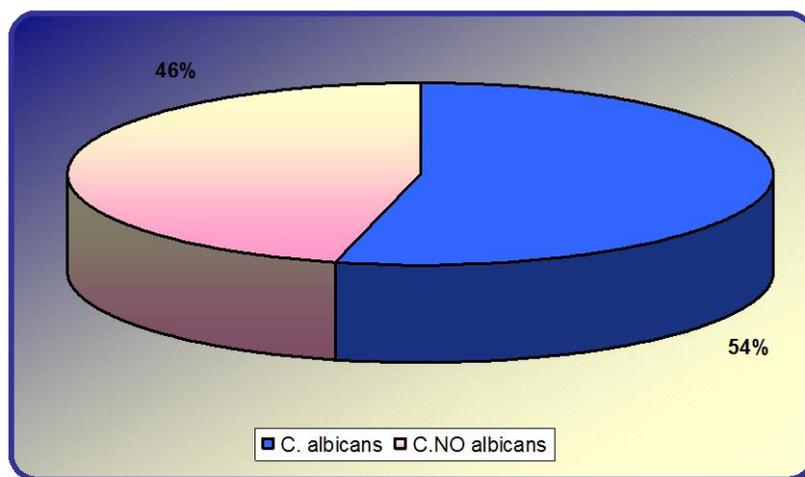
- **Gráfico N° 3:** Distribución porcentual entre aislados de *Cándida albicans* y *no albicans* en saliva en un grupo de pacientes con Candidiasis clínica. (Grupo experimental, n=60)



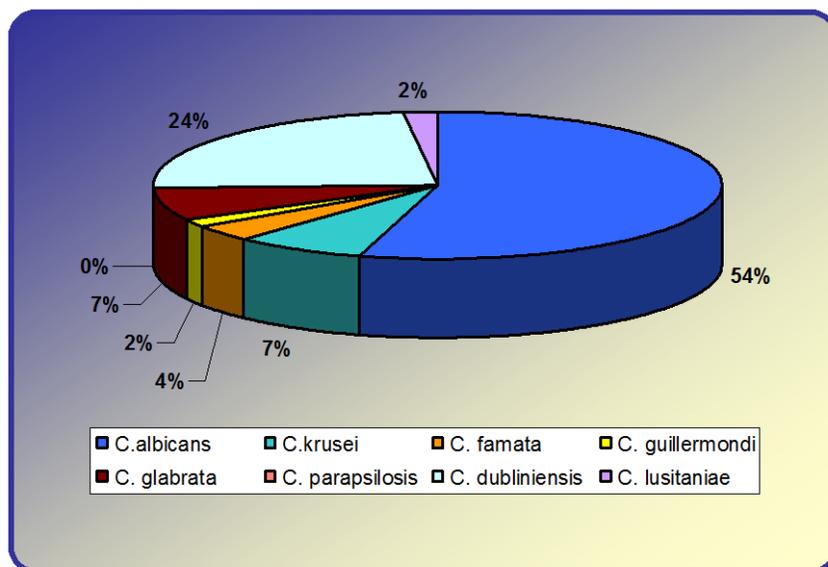
- **Gráfico N° 4:** Distribución porcentual de especies del género *Cándida* en saliva en un grupo de pacientes con Candidiasis clínica. (Grupo experimental, n=60)



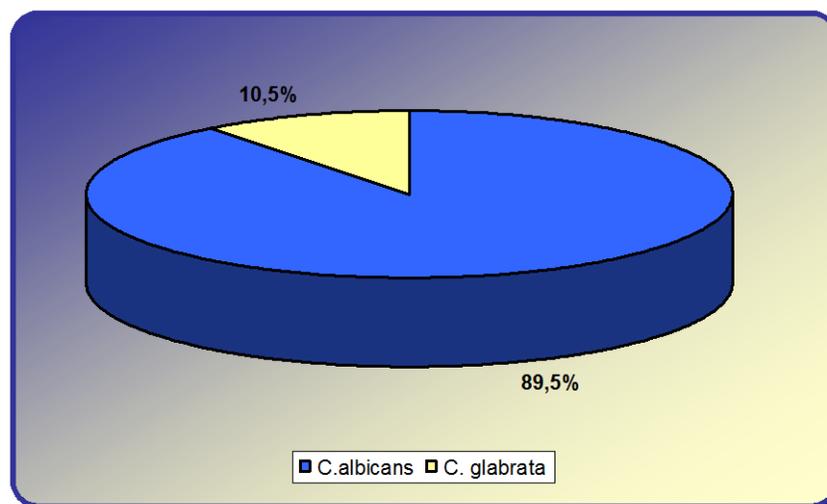
- **Gráfico N° 5:** Distribución porcentual entre aislados de *Cándida albicans* y *no albicans* en mucosa oral en un grupo de pacientes con Candidiasis clínica. (Grupo experimental, n=55)



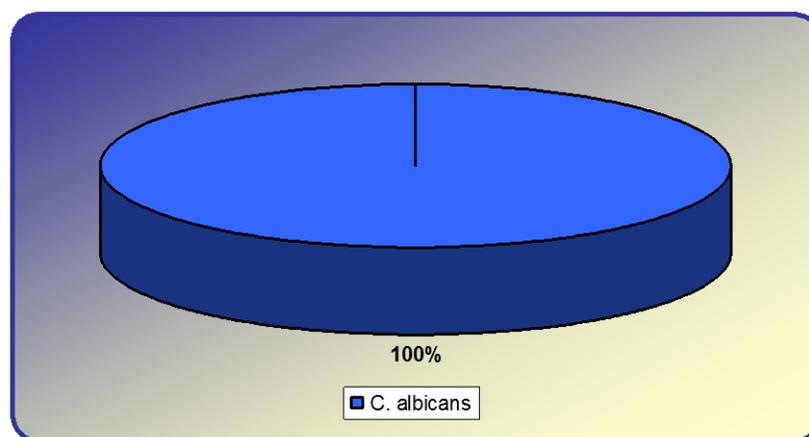
- **Gráfico N° 6:** Distribución porcentual de especies del género *Cándida* en mucosa oral en un grupo de pacientes con Candidiasis clínica. (Grupo experimental, n=55)



- **Gráfico N° 7:** Distribución porcentual de especies del género *Cándida* en saliva en un grupo de pacientes sin Candidiasis clínica. (Grupo control, n=19)



- **Gráfico N° 8:** Distribución porcentual de especies del género *Cándida* en mucosa oral en un grupo de pacientes sin Candidiasis clínica. (Grupo control, n=7)

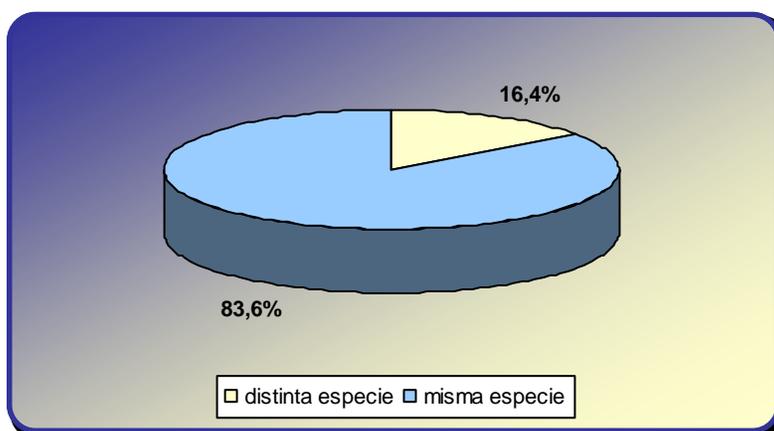




- **Tabla III:** Distribución porcentual de aislados de diferentes especies del género *Cándida* en saliva y mucosa en un mismo individuo de un grupo de pacientes con Candidiasis clínica. (Grupo experimental, n=55)

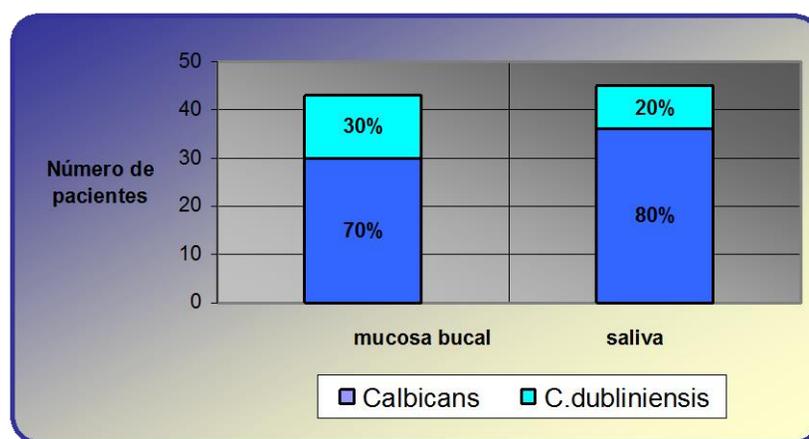
	Número de Pacientes	%
Misma Especie	46	83,6
Distinta Especie	9	16,4
Total	55	100

- **Gráfico N° 9:**



- **Gráfico N° 10:** Distribución porcentual de *C. dubliniensis* y *C. albicans* en aislados de mucosa bucal y saliva, de un grupo de pacientes con Candidiasis clínica. (Grupo experimental)

Nivel de confianza 95%,  $p > 0,05$



### Recuento salival: número de UFC/ml saliva

- **Tabla IV:** Cuantificación UFC/ml de *Cándida spp.* en saliva de pacientes con Candidiasis (Grupo experimental) y pacientes sanos. (Grupo control)

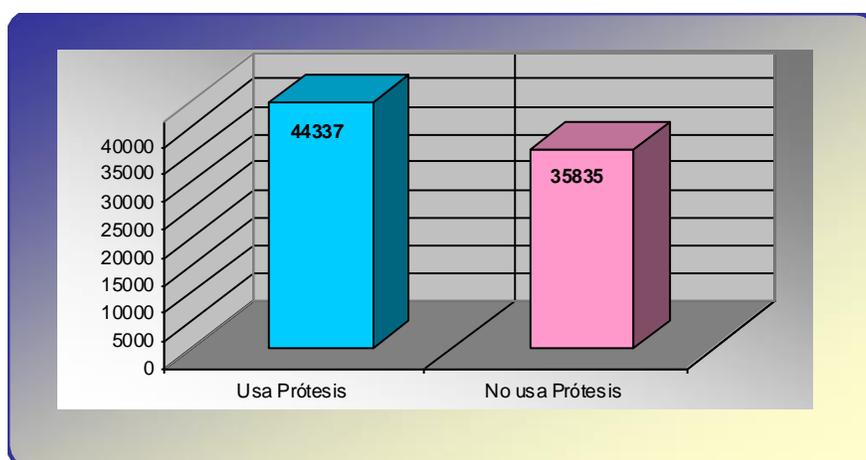
Nivel de confianza 95%,  $p > 0,05$

	Grupo experimental	Grupo control
<b>Promedio</b>	$4,2 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$
<b>Mínimo</b>	$3 \times 10^3$	$1 \times 10^3$
<b>Máximo</b>	$1,12 \times 10^5$	$1 \times 10^4$
<b>N.. de pacientes</b>	60	19
<b>Intervalo</b>	$3,4 \times 10^4 - 5,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3 - 4,0 \times 10^3$

\

- **Gráfico N° 11:** Nivel en saliva (U.F.C./ml. saliva) de *Cándida* spp en el grupo de pacientes con Candidiasis clínica portador y no portador de prótesis (n=60)

Nivel de confianza 95%,  $p = >0,05$



## **DISCUSIÓN**

El aislamiento de levaduras del género *Cándida* en la cavidad oral y su identificación adquiere cada día mayor importancia clínica y epidemiológica. <sup>(24)</sup>

En relación a los resultados obtenidos en esta investigación respecto a la prevalencia de levaduras del género *Cándida* en saliva y mucosa oral de una muestra total de 60 pacientes con signos clínicos de Candidiasis oral (grupo experimental), fue 100% en saliva y 92% en mucosa oral. Estos resultados son similares a los descritos por varios autores quienes informan la presencia del microorganismo entre el 95 y 80% en este grupo de pacientes tanto en saliva como en mucosa oral. <sup>(1,4,5,16,18, 26, 30,31)</sup>

El porcentaje de pacientes sin Candidiasis clínica (grupo control) portadores del microorganismo en saliva, de una muestra total de 60 pacientes, fue de un 31,67%, valor que fue similar al encontrado por otros autores, cuyos rangos fluctuaron entre 24 - 44%. <sup>(4,6,15,19,26, 33)</sup> Es así como Baile y Hernández obtuvieron de su estudio un 26% de aislamiento salival de la levadura del género *Cándida* en individuos sanos, Bartel y Blecman, en tanto, encontraron porcentajes que variaban entre un 33% a un 40%. T.M. Arendorf y D.M.Walkers, 44,4%. <sup>(2,4,8,10,11,12)</sup>

El porcentaje de aislamiento en mucosa oral para el grupo control fue de 11,66% el cual también es concordante con algunos estudios. <sup>(2,4,8,10)</sup> aunque en la literatura hay trabajos en los que no se aísla *Cándida* de mucosa oral de pacientes sin la enfermedad. <sup>(23)</sup>

De los datos obtenidos en ambos grupos en este estudio se observan diferencias estadísticamente significativas que señalan una relación directa entre la presencia del microorganismo en boca y el desarrollo del cuadro clínico de Candidiasis oral, como lo demuestran estudios realizados por Rehner y Lee, Jorgensen y otros.

El hecho de que en 5 pacientes con Candidiasis no se desarrolló microorganismo en la mucosa bucal lo podríamos explicar por un error en la toma de la muestra la cual no fue representativa o debido a que el microorganismo puede encontrarse en una concentración muy baja. <sup>(23)</sup>

Los resultados de este estudio son similares a los comunicados en la literatura extranjera, que señalan un aumento en la incidencia de especies de *Candida* no *albicans* y la emergencia de *C. dubliniensis*. <sup>(1,4,7,22,23,24,25,32,33)</sup>

En nuestro estudio el 59% de los aislados de saliva del grupo experimental, correspondió a *Cándida albicans* y el 41% restante a especies de *Candida* no *albicans*, siendo *Cándida dubliniensis* la especie de *Cándida* no *albicans* más frecuentemente aislada, (15%), seguido por *C. glabrata* y

*C. krusei* con un 8% y 7% respectivamente y otras especies en menor cantidad. *C. famata* (5%) *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*, con un 2% del total de las muestras aisladas. (n=60)

En mucosa oral de este grupo de pacientes ocurrió algo parecido, un 54% correspondió a *C. albicans* y un 46% a especies de *Cándida* no *albicans* siendo también *C. dubliniensis* la especie de *Cándida* no *albicans* más frecuentemente aislada en un 24%, seguido por *C. glabrata* y *C. krusei* con un 7%, *C. famata* con un 4%, *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii*, cada una representando un 2% del total de las muestras aisladas.

El predominio de la especie *albicans*, en los aislados, se corresponde con los reportes internacionales lo cual confirma nuestra hipótesis. <sup>(1-7,23-25,31,32)</sup> pero el valor obtenido para *C. albicans* tanto en saliva como en mucosa oral, 59% y 54% respectivamente, es inferior a los encontrados en otras investigaciones similares donde la prevalencia para esta especie va desde un 70 a un 90%. <sup>(1-9,23,25-30)</sup> Es así que, *Kurnatowski y Kurnatowska* <sup>(15)</sup> encontraron infección fúngica en 2/3 de los pacientes estudiados; *Cándida albicans* fue la especie más común encontrada con un 51,4% (86 casos de 167), valor muy cercano a lo obtenido en este trabajo. .

La prevalencia de especies de *Cándida* no *albicans* identificadas en esta investigación no se corresponde con las investigaciones realizadas en

otras localizaciones, donde *C. parapsilosis* es la especie más prevalente en saliva y mucosa oral luego de *C. albicans* con un 32,6% seguida por *C. tropicalis* 19,6 %, *C. krusei* y *C. glabrata* 10, 9 %. <sup>(23,24,31,32)</sup>

Otros estudios exponen como la especie no albicans más prevalente aislada en pacientes con Candidiasis oral a *C. glabrata* y posteriormente por *C. tropicalis*, con un 12 y 4% respectivamente. <sup>(1,3,5,7;13,15,18,20,22,33)</sup>

En este estudio, la especie no albicans más prevalente en pacientes con Candidiasis oral fue *C. dubliniensis* con un 15% en saliva y un 24% en mucosa oral seguido por *C. glabrata* y *C. krusei* con un 8% en saliva y un 7% en mucosa oral. Se puede apreciar que *C. dubliniensis* es más prevalente en mucosa oral lo cual se puede explicar por sus mecanismos de virulencia. <sup>(23-25,33)</sup>

Esta primera aproximación es de suma importancia para nuestra región, ya que evidencia la presencia de varias especies de *Cándida* aisladas de cuadros clínicos de Candidiasis oral. Estos datos ratifican la importancia del diagnóstico precoz de especie y refuerzan la necesidad de estructurar un programa de vigilancia de los microorganismos aislados, para evaluar continuamente el patrón de susceptibilidad de los agentes etiológicos de Candidiasis en Chile.

Este cambio epidemiológico tiene repercusiones clínicas, ya que estas especies son menos susceptibles a los compuestos azólicos que *C. albicans* <sup>(27,</sup>

<sup>32, 33</sup>). Sobel y Chain han sugerido que el gran uso de terapias con compuestos azólicos, el mayor uso de terapias de corta duración con antifúngicos orales ó de uso tópico y la autoprescripción de antimicóticos de uso tópico serían los factores responsables del aumento de la incidencia de *C.dublinsiensis* en los cuadros de Candidiasis orales, ya que actuarían por un mecanismo de selección. <sup>(32,33)</sup>

Otros autores plantean que *C. dublinsiensis*, presenta alta sensibilidad frente a los antifúngicos comúnmente utilizados en clínica, a excepción de fluconazol. Es característica la resistencia adquirida de esta especie a fluconazol *in vitro*, no observada frente al resto de azoles (itraconazol, ketoconazol, voriconazol, etc.), <sup>(19,32)</sup>

*C. glabrata* junto con *C. krusei*, son dos especies que también fueron aisladas en este estudio, aunque en menor proporción. Estos aislamientos tienen relevancia en el pacientes con Candidiasis ya que está descrito que con mucha facilidad adquieren resistencia al fluconazol, uno de los azoles más usados actualmente en el tratamiento de este cuadro clínico; de aquí la importancia de identificar precozmente las especies, para así instaurar un tratamiento adecuado.

Con los antecedentes expuestos, podemos explicar aquellos casos de pacientes que son refractarios al tratamiento con antifúngicos, los cuales

cursan cuadros de Candidiasis prolongados con alto riesgo ya que estos microorganismos pueden eventualmente, avanzar por el tracto digestivo o respiratorio hacia otras partes del organismo agudizándose el cuadro clínico por un mal manejo terapéutico, especialmente en pacientes con inmunodeficiencias.

El análisis de las especies aisladas de saliva y mucosa oral de los 55 pacientes con Candidiasis clínica demostraron que 9 pacientes (16,4%) no presentaban la misma especie en saliva y mucosa oral, aislándose 2 especies en boca. Se aislaron las siguientes combinaciones: *C. glabrata* en saliva y *C. albicans* en mucosa oral, *C. albicans* en saliva y *C. krusei* en mucosa oral, *C. krusei* en saliva y *C. famata* en mucosa oral, *C. albicans* en saliva y *C. glabrata* en mucosa oral, *C. parapsilosis* en saliva y *C. albicans* en mucosa oral.

Las investigaciones plantean que la mayor variedad de especies que colonizan la cavidad oral de los pacientes con infecciones recurrentes en relación con los que presentan una infección primaria, se puede explicar debido a que estos pacientes fueron sometidos a ciclos repetidos de tratamiento con antifúngicos, y estudios recientes de los patrones de recurrencia confirman que la recurrencia producida por una cepa diferente a la que originó el episodio inicial prevalece en pacientes con tratamiento previo de antifúngicos.<sup>(26)</sup>

Del total de pacientes sin Candidiasis (grupo control) analizados, solo un 31,67% presentaron el microorganismo en saliva y un 11,66% en mucosa oral. Al identificar las especies presentes este trabajo <sup>(1,3,4,7,21,22,24,27)</sup> concuerda con lo descrito por otros autores ya que el 89,5% de los aislados en saliva y el 100% de los aislados en mucosa fueron identificados como *C. albicans*.

Al analizar los resultados obtenidos en este estudio para el grupo control, podemos decir que están de acuerdo con lo expuesto en otras publicaciones similares, donde la especie no albicans más prevalente en saliva fue *C. glabrata* con un 10,5% en saliva, aún cuando estos resultados no tuvieron significancia estadística.

El hecho que en pacientes sin Candidiasis oral, en mucosa no existan Cándida de otras especies es un hallazgo de interés que debiera ser investigado.

Se obtuvo en saliva un 20% de *C. dubliniensis* y un 80% de *C. albicans*, considerando 9 aislado de *C. dubliniensis* y 36 aislados de *C. albicans* haciendo un total de 45 aislados. En mucosa oral, se obtuvo en saliva un 30% de *C. dubliniensis* y un 70% de *C. albicans*, considerando 13 aislado de *C. dubliniensis* y 30 aislados de *C. albicans* haciendo un total de 43 aislados. Nos estaría indicando que cuando no se conocía la existencia de *C. dubliniensis* un porcentaje importante de las muestras eran erróneamente identificadas como

*C. albicans*. Basados en nuestros resultados podemos apreciar que estos antecedentes podrían explicar la mayor prevalencia de *C. albicans* identificada tanto en saliva como en mucosa oral de pacientes con Candidiasis oral obtenidos en la literatura, comparado con nuestros resultados, donde *C. dubliniensis* fue identificada en 20% y 30% respectivamente, a diferencia de los trabajos realizados en Irlanda donde son los pacientes VIH positivos los que presentan una prevalencia de 15-30% de este microorganismo, y solo lo presenta un 5% de la población sana. (No infectados por VIH) <sup>(6,20,25)</sup>

*C. dubliniensis* y *C. albicans* forman tubos germinativos y en microcultivos generan Clamidosporas, elemento base en la identificación de la especie *albicans*. En CHROMagar da origen a colonias de color verde oscuro en el caso de *C. dubliniensis*, mientras que las colonias de *C. albicans* han sido descritas como verdes. <sup>(17)</sup> Sin embargo, en nuestra experiencia *C. albicans* dio origen a colonias verdes de distinta intensidad, dependiendo de la densidad de crecimiento y tiempo de incubación. La identificación definitiva de ambas especies solo puede efectuarse por el estudio de patrón de DNA. <sup>(16)</sup>

Sería importante considerar la limitación del CHROMagar para la diferenciación de ambas especies si la incidencia de *C. dubliniensis* comienza a ser significativa.

En resumen, los resultados de nuestro estudio permiten sugerir la necesidad de efectuar la identificación de las especies de levaduras del género *Cándida* de muestras orales, ya que *Cándida spp.* fue aislada en porcentajes elevados (41% y 46% en saliva y mucosa oral respectivamente), las cuales han sido asociadas con una menor susceptibilidad a los antifúngicos.

Es por esto que es de gran utilidad el uso combinado de la prueba de microcultivo, tubo germinativo y CHROMagar, Agar Caseína y Crecimiento a 45°C permitiría identificar correctamente a la mayoría de los aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Aunque se ha avanzado mucho en el diagnóstico de las infecciones fúngicas, no existe todavía un método ideal, estando indicada la utilización combinada de varios métodos diagnósticos.

El método propuesto para identificar especies de levaduras del género *Cándida* en esta investigación nos resultó de gran utilidad, pues permitió identificar el 100 % de los aislamientos hasta el nivel de especie. Comparado con otros, para la identificación de levaduras, la utilización del presente método posee la ventaja de ser simple, de bajo costo, no requiere equipamiento adicional y resulta asequible a los laboratorios de escasos recursos. Además por consistir en la realización de diferentes pruebas de laboratorio la posibilidad de error en los resultados obtenidos se minimiza al máximo.

En cuanto a la cuantificación de UFC/ml saliva en el grupo experimental y control, los resultados obtenidos en este trabajo están muy por sobre los valores obtenidos por otros autores en ambos grupos en estudio. <sup>(22,23,31)</sup> Así nosotros obtuvimos que a partir de  $3,4 \times 10^4$  UFC/ml saliva deberían manifestarse signos clínicos de Candidiasis oral en el universo estudiado. Epstein encontró que sujetos con evidencia de la enfermedad tienen un recuento mayor de 400 UFC/ml. de saliva, considerando al cultivo cuantitativo de ayuda práctica para el diagnóstico de Candidiasis oral. <sup>(12)</sup> Con estos resultados, podemos decir que los valores de UFC entre 240 y 400 nos indicaría valores críticos en los cuales se podría desarrollar la enfermedad en algún tiempo determinado.

Esta diferencia, entre nuestros resultados y los de Epstein, se puede explicar por la metodología utilizada para realizar el recuento, o que la población chilena presenta niveles salivales de este microorganismo muy altos; ya que en el grupo control el promedio obtenido fue de  $2,8 \times 10^3$  U.F.C./ml. saliva y el intervalo  $1,6 \times 10^3 - 4,0 \times 10^3$  U.F.C./ml. saliva respecto a un n=19. estos valores son muy altos al comparar con lo expuesto en otras publicaciones, que plantean que el número de unidades formadoras de colonias en la cavidad oral varía entre 300 y 500 por ml de saliva en condiciones no patológicas y presenta una variación diurna con máximos al amanecer y al

anochece<sup>(33)</sup> Otros autores plantean que en la boca del portador sano, este microorganismo es escaso (menos de 200 levaduras x mL de saliva) y que su frecuencia varía según la población estudiada.<sup>(14)</sup>

Esto, se puede explicar por la metodología utilizada. Además es necesario aclarar que los pacientes sin Candidiasis oral pueden tener en boca valores inferiores a  $1,6 \times 10^3$  UFC/ml saliva.

En relación al análisis de la cuantificación promedio del microorganismo en un grupo de pacientes con Candidiasis que usaban prótesis acrílica comparada con un grupo que no usaban este aparato protésico, se observó que los pacientes que usaban prótesis oral presentaban un promedio de  $4,43 \times 10^4$  UFC/ml saliva comparado con  $3,58 \times 10^4$  UFC/ml saliva en paciente que no usaban prótesis. (Resultados estadísticamente significativos)

Esto lo podemos explicar debido a que varios autores en la literatura han demostrado que las prótesis removibles y las superficies mucosas recubiertas por las bases protéticas son un reservorio especial para las levaduras orales<sup>(1,5,22)</sup> Además las prótesis mal adaptadas por cualquier causa, asociadas en ocasiones con su deficiente higiene, son causantes de estados inflamatorios de la mucosa bucal facilitando aún más la colonización de la mucosa por parte de este microorganismo.<sup>(31)</sup>

## **CONCLUSIÓN**

1.- En el grupo de pacientes con Candidiasis la prevalencia de levaduras del género *Cándida* en saliva y mucosa oral fue de 100% y 92% respectivamente.

2.- En el grupo de pacientes sin Candidiasis la prevalencia de levaduras del género *Cándida* en saliva y mucosa oral fue de 31,67% y 11,66% respectivamente.

3.- *Cándida albicans* se aisló en niveles estadísticamente significativos en la cavidad bucal de un grupo de pacientes chilenos con Candidiasis comparado con control sano.

4.-En el presente estudio se aisló un alto porcentaje (15% en saliva y 22% en mucosa) de *C. dubliniensis* en el universo estudiado.

5.- En este estudio, la especie no albicans más prevalente en pacientes con Candidiasis oral fue *C. dubliniensis* seguido por *C. glabrata* y *C. krusei* tanto en saliva como en mucosa bucal.

6.- Los pacientes sin Candidiasis clínica (portadores del microorganismo) poseían solo *C. albicans* y *C. glabrata* como microorganismos comensales.

7.-Algunos pacientes con Candidiasis presentaron 2 especies distintas en boca, una en saliva y otra en mucosa oral.

8.-Con un recuento igual o superior a  $3,4 \times 10^4$  U.F.C./ml. de saliva aparecen signos clínicos de Candidiasis en pacientes chilenos.

9.-Los pacientes con Candidiasis que usan aparatos protésicos, presentan mayor cantidad de U.F.C./ml. de saliva comparado con los pacientes que tienen la patología pero no usan prótesis.

## **SUGERENCIAS**

Para confirmar el verdadero significado clínico de *C. dubliniensis* es clara la necesidad de futuras investigaciones epidemiológicas. Esto va a ser facilitado por el reciente y gran número de pruebas de laboratorio confiables, futuros estudios deberían ser realizados para determinar la frecuencia de la resistencia a los antifúngicos en aislamientos clínicos. Tales estudios deberían ayudar a conocer algunas de las razones por la que este hongo de reciente y explosivo surgimiento es causa de enfermedad en humanos.

Realizar un diagnóstico microbiológico preciso mediante la técnica de PCR para confirmar las especies identificadas con diagnóstico presuntivo.

Hacer el mismo estudio pero en pacientes que resulten resistentes a la terapia con antifúngicos, para conocer a prevalencia de levaduras del género *Cándida* en estos casos.

Se sugiere también realizar el estudio incorporando variables como edad, sexo, pH salival, periodo hormonal de la mujer, que se saben influyen en el desarrollo de la *Cándida*.

## **RESUMEN**

En este trabajo se determinó la prevalencia, identificación y cuantificación salival de levaduras del género *Cándida* en boca de 120 adultos de ambos sexos, cuyas edades fluctuaban entre 33 y 89 años. Del total de pacientes, 60 presentaron Candidiasis oral (grupo experimental), el grupo control lo formaron los 60 pacientes restantes que no presentaban Candidiasis oral. A cada paciente se le tomó dos muestras: una muestra de saliva en un tubo de ensayo estéril y una muestra de raspado de mucosa bucal. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio para detectar, identificar y cuantificar al microorganismo *Cándida spp.*

Para la identificación se utilizaron los siguientes métodos:

Microcultivo en agar Maíz, Prueba del tubo germinativo, Siembra en CHROMO agar, Auxonograma, API 20 C AUX bioMèrieux<sup>®</sup> sa, Siembra en Agar Caseína y Crecimiento a 45°C.

Los resultados obtenidos mostraron una prevalencia en el grupo experimental de 100% en saliva y 92% en mucosa oral y en el grupo control de 31,67% y 11,66% respectivamente.

En este estudio, la especie no albicans más prevalente en pacientes con Candidiasis oral fue *C. dubliniensis* seguido por *C. glabrata* y *C. krusei* tanto en

saliva como en mucosa bucal. En los pacientes sin Candidiasis clínica solo se aisló *C. albicans* y *C. glabrata*.

Con el análisis de la cuantificación salival del microorganismo, se determinó que con un nivel igual o superior a  $3,4 \times 10^4$  U.F.C./ml. de saliva debieran aparecer signos clínicos de Candidiasis en pacientes chilenos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

(1) Lakshman P., Candidiasis and other fungal diseases of the mouth, Dermatologic Therapy, Vol. 15, 251 - 269, 2002.

(2) Sánchez-Vargas LO, et al., Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal VIH positivos y VIH negativos, Rev. Iberoam.Micol, Vol. 19, 155 -160, 2002.

(3) Campos Bello A. y Wilbert Ovalle C., Prevalencia de Candidiasis bucal en paciente geriátricos, Rev. ADM, Vol. LVI N° 6, 230 -233,1999.

(4) Mosca, C. O., et al., Aislamiento de Cándida dubliniensis en un adolescente con estomatitis subprotésica, Med oral Patol Oral Cir Bucal, Vol.10, 25-31,2005.

(5) Aguirre JM., Candidiasis orales, Rev. Iberoam.Micol, Vol.19, 2002, 17-21.

(6) Sullivan, D., and D. Coleman, *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J. Clin. Microbiol. Vol. 36, 1998, 329-334.

(7) Willinger, B., and M. Manafi., Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species., Mycoses, Vol. 42, 61-65.

(8) Mosca, C. O., et al., Casein Agar: a Useful Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. Vol. 41, 2003, 1259-1262.

(9) Hanula J. et al., Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis, Oral Microbiol Immunol, Vol. 15, 2000, 238-244.

(10) Pinjon, E., et al., Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*, J. Clin. Microbiol. Vol. 36 1998, 2093-2095.

(11) Baena-Monroy T., et al., Colonización por *Cándida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* en pacientes portadores de prótesis dentales, *Med oral Patol Oral Cir Bucal*, Vol.10, 2005, E27-E39.

(12) Campos J., Experimental Candidosis and Recovery of *Candida albicans* from Oral Cavity of Ovariectomized Rats, *Microbiol. Inmunol.*, Vol. 49 (3), 2005, 199-207.

(13) Kyoung-HoLee., The presuntive Identification of *Candida albicans* with Germ Tube Induce By Higt Temperature. *Yonsei Medical Journal*, Vol. 40, No. 5, 1999, 420-424.

(14) Giammanco GM et all. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. *Oral Microbiol Immunol*, Vol. 17, 2002, 89-94.

(15) Priscila de Laet, *Candida dubliniensis* in HIV negative and positive patient in Brazil, *Rev Iberoam Micol* Vol. 98(4) June 2003: 533-538.

(16) Kikpatrick.WR., Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar candida screening and susceptibility testing of isolates. *J clin Microbiol*, 36(10), 1998, 3007-12.

(17) Gatica M., et al, Utilidad del agar cromocandida para el diagnóstico diferencial de *Candida* spp aisladas de muestras vaginales, *Rev Chil Obstet Ginecol*, 67(4), 2002, 300-304.

(18) 2001 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6.  
[www.google.com](http://www.google.com) palabra clave: auxonograma

(19) Gutierrez,J et all., *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen, *J Basic Microbiol*, 42(3), 2002, 207-227.

(20) Priscila de Laet., *Candida dubliniensis* in HIV negative and positive patient in Brazil, *J Clin Microbiol* Vol. 98(4) June 2003: 533-538.

(21) MartinezM, Lopez-Ribot JK. Replacemete of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with

oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole, J Clin Microbiol, 40(9), 2002, 3135-3139.

(22) Mahvash N., et al, Relationship between salivary flow rates and *Candida albicans* count, Oral Surg Oral Med Oral Patol Oral radiol Endod, Vol.80, 1995, 284-288.

(23) Torres S., et al, Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia, Oral Surg Oral Med Oral Patol Oral radiol Endod, Vol.93, 2002, 149-154.

(24) Martínez M. et al, Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral, Rev. cubana Med Trop, Vol. 49(3), 1997, 174-180.

(25) Al Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. J Clin Microbiol 2003; 41:4787-4789.

(26) Santana JC. Candidiasis de la mucosa bucal. En: Santana JC. Infección por el VIH en el complejo bucal. La Habana: Ciencias Médicas; 2000.p.73-87.

(27) Nenoff P., et al., In vitro activity of rilopirox against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida* isolates from patients HIV infection. *Mycoses* 1999;42(1-2):55-60.

(28) Steele C., et al., Potential role for a carbohydrate moiety in anti-candida activity of human oral epithelial cells. *Infect Immun* 2001 Nov; 69 (11) : 7091 – 7099.

(29) Rodríguez O., et al., Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica, *Rev Cubana Estomatol* 2002;39(2).

(30) König K.G., Diet and health, *Internacional Dental Journal* 2000;50,162-174.

(31) Epstein, et al., Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J Clin Microbiol* 1980, 12(3), 475-4766.

(32) Martínez J., y Albrecht C., Sensibilidad al fluconazol y a la anfotericina B en cepas de *Candida* provenientes de aislamientos clínicos, Rev Iberoam Micol 1998; 15, 298-299.

(33) Delgado W., y Aguirre J., Las micosis orales en la era del sida, Rev Iberoam Micol 1997; 14: 14-22.

**ANEXO****INVESTIGACION CANDIDIASIS****FICHA PACIENTE**

PACIENTE N°.....

FECHA DE INGRESO.....

ACEPTO PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACION.....

FIRMA

**ANTECEDENTES PERSONALES**

NOMBRE:.....

.....

EDAD.....GENERO.....

RUT.....TELEFONO.....

DIRECCIÓN.....

**ANAMNESIS REMOTA PERSONAL:**                      SI                      NO

CARDIOVASCULAR

RESPIRATORIA

HEMATOLÓGICA

INMUNOLÓGICA:

HIPERSENSIBILIDAD

AUTOINMUNIDAD

NEUROLÓGICA y/o SIQUIATRICA

GASTROENTEROLOGICAS

DIABETES

HEPATITIS

TBC

ETS

TRATAMIENTO ACTUAL FÁRMACOS

TRATAMIENTO ANTERIOR ( CUANTO TIEMPO ANTES)

HABITOS:	CANTIDAD	TIPO	TIEMPO
ALCOHOL			
TABACO			

EXAMEN INTRAORAL

LABIOS

COMISURA

DORSO DE LENGUA

PALADAR

REBORDES

Nª DE PIEZAS DENTARIAS

CONDICIONES DE P.D.

ENFERMEDAD PERIODONTAL

TIPO DE EP

**INDICE GREENE Y VERMILLION DEPOSITOS BLANDOS:**

VESTIBULAR	3	8	14	24		
LINGUAL	19			30		

**ENFERMEDAD ACTUAL SIMPLIFICADO:**

TIPO CLINICO

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Las candidiasis es una enfermedad que produce lesiones en la mucosa bucal.

Es causada, por un hongo unicelular, principalmente *Cándida albicans*. Este hongo además puede producir enfermedades infecciosas en otros sitios, en pacientes con alteraciones del sistema inmune.

Este estudio pretende detectar la presencia y cantidad en cavidad bucal de *Cándida albicans* en adultos sanos y con lesiones en su mucosa compatibles clínicamente con candidiasis bucal, para ello se tomará una muestra microbiológica de saliva y de mucosa oral a los pacientes, previa aceptación por ellos o representante legal.

El procedimiento de la toma de muestra no presenta riesgo alguno, ni es doloroso.

Declaro haber recibido información clara sobre la enfermedad y el procedimiento.

Este consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzado (a) u obligado (a) en forma alguna.

\_\_\_\_\_  
NOMBRE PADRE O  
REPRESENTANTE LEGAL

\_\_\_\_\_  
RUT

\_\_\_\_\_  
FIRMA

FECHA \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
INVESTIGADOR RESPONSABLE

