

Colonización por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* en pacientes portadores de prótesis dentales

Candida albicans, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis

Tania Baena Monroy ⁽¹⁾, Víctor Moreno Maldonado ⁽²⁾, Fernando Franco Martínez ⁽¹⁾, Beatriz Aldape Barrios ⁽¹⁾, Guillermo Quindós ⁽³⁾, Luis Octavio Sánchez Vargas ^(1,3)

(1) Laboratorio de Patología Experimental, área de Microbiología, División de Estudios de Postgrado e Investigación, México DF, México

(2) Departamento de Prosthodontia Total, Facultad de Odontología Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México

(3) Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España.

Correspondencia / Address:

Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas

Laboratorio de Genética Molecular

División de Estudios de Postgrado e Investigación

Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad Universitaria, México DF, México.

Teléfono: (0152 55) 56 225565, Fax: (0152 55) 55 50 34 97

E-mail: cdlosv@yahoo.com.mx-

Recibido / Received: 7-03-2004 Aceptado / Accepted: 28-11-2004

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed

-EMBASE, Excerpta Medica

-Índice Médico Español

-IBECs

Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10:E27-E39.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

RESUMEN

Antecedentes: La estomatitis protética está asociada a *Candida albicans*, diversas bacterias y otros cofactores, como un pH ácido, la ingesta aumentada de carbohidratos, diversas enfermedades sistémicas y tratamientos farmacológicos.

Objetivo: Determinar la prevalencia de *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* en la mucosa y en las prótesis de los pacientes con y sin estomatitis protética atrófica y su relación con otros cofactores clínicos potenciales.

Diseño del estudio: Se recolectó la saliva de 105 pacientes (62 mujeres y 43 hombres) con prótesis dental para la medida del pH y se tomaron muestras orales con torunda estéril de la mucosa bucal y de la superficie interna de las prótesis dentales para su posterior estudio microbiológico. La identificación de los microorganismos aislados se realizó por métodos microbiológicos convencionales.

Resultados: Las enfermedades sistémicas más frecuentes fueron diabetes mellitus e hipertensión y se observó una ingesta alta de carbohidratos en un número importante de pacientes. Se observó estomatitis protética atrófica en 50 pacientes y el pH salival medio en estos pacientes fue de 5,2. La presencia en las muestras de la mucosa bucal de *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans* fue de 51,4 %, 52,4 % y de 67,6 %, respectivamente. *C. albicans* se aisló del 66,7% de las prótesis. *S. aureus* y *S. mutans* se aislaron del 49,5 % de las dichas prótesis. En un 86 % de los pacientes

ABSTRACT

Background: Denture stomatitis is associated to *Candida albicans*, different bacteria and other co-factors such as an acid pH, a carbohydrate ingestion increase, different systemic illnesses and pharmacological treatments.

Objective: The aim of this study was to determine *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* prevalence in the mucous membrane and prosthesis of patients with and without atrophic denture stomatitis and its relationship with other potential clinical co-factors.

Study Design: Saliva was collected from 105 patients (62 female and 43 male) wearing dental prosthesis in order to measure their pH. Oral samples of the mucous membrane and the internal surface of dental prosthesis were taken with sterile cotton to proceed with the microbiological study. The identification of the isolated microorganisms was performed using conventional microbiological methods.

Results: Diabetes and Hypertension were the most frequent systemic illnesses. High carbohydrate ingestion was observed in numerous patients. Atrophic denture stomatitis was reported in 50 patients and the pH average in saliva was of 5,2. The presence of *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans* in the mucous membrane and prosthesis was of 51,4%, 52,4% and 67,6%, respectively. *C. albicans* was isolated in 66,7% from the prosthesis, whereas *S. aureus* and *S. mutans* were isolated in 49,5% of those same

con estomatitis protética atrófica se aisló *C. albicans* y en un porcentaje parecido (84 % de los pacientes) se aisló *S. aureus*. El aislamiento de *S. mutans* fue menos frecuente, observándose en el 16% de las muestras orales de estos pacientes.

Conclusiones: *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans* colonizan con frecuencia la mucosa bucal de pacientes con prótesis dental. Este estado de portador es más frecuente en pacientes con estomatitis protética atrófica, aunque en estas personas, la colonización de las prótesis es menor que la de la mucosa bucal.

Palabras clave: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, prótesis dentales, estomatitis protética.

INTRODUCCION

La estomatitis protética es un proceso inflamatorio de la mucosa bucal. Sus principales formas clínicas son la atrófica (con presencia de lesiones eritematosas) y la hiperplásica (1). 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 *Candida albicans* y otros microorganismos bucales (1-3). El desarrollo de la estomatitis protética se ve influido, además de por la presencia de la prótesis y de *Candida* y otros microorganismos, por diversos factores locales y sistémicos, como un pH salival ácido, el alto consumo de carbohidratos, tratamiento antibiótico antibacteriano prolongado, terapia hormonal, así como por enfermedades sistémicas, como *diabetes mellitus* o hipertensión arterial que tienen repercusión directa en las condiciones ambientales de la cavidad bucal (4-6).

C. albicans y *Staphylococcus aureus* se asocian en las lesiones de muchos pacientes con queilitis angular, entidad clínica donde *C. albicans* juega un importante papel etiológico (1,5-7). *C. albicans* y *S. aureus* son microorganismos con una elevada capacidad de adhesión a la mucosa bucal (8-9). Diversos estudios (10-13) han demostrado que existe una asociación de *C. albicans*, y otras especies de *Candida*, con otras bacterias bucales como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum* y *Actinomyces viscosus* y que éstas bacterias promueven la adherencia de las levaduras al epitelio oral y a las superficies acrílicas. Esta adherencia está favorecida in vitro por la incubación simultánea de *Candida* con *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius* u otras bacterias. *C. albicans* y *S. aureus* pueden producir lesiones mixtas en la mucosa oral, como la queilitis angular. Sin embargo, los factores que facilitan esta co-infección no han sido identificados. Las alteraciones salivales son importantes factores asociados con el desarrollo de estomatitis y otras alteraciones orales. *C. albicans* es la especie de *Candida* con mayor capacidad de adhesión a las células epiteliales bucales y vaginales, hecho que está relacionado con su mayor presencia como colonizador o patógeno estas mucosas humanas puesto que la adhesión a células y superficies es el primer paso para la posterior colonización e invasión de los tejidos (13). La adhesión de *Candida* a la mucosa bucal está favorecida por diferentes factores del hongo (como la transición blastoconidio a hifa y la producción de diferentes

prosthesis. *C. albicans* was isolated in 86% of the patients with atrophic denture stomatitis and *S. aureus* was isolated in a similar percentage (84% of patients). The isolation of *S. mutans* was less frequent, and it was observed in 16% of the oral samples of these patients.

Conclusions: *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans* frequently colonize the oral mucous of patients wearing dental prosthesis. This illness-bearing condition is more frequent in patients with denture stomatitis, even though dental prosthesis colonization is lower than in the oral mucous.

Key words: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, dental prosthesis, denture stomatitis.

INTRODUCTION

Denture stomatitis is an inflammatory process of the oral mucous. Atrophic (with erythematous lesions) and hyperplastic lesions are the main forms of denture stomatitis.(1) It is more frequently found in women, essentially in the maxillary, most of the times in the palate surface in contact with a dental prosthesis. There are many factors involved in the etiology of this lesion and it has been associated with the presence of *Candida albicans* and other oral microorganisms.(1-3) Denture stomatitis development is influenced by the presence of a dental prosthesis, *Candida* and other microorganisms, but also by other local and systemic factors such as an acid salivary pH, a high carbohydrates ingestion, a long-term antibiotic therapy, hormonal therapy as well as systemic illnesses such as diabetes mellitus or arterial hypertension which have a direct repercussion in the environment of the oral cavity.(4-6)

C. albicans and *Staphylococcus aureus* are associated in lesions of several patients with queilitis angular, where *C. albicans* plays an important etiological role (1,5-7) *C. albicans* and *Staphylococcus aureus* are microorganisms with an elevated adhesion capacity to the oral mucous. (8-9). Several studies (10-13) have demonstrated an association between *C. albicans* or other species of *Candida*, and several oral bacteria such as *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum* and *Actinomyces viscosus*. This suggests that these bacteria promote the adhesion of yeasts in the oral epithelium and acrylic surfaces. This adherence is enhanced in vitro when *Candida* is incubated simultaneously with *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius* or some other bacteria. *C. albicans* and *S. aureus* produce lesions in oral mucous, such as the angular queilitis. However, the factors that facilitate this co-infection have not yet been identified. The development of stomatitis includes important associated factors such as changes in saliva, as well as other oral alterations.

In comparison with other species of *Candida*, *C. albicans* has the highest adhesion capacity to oral and vaginal epithelial cells, fact related to its extend presence as colonizer or pathogenic agent of human mucous because the adhesion to the cells and surfaces is the first step to the subsequent colonization and tissues invasion (13) The adhesion of *Candida* to oral mucous is enhanced by different factors related to fungi (such as the transition from blastoconia to hypha, the production of several extra cellular

enzimas extracelulares como proteinasas y fosfolipasas) y condiciones del microambiente bucal (temperatura, pH, concentración de carbohidratos, etc.). Los materiales biomédicos pueden ser colonizados por microorganismos que forman una biopelícula adherente sobre la superficie de éstos. Las biopelículas están organizadas en comunidades microbianas estructuradas dentro de una matriz de material extracelular. Estos microorganismos son diferentes en fenotipo de las células libres en suspensión (planctónicas). La mayoría de las biopelículas bacterianas están producidas por *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (14-17). *C. albicans* y *Candida parapsilosis* son las más frecuentes de las especies fúngicas formadoras de biopelículas aunque la especie *Candida dubliniensis*, con un hábitat preferentemente oral, es una eficaz productora de biopelículas sobre superficies acrílicas (9). Las proteínas salivales, (principalmente las mucinas), que recubren la mucosa bucal y las superficies inertes de las prótesis dentales pueden actuar como receptores específicos de *C. albicans* y otros microorganismos (2,5).

El objetivo de éste estudio ha sido determinar la prevalencia de *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans* como colonizadores de la mucosa y las prótesis de los pacientes con estomatitis protética atrófica, la asociación entre estos microorganismos y su relación con otros cofactores clínicos potenciales.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes, material y métodos

Pacientes. Se estudiaron 105 pacientes portadores de prótesis dentales (43 varones y 62 mujeres con una edad media de 67 años) que se atendieron en la clínica de Prostodoncia Total de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, México DF. Se estudiaron pacientes desdentados totales portadores de prótesis, con o sin presencia de estomatitis protética, que no hubieran ingerido alimentos o fumado en las 3 h previas a la toma de las muestras, sin haber realizado ningún procedimiento de higiene bucal y que no hubieran estado sometidos a terapia antimicrobiana en un periodo previo de 6 meses antes del estudio.

Muestras microbiológicas. Previo consentimiento informado, revisión clínica y realización de un cuestionario anamnésico, a cada paciente se le tomó una muestra de 2 ml de saliva no estimulada o la secretada durante 5 min. De cada paciente también se obtuvo una muestra con hisopo estéril frotando la superficie interna de la prótesis una vez retirada ésta de la cavidad bucal y una segunda muestra, frotando con un hisopo estéril la mucosa bucal con lesiones de estomatitis protética atrófica, la mucosa del paladar, la zona retromolar o cualquier otra zona mucosa en contacto con la prótesis dental. Las muestras se colocaron inmediatamente en medio de transporte de Stuart (BBL, EE.UU.) para su posterior procesamiento.

Métodos. Se midió el pH salival inmediatamente después de haberse obtenido la muestra mediante un potenciómetro (Conductronic pH120, EE.UU.). Para el aislamiento e identificación de *C. albicans*, las muestras se sembraron por agotamiento en placas de agar cromógeno CandiSelect (Bio-Rad, Francia), que es un medio específico para el crecimiento de levaduras que contiene una base nutritiva con glucosa, un sustrato cromógeno y antibióticos que

enzymes such as proteinasas and phospholipasas) and the oral microenvironment conditions (temperature, pH, carbohydrates concentration, etc.)

Biomedical materials can be colonized by microorganisms producing a biofilm. Biofilms are organized in microbial communities structured within an extra cellular material womb. The phenotype of these microorganisms is different from those of the free cells in suspension (planktonic cells)

In most cases, bacterial biofilms are produced by *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. (14-17) *C. albicans* and *Candida parapsilosis* are the most frequent fungi species found in these biofilms, however, *Candida dubliniensis* species, predominant in the oral habitat, is an effective producer of biofilms on acrylic surfaces.(9) Salivary proteins (mucines mainly), that cover the oral mucous and the inert surfaces of dental prosthesis act as specific receptors of *C. albicans* and other microorganisms.(2,5) The aim of this study was to find out the prevalence of *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans* as colonizers of the oral mucous and dental prosthesis in patients wearing dental prosthesis, the association between these microorganisms and its relationship with other clinical potential co-factors.

METHODOLOGY AND MATERIALS

Patients, material and methodology

Patients. 105 patients wearing dental prosthesis were studied (43 male and 62 female with an average age of 67 years) All the patients were treated at the Prosthodontic Clinics, School of Dentistry, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F. The sample was taken from edentulous patients wearing dental prosthesis, with denture stomatitis or without it. The patients had to observe a fasting period of at least 3 hours before taking the samples, without previous oral hygiene procedures and without being under any antimicrobial treatment in a period of at least 6 months before the study.

Microbiologic samples. The patients who had agreed to participate in the study were subjected to a clinical check-up and filled up a questionnaire as anamnesis. A sample of 2ml of non stimulated saliva was taken from each patient for 5 minutes. For each patient, a sample of the internal surface of the prosthesis was also taken using a sterile cotton bud immediately after the prosthesis was removed from the oral cavity. A second sample was obtained from the oral mucous with atrophic denture stomatitis lesions, the palate mucous, the rear zone of the molars or any other zone in contact with the dental prosthesis using a sterile cotton bud. The samples were immediately placed in a Stuart transport media (BBL, EE.UU) for its subsequent processing.

Methodology. The salivary pH was tested immediately after the sample was taken using a potentiometer (Conductronic pH120, EE.UU.). For the isolation and identification of *C. albicans*, the samples were sown using the exhaustion technique in plates of chromogenic agar media, CandiSelect (Bio-Rad, France), which is a specific culture media for the growth of yeasts. It contains a nutritious base with glucose, chromogenic substrate and antibiotics in order to prevent bacteria development. Blue colonies in this media were identified as *C. albicans*. For the isolation and identification of *S. aureus*, the samples were sown

impiden el desarrollo de bacterias. En este medio las colonias azules fueron identificadas como *C. albicans*. Para el aislamiento e identificación de *S. aureus*, las muestras se sembraron en placas de agar de Chapman o agar sal-manitol (Difco, EE.UU.), que es un medio altamente selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos, contiene un 7,5% de cloruro de sodio y manitol con rojo fenol como indicador ácido-base. *S. aureus*, se identificó en éste medio por producir colonias con un halo de color dorado (producción de ácido como resultado de la fermentación del manitol), adicionalmente se realizaron las pruebas de la coagulasa y la catalasa. Para el aislamiento e identificación de *S. mutans*, las muestras se sembraron en placas de agar Mitis- Salivarius (Difco) con 0,2U.ml⁻¹ de bacitracina (Merck, EE.UU.), 15 g.l⁻¹ de sacarosa y 1 ml.l⁻¹ de solución Bacto-Chapman (telurito potásico al 1%) (BBL). En este medio, las colonias características de *S. mutans* aparecieron elevadas, convexas, onduladas, opacas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C y se evaluaron con lecturas del crecimiento microbiano a las 24 y 48 h. Los aislamientos de microorganismos se identificaron y confirmaron en cultivos puros complementariamente con la tinción de Gram y con la observación de las características microscópicas (18,19).

Se realizó una estadística descriptiva general para todas las variables con el programa SPSS 10.0 para Windows. Se identificó la prevalencia de *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans*, y la asociación entre las prevalencias mediante la prueba no paramétrica de Chi², además se identificó la asociación existente entre: sexo, ingesta de carbohidratos y presencia de estomatitis, con la presencia de *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans*. Las diferencias entre los valores de pH salival se calcularon mediante un ANOVA.

RESULTADOS

Las características clínicas generales de los pacientes se presentan en la tabla 1. Se observó la presencia de estomatitis protética atrófica en 50 pacientes (47,6 %), con un predominio de la afectación de la zona del paladar blando (en 31,4 % de los pacientes).

- *C. albicans*. Cincuenta y cuatro pacientes (51,4 %) presentaron una colonización de la mucosa bucal por *C. albicans*. Cuarenta y tres pacientes presentaron estomatitis protética atrófica asociada con la presencia en la mucosa bucal de *C. albicans* (Chi² = 48,1, p < 0,001), se encontró la presencia de *C. albicans* en 70 prótesis (66,7 % de los pacientes) Trece prótesis de pacientes con estomatitis protética estaban colonizadas por *C. albicans*

- *S. aureus*. Se aisló de la mucosa de 55 pacientes (52,4 %). En 42 pacientes con estomatitis se aisló *S. aureus* (Chi² = 48,1, p < 0,001) de la mucosa. El estudio de las muestras tomadas de las prótesis reveló la presencia de *S. aureus* en 52 pacientes (el 49,5 % de los pacientes). Dieciocho prótesis de pacientes con estomatitis protética fueron colonizadas por *S. aureus*.

- *S. mutans*. Se aisló de la mucosa de 71 pacientes (67,6 %). Únicamente ocho pacientes con estomatitis protética estaban colonizados por *S. mutans* en la mucosa bucal. El estudio de las muestras tomadas de las prótesis reveló también la presencia de *S. mutans* en 52 pacientes (el 49,5 % de los pacientes). En

in plates containing Chapman agar or Mannitol Salt Agar (Difco, EE.UU.), which is a selective media for pathogenic Staphylococcus isolation. It contains 7,5% sodium chloride and mannitol with red phenol as an acid-base marker. *S. aureus* was identified in this media by the production of golden color zones around the colonies. Additionally, catalase and coagulase tests were performed. The samples were sown in Mitis Salivarius Agar (Difco) plates for *S. mutans* identification. This media contains 0.2 U.ml⁻¹ of Bacitracin (Merck, EE.UU.), 15g.L⁻¹ of sucrose and 1ml.L⁻¹ of Bacto-Chapman tellurite solution (potassium tellurite 1%) (BBL). In this media, the characteristic colonies of *S. mutans* appeared elevated, convex, wavy, and opaque, in a dark blue color, with irregular borders, granular surface and not so adhered. All the plates were incubated at 37°C and evaluated with microbial growth readings at 24 and 48 h. Microorganisms isolation were identified and confirmed in pure cultivation. In order to complement the identification, gram stain test and microscope observation were performed. (18,19)

All the variables were analyzed through a general statistical descriptive analysis using SPSS program version 10.0 for Windows. *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans* prevalence, as well as its association were identified using the Chi² non parametrical test, whereas sex association, carbohydrates ingestion and denture stomatitis were identified with *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans* presence. ANOVA was used to calculate the differences between salivary pH values.

RESULTS

Table 1 shows general clinical patients characteristics. In 50 patients (47,6%) denture stomatitis was observed, and in 31,4% of these cases, soft palate was the affected zone.

- *C. albicans*. Fifty four patients (51,4%) showed oral mucous colonization by *C. albicans*. Forty three showed atrophic denture stomatitis associated with *C. albicans* presence in oral mucous. (Chi²=48,1, p<0,001), *C. albicans* was present in 70 dental prosthesis (66,7% of the patients) Thirteen dental prosthesis were colonized by *C. albicans*.

- *S. aureus*. It was isolated from the oral mucous of 55 patients (52,4%) *S. aureus* was isolated from the oral mucous in 42 patients with denture stomatitis (Chi²=48,1, p<0,001) Samples taken from prosthesis had revealed the presence of *S. aureus* in 52 patients (49,5%). Eighteen dental prosthesis from patients with denture stomatitis were colonized by *S. aureus*.

- *S. mutans*. It was isolated from 71 patient's oral mucous (67,6%). Oral mucous from only 8 patients with denture stomatitis was colonized by *S. mutans*. In 52 patients, samples taken from prosthesis had also revealed the presence of *S. mutans* (49,5%). *S. mutans* had colonized 20 dental prosthesis of the patients with denture stomatitis.

Acidity higher values were obtained in patients with denture stomatitis (5,2) as well as in those patients with a high carbohydrates ingestion (5,4) in comparison with the remainder patients (ANOVA p<0,001)

An association of *C. albicans* and *S. aureus* was observed in the oral mucous of 45 patients (Chi²=45,3, p<0,001), as well as in 19 patients wearing dental prosthesis. The association between

Tabla 1. Características clínico-microbiológicas de los pacientes.

Características	Pacientes			
	Total (n = 105)		Con estomatitis protética (n = 50)	
	N	%	N	%
Género (sexo)				
Masculino/ Femenino	43 / 62	41 / 59	21 / 29	42 / 58
Edad (media)	67		68	
Padecimientos sistémicos				
Diabetes mellitus	23	21,9	15	30
Hipertensión arterial	18	17,1	12	24
Tratamiento farmacológico				
Hipoglucemiantes	21	20	15	30
Antihipertensivos	21	20	12	24
Duración del tratamiento farmacológico				
1-5 años	29	27,6	15	30
6-10 años	11	10,5	9	18
11-15 años	2	1,9	2	4
16-20 años	7	6,7	4	8
+ 20 años	3	2,9	2	4
Ingesta de carbohidratos				
Alta	75	71,5	38	86
Baja	30	28,5	12	24
pH salival (media)	5,6		5,2	
Estomatitis protética (localización)				
Paladar blando			33	66
Paladar duro			5	10
Paladar duro y blando			8	16
Reborde residual			4	8
Colonización de mucosa bucal				
<i>Candida albicans</i>	54	51,4	43	86
<i>Staphylococcus aureus</i>	55	52,4	42	84
<i>Streptococcus mutans</i>	71	67,6	8	16
Colonización de la prótesis				
<i>Candida albicans</i>	70	66,7	13	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	52	49,5	18	36
<i>Streptococcus mutans</i>	52	49,5	20	40

Table 1. Clinical and microbiological characteristics (all patients)

Characteristics	Patients			
	Total (n=105)		With denture stomatitis (n=50)	
	N	%	N	%
Gender (sex)				
Male/Female	43/62	41/59	21/29	42/58
Age (average)	67		68	
Systemic Illnesses				
Diabetes mellitus	23	21,9	15	30
Arterial Hypertension	18	17,1	12	24
Pharmacological Treatment				
Hypoglycemics	21	20	15	30
Anti-hypertensive	21	20	12	24
Pharmacological Treatment Period				
1-5 years	29	27,6	15	30
6-10 years	11	10,5	9	18
11-15 years	2	1,9	2	4
16-20 years	7	6,7	4	8
+ 20 years	3	2,9	2	4
Carbohydrates ingestion				
High	75	71,5	38	86
Low	30	28,5	12	24
pH saliva (average)	5,6		5,2	
Prosthetic stomatitis location				
Soft Palate			33	66
Hard Palate			5	10
Hard and Soft Palate			8	16
Residual Edging			4	8
Mucous Colonization				
<i>Candida albicans</i>	54	51,4	43	86
<i>Staphylococcus aureus</i>	55	52,4	42	84
<i>Streptococcus mutans</i>	71	67,6	8	16
Prosthesis Colonization				
<i>Candida albicans</i>	70	66,7	13	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	52	49,5	18	36
<i>Streptococcus mutans</i>	52	49,5	20	40

Tabla 2. Colonización por *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans* en mucosa bucal y prótesis dental en el total de los pacientes.

Presencia de microorganismos en mucosa		<i>S. aureus</i>		<i>S. mutans</i>	
		si	no	si	no
<i>C. albicans</i>	si	45*	8	6	47
	no	10	42	27	25
Presencia de microorganismos en prótesis dental		si	no	si	no
<i>C. albicans</i>	si	19*	17	19*	17
	no	34	35	34	35

* Chi ² significativa (p ≤ 0,001)

Table 2. Colonization by *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans* in oral mucous and dental prosthesis (total of patients).

Presence of microorganisms in mucous		<i>S. aureus</i>		<i>S. mutans</i>	
		yes	no	yes	no
<i>C. albicans</i>	Yes	45*	8	6	47
	No	10	42	27	25
Presence of microorganism in dental prosthesis		yes	no	yes	no
<i>C. albicans</i>	Yes	19*	17	19*	17
	No	34	35	34	35

* Significant Association p≤0,001

Tabla 3. Colonización por *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans* en mucosa bucal y prótesis dental de los pacientes con estomatitis protética.

Presencia de microorganismos en la mucosa bucal		<i>S. aureus</i>		<i>S. mutans</i>	
		si	no	si	no
<i>C. albicans</i>	si	39*	4	6	37
	no	3	4	2	5
Presencia de microorganismos en prótesis dental		si	no	si	no
<i>C. albicans</i>	si	6	7	7	6
	no	12	25	13	24

* Chi² significativa (p ≤ 0,001)

Table 3. Colonization by *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans* in oral mucous and dental prosthesis in patients with denture stomatitis.

Presence of microorganisms in the oral mucous		<i>S. aureus</i>		<i>S. mutans</i>	
		yes	no	yes	no
<i>C. albicans</i>	Yes	39*	4	6	37
	No	3	4	2	5
Presence of microorganisms in dental prosthesis		yes	no	yes	no
<i>C. albicans</i>	Yes	6	7	7	6
	No	12	25	13	24

* Significant Association p≤0,001

pacientes con estomatitis 20 prótesis fueron colonizadas por *S. mutans*.

Los valores de pH salival más ácidos (5,2) se observaron en los pacientes con estomatitis protética y en aquellos pacientes que referían una alta ingesta de carbohidratos (5,4), en comparación con el resto de los pacientes estudiados (ANOVA, $p < 0,001$). En 45 pacientes se observó una asociación de *C. albicans* y *S. aureus* en la mucosa bucal ($\text{Chi}^2 = 45,3$, $p < 0,001$) y en 19 pacientes la asociación entre ambos microorganismos se observaba en las muestras de sus prótesis dentales. La asociación entre *C. albicans* y *S. mutans* se encontró en seis pacientes en mucosa bucal y en 19 en sus prótesis dentales. ($\text{Chi}^2 = 20$, $p < 0,001$) (Tabla 2). En 39 de los 50 pacientes con estomatitis protética se encontró una asociación entre *C. albicans* y *S. aureus* en mucosa bucal ($\text{Chi}^2 = 10,25$, $p \leq 0,001$). La asociación entre estos microorganismos con *S. mutans*, tanto en la mucosa bucal como en la prótesis era mucho menor (Tabla 3).

Al relacionar la presencia de estomatitis protética y la colonización microbiana en mucosa y prótesis con otros cofactores clínicos, es de resaltar que se encontró que existe una preferencia por los pacientes del género femenino en la colonización de *C. albicans* (28 mujeres), *S. aureus* (31 mujeres) y *S. mutans* (23 mujeres) se observó que de los padecimientos sistémicos se presentó un mayor porcentaje de pacientes con *diabetes mellitus* (23 pacientes 21,9%), seguido de hipertensión arterial (18 pacientes 17,1%), estos y otros factores que se mostraron con una baja frecuencia así como la alta ingesta de carbohidratos no mostraron correlación estadística con la presencia de estomatitis protética o la colonización microbiana. Pero si se observó que en los pacientes con estomatitis protética los valores de pH salival fueron más ácidos cuando su mucosa bucal estaba colonizada por *C. albicans* y *S. aureus* (ANOVA, $p < 0,001$) (Figura 1).

DISCUSION

La estomatitis protética atrófica es una lesión oral muy frecuente en pacientes portadores de prótesis dentales. En el presente estudio se observaba que el 58 % de los pacientes con estomatitis protética atrófica eran mujeres y la edad media de estos pacientes fue de 69 años, lo que confirma que afecta predominantemente a mujeres y personas de edad avanzada (1,7,20,21). Es probable que las mujeres se vean más afectadas debido a los cambios hormonales que presentan asociados a la menopausia, que influyen sobre la composición de la microbiota oral. La edad avanzada se asocia con el desarrollo de enfermedades sistémicas, modificaciones en los hábitos alimenticios e higiénicos de la cavidad bucal, y de la composición salival que junto con el uso de prótesis dentales facilitan los cambios de la microbiota oral y la aparición de lesiones en la mucosa oral (5,6,20,21). En este sentido nosotros observamos que de 23 pacientes con diabetes, 12 desarrollaron estomatitis protética y de los 18 pacientes con hipertensión arterial, todos presentaron estomatitis. Es también probable que la estomatitis protética atrófica esté asociada con los tratamientos farmacológicos que alteran las condiciones de la saliva y, a su vez, la composición de la microbiota oral y podrían ser cofactores a considerar en su implicación con la aparición de estomatitis protética y otras lesiones orales (4). En el estudio

C. albicans and *S. mutans* was found in the oral mucous of six patients and in the dental prosthesis of 19 patients. ($\text{Chi}^2=20$, $p<0,001$) (Table 2). In 39 of 50 patients with denture stomatitis ($\text{Chi}^2=10,25$, $p\leq 0,001$), an association between *C. albicans* and *S. aureus* was found in the oral mucous. The association between these microorganisms with *S. mutans* in the oral mucous and the prosthesis was lower. (Table 3).

It is important to point out that when the presence of denture stomatitis and the microbial colonization in mucous and prosthesis were related to other clinic co-factors, it was found a preference for women in the colonization of *C. albicans* (21 women) and *S. mutans* (23 women). The higher percentage of systemic illnesses was diabetes mellitus (23 patients 21,9%) followed by arterial hypertension (18 patients 17,1%). These and other not frequent factors as well as carbohydrates ingestion did not show a statistical correlation with denture stomatitis presence or microbial colonization. However, it was observed that in the patients with denture stomatitis, salivary pH values were more acid when their oral mucous were colonized by *C. albicans* and *S. aureus*. (ANOVA, $p < 0,001$) (Figure 1)

DISCUSSION

Atrophic denture stomatitis is a frequent oral lesion in those patients wearing dental prosthesis. In this study it has been observed that 58% of the patients with atrophic denture stomatitis were women with an average age of 69 years. This confirms that stomatitis affects mainly women and elderly (1,7,20,21). It is probable that women are more prone to this illness due to hormonal changes that occur in association with the menopause which can be reflected in the oral microbiota. Being elderly is associated with the development of systemic illnesses and changes of the oral nutritious and hygienic habits and also of the salivary composition that along with the use of dental prosthesis facilitate the changes of the oral microbiota and the appearance of oral lesions (5,6,20,21). Regarding the above, it is important to point out that from 23 patients with diabetes, 12 had developed stomatitis and that all 18 patients with arterial hypertension presented this problem. Since pharmacological treatments change oral microbiota and produce changes in saliva conditions, atrophic denture stomatitis is frequent in patients with systemic illnesses and these co-factors could be implicated in the development of denture stomatitis and other oral lesions. (4) In this study, 30% of the studied patients were under hypoglycemic treatments and 26% under anti-depression therapies.

The pH low conditions in saliva enhance *C. albicans* colonization. It has been observed that lower pH saliva values help *C. albicans* adherence as much as to acrylic as to the oral mucous. (22-24)

In this study it was observed that the salivary pH was more acid in patients with stomatitis colonized by *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans*, which suggests that an acid salivary pH helps denture stomatitis development.(4,5) The acid pH is also caused by a high carbohydrates ingestion diet that helps the fermentative metabolism of *C. albicans* and *S. mutans* which makes saliva more acid, increases the microorganisms development and promote their adherence. There are two possible

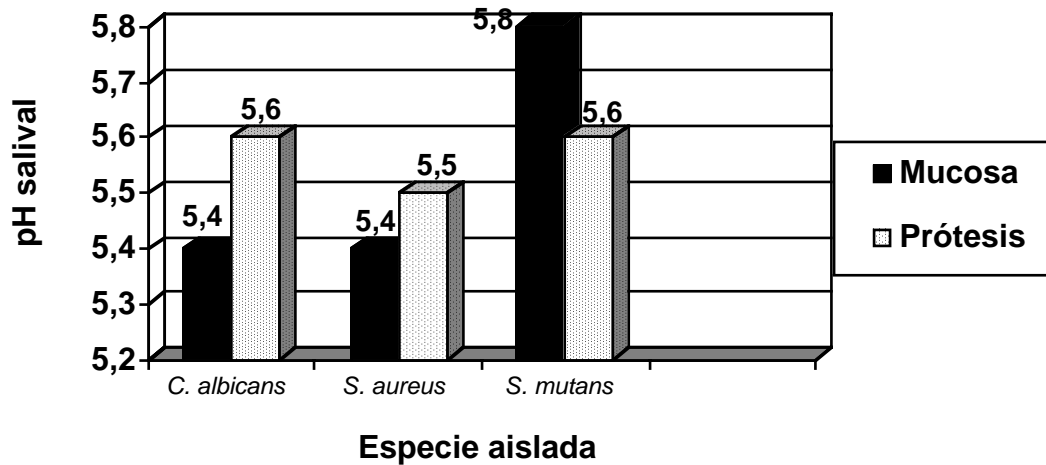


Fig. 1. pH salival de pacientes con estomatitis y su relación con la colonización por *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans*.

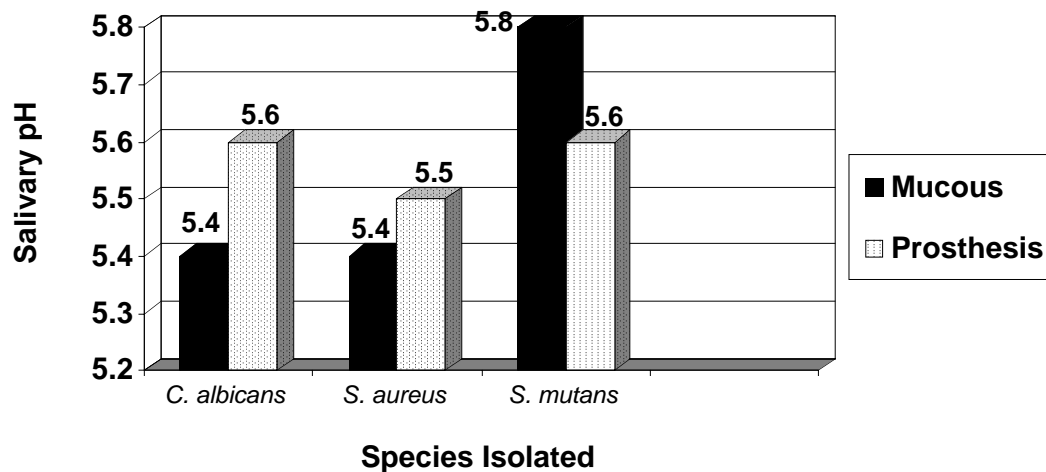


Fig. 1. Salivary pH of patients with stomatitis and its relationship with the colonization by *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans*

presente, el 30 % de los pacientes estaban sometidos a terapias hipoglucemiantes y el 26 % a terapias antihipertensivas.

Las condiciones bajas del pH salival favorecen la colonización por *C. albicans*. Se ha observado que las condiciones bajas de pH salival favorecen la adherencia de *C. albicans* tanto a los materiales acrílicos como a la mucosa oral (22-24).

En el estudio presente, se observaba que el pH salival era más ácido en pacientes con estomatitis colonizados por *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans*, lo que apoya lo referido por otros autores (4,5) que un pH salival ácido podría favorecer el desarrollo de

explanations about the influence of an acid pH in *C. albicans* colonization, the increase in adhesion capacity of the fungi to the oral epithelial cells and prosthetic materials and the acidic and acidophilic nature of the species of *Candida*. (5,9,23-25), besides, it has been demonstrated that the secretory IgA, which is an effective mechanism against *C. albicans* and other oral pathogenic agents, is more effective when the salivary pH is between 5,9 and 7,5, as in normal saliva. Its effectiveness is lesser or it can even be abolished in microenvironments with an acid or alkaline pH(22-25). This acid ambient is found in the

estomatitis protética. Este pH salival ácido también puede deberse a que una dieta alta en carbohidratos favorece el metabolismo fermentativo de *C. albicans* y *S. mutans*, lo que acidifica aún más la saliva, promueve el desarrollo de estos microorganismos y fomenta su adhesión. Dos explicaciones posibles sobre la influencia del pH ácido en el aumento de la colonización por *C. albicans* son el aumento en la capacidad de adhesión de este hongo a las células epiteliales bucales y a los materiales protéticos y la naturaleza acidúrica y acidófila de las diferentes especies de *Candida* (5,9,23-25), adicionalmente se ha demostrado que la IgA secretoria que es un mecanismo eficaz frente a *C. albicans* y otros patógenos bucales es más eficaz cuando el pH bucal está entre 5,9 y 7,5, como en la saliva normal. Su eficacia es mucho menor e, incluso, puede estar abolida en microambientes con un pH más ácido o más alcalino (22-25). Este ambiente más ácido se encuentra en el dorso de la lengua, en la mucosa debajo de la prótesis dental y en las lesiones candidiásicas (5), factores a los que nosotros asociamos mayor acidez salival.

En el estudio presente, hemos observado la presencia conjunta de *C. albicans* y *S. aureus* en la mucosa bucal de 45 pacientes y en cultivos de las prótesis de 19 pacientes. Nikawa y Samaranayake (5,26) han demostrado que los carbohidratos de la dieta favorecen la formación de biopelículas de *C. albicans* sobre materiales acrílicos. Kagermeier y Callaway (3) indican que la biopelícula formada en las prótesis dentales de pacientes con estomatitis es predominantemente bacteriana. Sin embargo, en el estudio presente, hemos observado un aislamiento más frecuente de *Candida* de la superficie de las prótesis dentales (*C. albicans* se aisló de 70 pacientes, y *S. aureus* y *S. mutans* se aislaron de 52). Por el contrario, el aislamiento en cultivos de muestras de la mucosa bucal fue predominantemente bacteriano (*S. mutans* en 71 pacientes, *S. aureus* en 55 pacientes y *C. albicans* en 54). La prevalencia de colonización por *Candida* en mucosa oral y en superficie protética fue mayor en el estudio presente que la observada por otros autores (2,5,25-28). Dar-Odeh y Shehabi (27) observaban una colonización del 28 % de los pacientes por diferentes especies de *Candida* aunque consideraban que el 72 % de las estomatitis protéticas estaban causadas por *C. albicans*. Barbeau y colaboradores (28) observaron en pacientes con estomatitis protética que la extensión e intensidad de la inflamación de las lesiones, el tabaquismo o el mantenimiento de la prótesis dental durante el sueño se relacionaban con una mayor colonización y adhesión por *C. albicans*. La presencia de *S. aureus* en la mucosa oral y las prótesis dentales en la mitad de los pacientes estudiados debe considerarse como representativo de una alta prevalencia de portadores de este microorganismo en personas con prótesis. Esta elevada colonización corrobora con lo observado por otros autores (4,15) que sugieren que *S. aureus* es un colonizador habitual de la cavidad oral y que esta colonización puede ser un reservorio potencialmente peligroso para el paciente como foco de diseminación o otras localizaciones corporales y como fuente de transmisión a otras personas, alimentos y objetos. Debemos considerar que tanto en la cavidad oral, las superficies acrílicas de las prótesis dentales y otros materiales biomédicos se forman biopelículas, las cuales han sido descritas en su mayoría como monomicrobianas; sin embargo, también se han descrito biopelículas polimicrobianas

dorsum of tongue, in the mucous under the dental prosthesis as well as in candidosis lesions (5), factors that we associate to a higher acidity in saliva.

In this study it was observed a jointly presence of *C. albicans* and *S. aureus* both in oral mucous of 45 patients as well as in the prosthesis of 19 patients. Nikawa and Samaranayake (5,26) have demonstrated that carbohydrates in the diet help the biofilm formation of *C. albicans* on acrylic materials. Kagermeier and Callaway (3) showed that the biofilm formed in dental prosthesis of patients with stomatitis is predominately bacterial. However, *C. albicans* was isolated more frequently from the prosthetic surface in this study (*C. albicans* was isolated from 70 patients and *S. aureus* and *S. mutans* were isolated from 52), contrary to the isolation in cultures of the oral mucous samples which was mainly bacterial (*S. mutans* in 71 patients, *S. aureus* in 55 patients and *C. albicans* in 54). The prevailed colonization of *Candida* in the oral mucous and the prosthetic surface was bigger in this study than the observed by other authors. (2,5,25-28). Dar-Odeh and Shehabi (27) observed a colonization of 28% by different species of *Candida*, however, they considered that the 72% of denture stomatitis were caused by *C. albicans*. Barbeau and cols (28) observed that the extension and intensity of inflammation in denture stomatitis lesions, smoking, or the use of dental prosthesis during the night were related to the colonization and adhesion of *C. albicans*. The presence of *S. aureus* on the oral mucous and dental prosthesis in half of the studied patients must be considered as a representative high prevalence of this microorganism in persons wearing dental prosthesis. This elevated colonization corroborates what it has been observed by other authors (4,15) who suggest that *S. aureus* is a normal colonizer of the oral cavity and that this colonization can be a potentially dangerous provision for the patient as a dissemination source to other corporal sites and as a transmission source to other people, food or objects.

It has to be considered that the acrylic surfaces of dental prosthesis and other biomedical materials show biofilms. These biofilms have been described in the main as monomicrobial, however, polimicrobial biofilms have also been described and the association of bacteria and fungus (*Staphylococcus-Candida* mainly) has been related to the vocal prosthesis of silicone and the acrylic dental prosthesis (14-16), situation that confirms our results. We agree that the type of material of the prosthesis and its accessories are affected in different grades by the development of the microbial biofilm (adhesion and penetration of microorganisms in the prosthetic materials) and this colonization is a powerful source of infectious problems and deterioration in the functionality of the prosthesis (14-16,29-30)

The treatment of denture stomatitis is principally based in disinfection, adjustment or change of dental prosthesis, use of mouth rinses and in most of the cases the administration of anti-fungi. In Mexico, nystatine is used in most of the cases, however it has not been considered that the microbial biofilms have more resistance to the host's defenses and less sensibility to the anti-microbial agents. (14-16,30) In the case of biofilms formed by *S. epidermidis* and *C. albicans*, there are important interactions between these microorganisms which lead to the less sensibility of these mixed biofilms with a diminution of

yla asociación de bacterias y hongos (*Staphylococcus-Candida* principalmente) han sido asociadas con prótesis vocales de silicona y con prótesis dentales acrílicas(14-16), lo que confirma nuestros resultados. Coincidimos en que el tipo de materiales que componen la prótesis y sus accesorios se ve afectado en diferente grado por la formación de la biopelícula microbiana (adhesión y penetración de los microorganismos en los materiales protéticos) y que esta colonización puede ser una fuente potencial de problemas infecciosos y de deterioro en la funcionalidad de la prótesis(14-16,29-30).

El tratamiento de la estomatitis protética se basa primordialmente en la desinfección, ajuste o cambio de las prótesis dentales, uso de colutorios y en la mayoría de los casos la administración de antifúngicos, en México se utiliza primordialmente la nistatina, sin embargo no se ha considerado que las biopelículas microbianas presentan una mayor resistencia a las defensas del hospedador y una menor sensibilidad a los agentes antimicrobianos (14-16,30). En el caso concreto de las biopelículas formadas entre *S. epidermidis* y *C. albicans* hay interacciones importantes entre ambos microorganismos que conducen a una menor sensibilidad de éstas biopelículas mixtas con una disminución tanto de la acción bactericida de la vancomicina como de la acción antifúngica del fluconazol (25). Esta resistencia antimicrobiana puede estar relacionada con una incapacidad del fármaco de penetrar en la matriz de la biopelícula, con el diferente ritmo de crecimiento celular de los microorganismos que componen la comunidad microbiana o con mecanismos específicos de expresión de genes de resistencia antimicrobiana (30). La nistatina y otros polienos de aplicación tópica poseen una acción inhibitoria sobre la adhesión de *C. albicans* y *C. glabrata* a células epiteliales bucales. Esta acción se observa incluso con concentraciones subinhibitorias de nistatina que han persistido después de un tratamiento antifúngico tópico de lesiones orales candidiásicas. Sin embargo, el efecto es mayor cuando el tratamiento se realiza en las primeras fases del desarrollo de la adhesión. El efecto añadido antimicrobiano sobre el crecimiento y viabilidad de los cocos Gram positivos (como *Staphylococcus* spp. o *Streptococcus* spp.) puede ser útil para combatir las colonizaciones microbianas y biopelículas mixtas.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican la asociación de bacterias y hongos (*Staphylococcus-Candida*, principalmente) en la colonización de la mucosa oral y las prótesis dentales de pacientes con estomatitis protética, esto aunado a la etiología multifactorial y cofactores asociados de la estomatitis protética hace que su manejo terapéutico resulte muy complicado. Los estudios que se están realizando para definir el papel de *Candida* y otros microorganismos en la patogenia de este y otros procesos, en la formación de biopelículas pueden aportar datos de gran interés para mejorar el tratamiento de esta enfermedad, debemos considerar que las asociaciones microbianas encontradas indican la formación de biopelículas mixtas y que estas presentan diferentes patrones de sensibilidad a antisépticos utilizados en los colutorios bucales y a fármacos antifúngicos o antimicrobianos. El tratamiento farmacológico para la estomatitis protética deberá considerarse

the bactericide action of vancomicine as well as the anti-fungi action of fluconazol (25).

This anti-microbial resistance can be related to the medication incapacity of penetration on the biofilm, with a different rhythm of cellular growth of the microorganisms that compose the microbial community or with specific mechanisms for the genes expression of anti-microbial resistance (30). Nystatine and other polyenes of local application possess an inhibitory action in the adherence of *C. albicans* and *C. glabrata* to oral epithelial cells. This action is observed even with sub inhibitory concentrations of nystatine which have persisted after the local anti-fungi treatment of candidosic oral lesions. However, the effect is bigger when the treatment is applied in the first stage of adherence development. The antimicrobial effect added to the growth and viability of Gram positive coccus (such as *Staphylococcus* spp. or *Streptococcus* spp.) is useful in the battle against the microbial colonization and mixed biofilms.

CONCLUSIONS

Our results have demonstrated the association between bacteria and fungi (*Staphylococcus-Candida* principally) in the colonization of oral mucous and dental prosthesis in patients with denture stomatitis. Due to the multi-factor etiology and associated cofactors, therapeutic management of denture stomatitis becomes complicated. Nowadays, several studies about pathogenesis have been developed to determine the role of *Candida* and other microorganisms in biofilms formation. These studies can give us important information in order to improve the treatment of this illness. We must consider that microbial associations found in this study, show the formation of mixed biofilms and that these biofilms present different sensibility patterns in contact with antiseptics used as mouth rinses and anti-fungis or antibiotics. Pharmacological treatment of denture stomatitis must be considered for the fungus as well as the bacteria and it is important to continue the study of these microbial associations.

Luis Octavio Sanchez Vargas has been financed by the Programa de Becas MAE Curse 2002-2003 of the Agencia Española de Cooperación Internacional. Guillermo Quindós has been financed by the projects 1/UPV 00093.327-E-14645/2002 of the Universidad del País Vasco- Euskal Herriko Unibertsitatea and PI030662/2003 of the Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad.

tanto para hongos como para bacterias y seguir estudiando estas asociaciones microbianas.

Agradecimientos

Luis Octavio Sánchez Vargas ha sido financiado por el Programa de Becas MAE Curso 2002-2003 de la Agencia Española de Cooperación Internacional. Guillermo Quindós ha sido financiado por los proyectos 1/UPV 00093.327-E-14645/2002 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea y PI030662/2003 del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Balerdi I, Aguirre JM, Zamacona JM, Ajuria B, Pontón J, Quindós G. Analyse clinique et microbiologique de la stomatite par prothese. Actualités Odonto Stomatologiques 1994; 186: 173-183.
- Nikawa H, Taizo H. Denture plaque-past and recent concerns. J Dent 1998; 26: 299-304.
- Kagermeier-Callaway A, Willershausen B. In vitro colonisation of acrylic resin denture base materials by *Streptococcus oralis* and *Actinomyces viscosus*. Int Dent J 2000; 50:79-85.
- Sánchez-Vargas LO, Pérez-Ríos P, Romo-García J, Corona-Izquierdo FP, Hidalgo-Loperena H, Franco-Martínez F. Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidiasis bucal. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 155-160.
- Samaranayake LP, MacFarlane TW (Eds.). Oral candidiasis. London: Butterworths & Co. Ltd.; 1990.
- Budtz-Jorgensen E. Non-insulin dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. J Oral Pathol 1996; 25:411-415.
- Aguirre JM, Verdugo F, Zamacona JM, Quindós G, Pontón J. Cytological changes in oral mucosa in denture stomatitis. Gerodontology 1996; 13: 63-67.
- Smith AJ, Brewer A, Kirkpatrick P, Jackson MS, Young J, Watson S, Thakker B. Staphylococcal species in the oral cavity from patients in a regional burns unit. J Hosp Infect 2003; 55: 184-189.
- Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Pontón J, Quindós G, Aoki S, Ito-Kuwa S. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 52-54.
- Jenkinson H, Harish C. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other *Streptococci* with *Candida albicans*. Infec Immun 1990; 58:1429-1436.
- Nikawa H, Egusa H. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. Oral Microbiol Immunol 2001; 16: 279-284.
- Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Kelley JI, Baqui AAMA, Meiller TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. J Clin Microbiol 1999;37:1464-1468.
- Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr., Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 17-22.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-193.
- Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 139-143.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PB, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001; 183: 5385-5394.
- Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 163-170.
- Quindós G, Pontón J. Candidiasis de la cavidad oral: Etiología, patogenia y diagnóstico de laboratorio. Med Oral 1996; 1: 85-95.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.). Manual of Clinical Microbiology. 7th Ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1999.
- Erkki O. Factors predisposing to oral yeast infections. Acta Odontol Scand 1990; 48:71-74.
- Vitkov L, Lugstein A. Glycaemic disorders in denture stomatitis. J Oral Pathol Med 1999; 28: 406-409.
- San Millán R, Elguezabal N, Regúlez P, Moragues MD, Quindós G, Pontón J. Effect of salivary secretory IgA and monoclonal antibodies on the adhesion of *Candida albicans* to plastic. Microbiology 2000; 146: 2105-2112.
- Bikandi J, Moragues MD, Quindós G, Polonelli L, Pontón J. Influence of environmental pH on the reactivity of *Candida albicans* with salivary IgA. J Dent Res 2000; 79: 1439-1442.
- Pontón J, Bikandi J, Moragues MD, Arilla MC, Elósegui R, Quindós G, Fisicari P, Conti S, Polonelli L. Hypha formation in *Candida albicans* decreases the reactivity of the fungus with salivary sIgA. J Dent Res 1996;75: 1979-1985.
- Adam B, Baille GS, Douglas J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol 2002; 51: 344-349.
- Nikawa H, Samaranayake L. Effects of dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycopathologia 1997; 139: 87-91.
- Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. Mycoses 2003; 46: 187-191.
- Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, Rompre P, Deslauriers N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-induced stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 95: 51-59.
- Nikawa H, Jim C, Makihira S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. J Oral Rehabil 2003; 30: 243-250.
- Jabra-Rizk MA, Flakler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. Emerg Infect Dis 2004; 10: 14-19