

~ Un număr – O specie ~

Educație medicală continuă

***Candida dubliniensis* vs. *Candida albicans***

Izolate și descrise la un secol și jumătate distanță una de cealaltă, cele două specii levurice cu semnificație medicală reprezintă astăzi principalii agenți etiologici ai afecțiunilor fungice orale, deținând împreună primul loc în ceea ce privește prevalența, atât la pacienții imunocompromiși, cât și la cei imunocompetenți. Gradul marcat de similitudine al celor două entități taxonomice, în ceea ce privește aspectele clinice induse și caracterele fenotipice etalate, a determinat numeroase confuzii materializate în erori de identificare.

Caracterizarea lor comparativă relevă în majoritatea cazurilor asemănări, însă se pot surprinde și particularități legate în special de contextul clinic și terenul pe care pot surveni infecțiile cu *C. dubliniensis* în special. Vom prezenta în antiteză cele două specii, insistând asupra aspectelor epidemiologice, precum și asupra caracteristicilor fenotipice și genotipice, pentru a obține o sumă de date utile în demersurile diagnostice, atât clinice, cât și de laborator.

**Istoric**

Descoperirea ambelor specii levurice este legată de patologia orală, probabil datorită facilității cu care au fost observate leziunile produse de acestea la nivelul mucoasei bucale.

*C. albicans* a fost izolată și descrisă prima dată în 1847 sub denumirea de *Oidium albicans* de către Robin, care i-a și atribuit responsabilitatea majoră în producerea muguetului la sugari (1). Semnalarea aspectului clinic caracteristic muguetului (stomatita candidozică pseudo-membranoasă) este însă mult mai veche și datează încă din antichitate, când Hippocrates (460-377 î.H.) și Gallen (130-200 d.H.) au descris ca *aphthae albae* depozitele albicioase linguale prezente la pacienții infectați (1).

*C. dubliniensis* a fost descrisă în 1995, la Dublin (Irlanda), de către echipa condusă de Derek J. Sullivan de la Trinity College, în urma izolării unor tulpini atipice din leziuni de candidoză orală la pacienți HIV-pozitivi (2). La începutul anilor '90 au existat numeroase rapoarte din diferite

colțuri ale lumii ce semnalau izolarea, în cazul unor infecții cu localizare bucală, unor tulpini neobișnuite de *Candida albicans*, de la variate grupuri de pacienți, dar în special de la cei HIV + și bolnavii SIDA. Toate aceste tulpini au fost analizate prin numeroase tehnici ce au arătat prezența unor caractere comune și astfel, au fost incluse în așa numita categorie *Candida albicans* "atipică" (2-4). Studiarea extensivă a acestor tulpini "atipice" provenite din regiuni geografice disparate a avut ca rezultat includerea lor într-o specie separată, pentru care s-a propus numele de *Candida dubliniensis*. Ulterior, *Candida dubliniensis* a fost izolată și din materii fecale, spută, secreții vaginale, dar și din hemoculturi în cazul infecțiilor sistemice.

Cu toate că este considerată o specie emergentă a genului *Candida*, necunoscută până în 1995, *C. dubliniensis* a fost izolată și înainte de această dată, însă datorită proprietăților sale biochimice și fiziologice, a fost greșit identificată. Două tulpini levurice – una menținută la British National Collection for Pathogenic Fungi și catalogată *C. stellatoidea*, și cealaltă păstrată la Centraal Bureau voor Schimmelcultures (Olanda) drept *C. albicans*, au fost identificate ca fiind *C. dubliniensis* (5).

**Epidemiologie**

Primele gazde ale infecției cu *C. dubliniensis* au fost reprezentate de pacienți HIV-pozitivi care acuzau episoade recurente de candidoză orală eritematoasă (5). Conform primului studiu care a urmărit această nouă specie, *C. dubliniensis* a fost izolată la 27% din pacienții HIV pozitivi cu semne clinice de candidoză orală, și la 19% dintre cei fără aceste manifestări. *C. dubliniensis* a mai fost izolată de la 3% din indivizii HIV-negativi fără semne de candidoză orală și de la 14,6% dintre cei cu candidoză orală manifestă. În majoritatea cazurilor, *C. dubliniensis* a fost izolată împreună cu *C. albicans*, doar în 24,5% dintre probe obținându-se în cultură pură (4).

Într-un studiu-cohortă efectuat pe pacienți irlandezi, Coleman și colaboratorii (1997) sesizează

că prevalența tulpinilor de *C.dublinskiensis*, singulare sau asociate cu alte tulpini de *Candida*, poate atinge 26% la subiecți HIV-pozitivi și 31,7% la cei cu sindrom imunodeficient dobândit manifestat clinic (3). Tot la pacienți HIV-pozitivi, *C.dublinskiensis* a fost izolată în proporție de 48% din leziuni parodontale, și ceea ce este important de subliniat – la un procent semnificativ dintre aceștia, colonizarea a fost semnalată și la nivelul situsurilor subgingivale (6). Într-un alt studiu privind implicarea diferitelor specii de *Candida* în patologia orală a pacienților suferind de diabet insulino-dependent, Manfredi și colaboratorii (2002) indică o prevalență de 3,6% pentru infecțiile cu *C.dublinskiensis*, în comparație cu 83,1% pentru cele cu *C.albicans* (7).

Se consideră că răspândirea geografică a acestei specii din genul *Candida* este globală, existând numeroase rapoarte din diferite țări, ce anunță izolarea *C. dublinskiensis* în Argentina, Australia, Belgia, Canada, Chile, Franța, Finlanda, Germania, Grecia, Irlanda, Elveția, Marea Britanie, Spania, Statele Unite ale Americii (8,9). Pe harta răspândirii acestei specii au fost incluse în 2000, Israelul (10) și din 2001, România (11).

Spre deosebire de *C.dublinskiensis*, *C.albicans* este prezentă în proporție ridicată la persoanele sănătoase, ca germene comensal în multiplele situsuri ale nișei ecologice orale și nu numai. Rata colonizării asimptomatice poate atinge 50% dintre indivizii sănătoși (12). Când organismul gazdei este supus intervenției diversilor factori agresivi care îi destabilizează homeostazia și îi induc modificări reactive detrimentale, *C.albicans* își etalează prompt factorii de patogenitate, determinând infecții cu variate aspecte clinice. Este astfel demonstrat caracterul oportunist al acestei specii cosmopolite, fapt subliniat și de aserțiunea cu iz axiomatic potrivit căreia „candidozele sunt boli ale bolnavilor” (13).

### Caractere fenotipice folosite în diagnosticul de laborator

Datorită dificultății de a deosebi, pe baza caracterelor morfologice, *C. dublinskiensis* de *C. albicans*, și datorită răspândirii sale globale, numeroase studii au urmărit formularea unor recomandări utile pentru identificarea *C. dublinskiensis* în practica uzuală din laboratoarele clinice (4,14-18). Aceste criterii fenotipice sunt sintetizate în tabelul 1.

Tulpinile de *Candida dublinskiensis* se dezvoltă bine pe medii convenționale uzuale pentru levuri; astfel, pe mediul Sabouraud solid formează colonii netede, de culoare alb-crem, la temperaturi cuprinse între 30 și 37°C, coloniile formate având aspect similar cu cele produse de *C. albicans*, fiind practic imposibil a le deosebi. Cu toate acestea, spre deosebire de *C. albicans*, tulpinile de *C. dublinskiensis* nu cresc la 45°C.

O altă soluție este utilizarea mediului solid cromogen CHROMagar *Candida* (Becton – Dickinson): după o incubare de 48 de ore la 37°C, coloniile de *C. albicans* apar de culoare verde deschis (bleu-verde), în timp ce coloniile de *C. dublinskiensis* sunt verde închis, fiind relativ ușor de deosebit de aspectul coloniilor altor specii din genul *Candida* (4).

Totodată *C. dublinskiensis* este o specie ce produce clamidospori și filamentează în ser la 37°C, caracteristici de asemenea considerate specifice pentru *Candida albicans*, și utilizate în consecință pentru identificarea acestei specii (3). Aceasta înseamnă că nu toate tulpinile izolate și identificate drept *Candida albicans* în practica de rutină, aparțin în realitate acestei specii. Testul filamentării în ser are avantajul de a fi rapid, dar în contextul actual are o valoare limitată datorită faptului că noua specie - *C. dublinskiensis*, prezintă aceeași caracteristică întâlnită la *C. albicans* (2,3,8).

Pentru stimularea producerii de clamidospori, se folosesc medii sărace în nutrienți cum ar fi de exemplu Rice Agar Tween (RAT) sau Pomme de terre Carotte Bile (PCB), tulpina levurică în cauză fiind însământată submers, printr-o tehnică specială – Dalmau, incubarea realizându-se 24-48 de ore la o temperatură mai mică de 30°C. În funcție de aspectul microscopic al clamidosporilor, se pot identifica și preidentifica numeroase specii de *Candida* (figura 1, 2).

Astfel, *C. dublinskiensis* produce clamidospori în număr foarte mare, cu dispunere în perechi terminale sau triplete, pe niște hife scurte și foarte ramificate, aspect neîntâlnit la *C. albicans*, ai cărei clamidospori sunt singurari la capătul unor hife lungi.

Referitor la proprietățile biochimice ale speciei *Candida dublinskiensis* merită menționat că ea nu asimilează D-xiloza și un produce β-galactozidază. *Candida dublinskiensis* a fost introdusă în baza de date a kiturilor rapide de identificare din 2001 (de exemplu *Api 20 C aux*, bioMérieux, Franța), dar datorită asemănării cu *Candida*

*albicans* pe mediile de cultură uzuale acest fapt nu ajută foarte mult la evidențierea tuturor tulpinilor existente în produsele patologice din infecțiile superficiale.

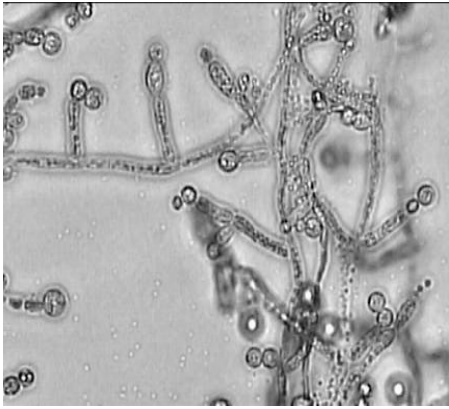


Figura nr. 1 *Candida albicans*: clamidospori, rari, singurari, terminali

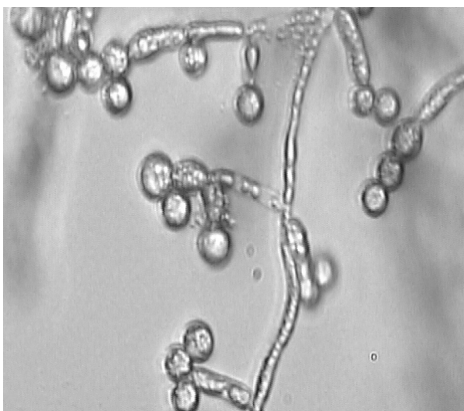


Figura nr. 2 *Candida dubliniensis* filamente scurte, bogat ramificate cu numeroși chlamidospori grupați în perechi terminale sau tripleți

#### **Caractere genotipice folosite în diagnosticul de laborator**

Desigur, cele mai fidele metode de identificare a speciei *C.dubliniensis* folosesc tehnicile de biologie moleculară (8,9,19-21). Examinarea genomului celor două specii a arătat diferențe în secvența a peste 300 de gene, inclusiv în a celor responsabile de codarea factorilor de virulență (22). Se consideră că analizarea regiunii variabile V3 din componența ADN-ului codant al subunității ribozomale 18S este suficientă pentru discriminarea între cele două specii în cursul

identificării lor (2). În plus, compararea structurilor nucleotidice ale genei ACT1 (necesară sintezei unei proteine structurale) a arătat că aceasta diferă la cele două specii în proporție de 2,1% în zona codantă și de 16,6% în zonele necodante, ceea ce demonstrează o strânsă legătură filogenetică și o origine comună (23). În vederea identificării corecte a tulpinilor de *Candida dubliniensis*, este preferabilă, pentru siguranța și expeditivitatea ei, o tehnică de biologie moleculară care presupune folosirea a două perechi de primeri (amorse): una de amorse specifice unui intron al genei codante pentru actină (DUBF/DUBR) și alta de amorse universale pentru ADN-ul ribozomal (ITS1/ITS4). Dintre cele două specii în discuție, doar *C. dubliniensis* generează în urma amplificării două benzi – una de 288 perechi de baze (pb) cu setul DUBF/DUBR și una de cca. 600 pb, cu amorsele universale. *Candida albicans* va genera o singură bandă, pe cea de 600 pb, cu amorsele universale (23).

#### **Sensibilitatea la antifungice**

*Candida dubliniensis* nu face parte din grupul de specii cu rezistență nativă la antifungice, inclusiv la azoli. În schimb, trebuie menționat un aspect important legat de capacitatea acestuia de a dobândi rapid rezistență la fluconazol, un antifungic lansat pe piață la începutul anilor '90, foarte utilizat, datorită bunei sale biodisponibilități, folosit și cu scop profilactic în anumite situații clinice. De asemenea, în mod experimental, au fost obținute *in vitro*, tulpini rezistente la fluconazol, după expuneri repetate la concentrații crescătoare ale acestui antifungic, probabil datorită supraexprimării genelor codante pentru pompele de eflux. Astfel se explică frecvența crescută a acestei specii la pacienții ce au primit fluconazol în scop profilactic (24).

Într-un studiu recent privind sensibilitatea a 111 tulpini de *Candida dubliniensis*, s-a constatat că 94.6% dintre acestea erau sensibile la fluconazol cu o valoare a concentrației minime inhibitoare cuprinsă între 0.125–4  $\mu\text{g/ml}$  (24). Tulpinile rezistente la fluconazol rămân totuși sensibile la alți agenți antifungici: amfotericina B, voriconazol și caspofungină (25-29).

#### **Concluzii**

*C.dubliniensis* este o specie emergentă a genului *Candida*, asemănătoare biochimic și morfologic cu *C.albicans*, motiv pentru care s-a confundat cu aceasta până în anul 1995, când

# Fungi & Mycotoxins

Volume 2, N<sup>o</sup>. 1, april 2008

investigațiile genetice au caracterizat-o ca nouă specie. Are o prevalență semnificativă la pacienții imunocompromiși, tarați, la care determină manifestări clinice cu o oarecare specificitate. Comparativ cu *C.albicans*, *C.dublinskiensis* posedă un număr redus de factori de patogenitate, ceea ce explică frecvența relativ scăzută a infecțiilor. Izolarea tulpinilor de *C.dublinskiensis* din leziuni de

candidoză orală poate orienta investigarea pacientului în direcția unor afecțiuni grave sistemice. Tulpinile de *Candida dublinskiensis* din diferite produse patologice trebuie identificate corespunzător, deoarece acestea pot dezvolta cu ușurință rezistență la fluconazol, iar această specie coexistă de multe ori cu *Candida albicans*.

Tabelul 1

Caracteristici fenotipice utile în diferențierea celor două specii levurice

Caracterul urmărit	<i>C. dublinskiensis</i>	<i>C.albicans</i>
Capacitatea de dezvoltare la 42°C	+/-	+
Capacitatea de dezvoltare la 45°C (3)	-	+
Filamentarea în ser sanguin (formarea de tubi germinativi)	+	+
Formarea de clamidospori pe mediul Rice Agar Tween la 25°C	+	+
	hife scurte, foarte ramificate; clamidospori numeroși grupați în perechi/triplete	hife lungi, puțin ramificate; clamidospori rari dispuși câte unul la o celulă suspensoare
Colonii rugoase pe Agar Staib	+	-
Producerea de clamidospori pe Agar Staib	+	-
Testul de opacifiere (medii cu tween 80)	-	+
Reducerea clorurii de trifenil-tetrazoliu	+	-
Coagregare cu <i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	-
Culoarea coloniilor pe CHROMagar Candida	Verde-închis	Bleu-verde
Asimilarea D-xilozei	-	+
B-glucozidază	-	+

## Bibliografie

1. Drouhet E. *Historical introduction: Evolution of knowledge of the fungi and mycoses from Hippocrates to the twenty-first century*. In: Collier L, Balow A, Sussman M (eds). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections; 9<sup>th</sup> edn., London, Sidney, Auckland: Arnold, 1998:3-42.
2. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC – *Candida dublinskiensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals; *Microbiology* **1995**; 141:1507-1521.
3. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE *et al.*- Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dublinskiensis*; *AIDS* 1997; 11:557-567.
4. Sullivan DJ, Coleman DC - *Candida dublinskiensis*: characteristics and identification; *Journal of Clinical Microbiology* **1998**; 36(2):329-334.
5. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly Samantha *et al.* – *Candida dublinskiensis*: An Update;

- Revista Iberoamericana de Micologia** **1999**; 16:72-76.
6. Jabra-Rizk MA, Ferreira SMS, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF – Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from Human Immunodeficiency Virus-associated periodontal lesions; **Journal of Clinical Microbiology** **2001**; 39(12):4520-4522.
  7. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR – The isolation, identification and molecular analysis of *Candida spp.* isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus; **Oral Microbiology and Immunology** **2002**; 17:181-185.
  8. Sullivan DJ, Coleman DC - *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen; **Current Topics in Medical Mycology** **1997**; 8(1-2):15-25.
  9. Sullivan DJ, Haynes KA, Bille J *et al.* - Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals; **Journal of Clinical Microbiology** **1997**; 35:960-964.
  10. Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan DJ *et al.* - Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel; **Journal of Clinical Microbiology** **2000**; 38:170-173.
  11. Alecu SF, Defta C, Dumitriu Silvia - *Candida dubliniensis* found in a prospective study in Romania; **Clinical Microbiology and Infection** **2001**; 7(suppl 1): 339.
  12. Grillot Renée. **Les mycoses humaines: demarche diagnostique**; Paris: Elsevier; 1996.
  13. Urizar JMA – Candidiasis orales; **Revista Iberoamericana de Micologia** **2002**; 19:17-21.
  14. Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK *et al.* - 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; **Journal of Clinical Microbiology** **1998**; 36:3007-3012.
  15. Pinjon E, Sullivan DJ, Salkin I *et al.* - Simple, Inexpensiv, Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*; **Journal of Clinical Microbiology** **1998**; 36(7): 2093-2095.
  16. Gales A C, Pfaller MA, Houston AK *et al.* - Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems; **Journal of Clinical Microbiology** **1999**; 37:3804-3808.
  17. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR *et al.* - Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems; **Journal of Clinical Microbiology** **1999**; 37:3533-3539.
  18. Tintelnot K, Haase G, Seibold M *et al.* - Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*; **Journal of Clinical Microbiology** **2000**; 38:1599-1608.
  19. Kurzai O, Heinz WJ, Sullivan DJ *et al.* - Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated PHR1 and PHR2 genes of *Candida albicans*; **Journal of Clinical Microbiology** **1999**; 37:1587-1590.
  20. Jabra-Rizk, MA, Falkler WA, Merz WG *et al.* - Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected individuals; **Journal of Clinical Microbiology** **2000**; 38:2423-2426.
  21. Martin C, Roberts D, Weide van der M *et al.* - Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens; **Journal of Clinical Microbiology** **2000**; 38:3735-3742.
  22. Sullivan DJ – Comparative epidemiology and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*; **Mikologia Lekarska** **2004**; 11:19.
  23. Donnelly SA, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC – Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences; **Microbiology** **1999**; 145:1871-1882.
  24. Pinjon E, Moran G.P., Coleman D.C. *et al.* Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis* **Biochemical Society**

- Transactions* 2005 Volume 33, part 5: 1210-1214
25. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ *et al.* - Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges; *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(4):643-658.
26. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA - Resistance of *Candida* species to fluconazole; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995; 39(1):1-8.
27. Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM *et al.* - Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 42:1819-1830.
28. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ *et al.* - Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States; *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1999; 33:217-222.
29. Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Arevalo MP *et al.* - In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents; *Chemotherapy* 2000; 46:395-401.