

Análisis de un brote de *Candida albicans* en la Unidad del Recién Nacido del Hospital Civil Fray Antonio Alcalde de Guadalajara, México

Becerra Gerardo*
Rivera Mendoza Carlos**
Kimble Plascencia Erik Lesley**
Plascencia Hernandez Arturo**
Sánchez González Roberto Alejandro***
Hernández Cañaveral Iván Isidro*

Analysis of an outbreak of *Candida albicans* in the Newborn Unit of Civil Hospital Fray Antonio Alcalde in Guadalajara, Mexico

Fecha de aceptación: octubre 2011

Resumen

El género *Candida* está implicado en varios procesos patológicos en infecciones intrahospitalarias. El desarrollo de métodos diagnósticos hace posible el aislamiento, identificación y monitoreo del género *Candida*. El propósito de este estudio fue describir un brote de candidiasis en la Unidad del Recién Nacido por medio de métodos microbiológicos y moleculares.

MÉTODOS. Tres casos clínicos fueron descritos por medio de estudios micológicos y moleculares con el fin de identificar microorganismos y obtener el diagnóstico correcto de las levaduras obtenidas de hemocultivos.

RESULTADOS. Las cepas de *Candida albicans* fueron identificadas de manera fenotípica y genotípica. Evaluamos los tres casos clínicos e identificamos los factores de riesgo asociados al brote.

CONCLUSIÓN. Los factores de riesgo de transmisión fueron el uso de antibacterianos de amplio espectro y el uso de catéteres intravenosos.

Palabras clave: *Candida albicans*, pacientes pediátricos, brote.

Abstract

The genus *Candida* is involved in different pathological processes in intrahospitalary infections. Development of diagnostic methods has made possible isolation, identification and monitoring of genus *Candida*. The purpose of this study was to describe a *Candida albicans* outbreak at the Newborn Unit.

METHODS. Three clinical cases were described by a mycological and molecular study in order to identify the microorganism and obtain a correct diagnosis of the yeast isolated from blood culture.

RESULTS. The *Candida albicans* were phenotypically and genotypically identified. We evaluated the clinical cases and identified the risk factors associated to the outbreak.

CONCLUSION. The risk factors of transmission were use of broad spectrum antibacterial agents and use of intravenous catheters.

Key words: *Candida albicans*, pediatrics, outbreak.

Introducción

El género *Candida* está relacionado con varios procesos patológicos e infecciones nosocomiales.^{1,2} *Candida spp.* se encuentra en la microbiota normal de la piel, mucosas, tracto digestivo y sistema genitourinario.³ El hospedero y las levaduras se encuentran en equilibrio, que puede ser

fácilmente alterado por varios factores, incluyendo deficiencias en el sistema inmune del hospedero, el deterioro de las barreras naturales, la virulencia del hongo y la administración de antibióticos que cambian la microflora, así como los procedimientos quirúrgicos, como la implantación

*Departamento de Microbiología y Patología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Jal., México.

**Servicio de Infectología Pediátrica, Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, Guadalajara, Jal., México.

***Hospital Regional de Alta Especialidad Ciudad Salud, Tapachula, Chiapas, México.

Correspondencia: Iván Isidro Hernández Cañaveral
Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, México.

Sierra Mojada Núm. 950 colonia Independencia CP 4434.

Teléfono: (52) 3310-585200, ext. 3656.

Dirección electrónica: ivanhzc21@yahoo.com.mx

de catéteres venosos, generando una relación parasitaria llamada candidiasis.⁴

En la última década el diagnóstico de *Candida spp.* ha tomado importancia debido a su habilidad de invadir tejido y generar resistencia a antifúngicos en hospitales.^{5,6}

Con las actualizaciones en métodos diagnósticos, es posible aislar, identificar y tipificar cepas del género *Candida*. Sin embargo los métodos de cultivo no pueden diferenciar entre especies, este aspecto toma importancia debido a que algunas especies tienen resistencia intrínseca a varios antimicóticos como el fluconazol.⁷ La distribución del género *Candida* ha sido monitoreada en varios países de América Latina por reacción de cadena de la polimerasa (PCR) y métodos convencionales siendo *C. albicans* el patógeno más frecuentemente aislado; sin embargo la incidencia de las especies de *Candida* como *C. glabrata* y *C. tropicalis* se ha incrementado.^{8,9}

Por lo tanto su determinación específica es necesaria para establecer la terapia antimicótica adecuada.

En México *C. albicans* es aislada frecuentemente en un alto porcentaje en comparación con las especies no *albicans* de *Candida*.^{10,11} El objetivo de este estudio fue describir un brote de candidiasis en la unidad neonatal del Hospital Civil Fray Antonio Alcalde en los meses de marzo y abril del 2010, y evaluarlo mediante técnicas microbiológicas y moleculares e identificar factores de riesgo.

Material Y Métodos

Descripción de los casos

Caso 1. Paciente pediátrico de sexo masculino admitido el 15 de marzo del 2010. Nació por parto con un peso de 1100 gramos y con una edad gestacional (EG) de 36 semanas, la puntuación Apgar fue de 3 sobre 5 en 1 minuto y 5 minutos. Requirió durante 46 días ventilación mecánica artificial (VMA), catéter venoso central (CVC) y nutrición parenteral (NPTC). Recibió tratamiento antibiótico (meropenem, vancomicina, ciprofloxacina y linezolid). En el décimo séptimo día de hospitalización se le practicó un hemocultivo el cual resultó positivo para *C. albicans*. La fungemia duró 20 días durante los cuales el paciente desarrolló una infección del tracto urinario. Fue tratado con anfotericina 1 mg por kilogramo durante 24 horas y fluconazol 6 mg por kilogramo con una dosis de carga de 10 mg por kilogramo durante el primer día, caspofungina 1.5 mg por kilogramo por 24 horas. El paciente falleció 91 días después de su admisión.

Caso 2. Paciente de sexo femenino admitido el 3 de abril del 2010, nació por cesárea y tuvo una edad gestacional de 33.3 semanas con un peso de 1270 gramos y la puntuación Apgar fue de 4 y 6 al minuto y 5 minutos, requirió CVC y VMA durante 21 y 61 días respectivamente, el día 24 requirió NPTC. Recibió tratamiento antibiótico de ciprofloxacina, vancomicina, amikacina y meropenem. En el día 12 de admisión presentó un hemocultivo positivo para *C. albicans*. La fungemia duró 27 días y durante los que recibió anfotericina 1 mg por kilogramo cada 24 horas, y fluconazol 6 mg por kilogramo cada 24 horas con una

dosis de carga de 10 mg por kilogramo durante el primer día, caspofungina 1.5 mg por kilogramo cada 24 horas. La paciente falleció el 14 de junio del 2010.

Caso 3. Paciente del sexo femenino admitido el 21 de abril del 2010. La paciente nació por parto, a término, con un peso de 3800 gramos, puntuación Apgar 3 y 5 al minuto y 5 minutos, después de tres días fue sometida a CVC, nueve días después requirió VMA y NPTC.

El tratamiento terapéutico fue meropenem y vancomicina y 4 días después dio positivo su hemocultivo a *C. albicans*. Se le administró anfotericina 1 mg por kilogramo cada 24 horas y fluconazol 6 mg por kilogramo cada 24 horas con una dosis de carga de 10 mg por kilogramo en el primer día, caspofungina 1.5 mg por kilogramo cada 24 horas. La paciente fue dada de alta el 2 de julio del 2010.

Estudio micológico

Las levaduras aisladas fueron identificadas mediante el medio CHROMagar *Candida*^{MR} (París, Francia). Todas las placas fueron incubadas durante 24-96 horas a 37 °C bajo condiciones aeróbicas. Las propiedades metabólicas fueron evaluadas mediante el sistema API-*Candida*-20C identification kit (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Francia) y fueron comparados con una cepa de *C. albicans* (ATCC 36801) como control positivo.

Extracción de ADN

El método basado en litica fue usado para extraer ADN y se basó en el protocolo previo de Fujita y colaboradores.¹² Las levaduras aisladas fueron cultivadas en agar Sabouraud durante 24 a 48 horas a 35 °C. Las colonias aisladas fueron incubadas en 1 ml de Tris-EDTA (TE) ajustado a un estándar McFarland de 0.5. Después de centrifugación (5,000Xg 3 minutos) en un tubo de microfuga, los sedimentos fueron resuspendidos en 0.1 ml de sorbitol y EDTA (1M-1M pH 7.5) conteniendo 5 µl de β-mercaptoetanol y 1 mg de litica (Sigma Cemicl Co, ST Louis Mo.) La mezcla fue incubada por 15 minutos a 37 °C. Finalmente, se le adicionó a la mezcla 5 µl de solución de proteinasa K (20 mg/ml), y la mezcla fue incubada a 55 °C durante 10 minutos en baño maría por 5 minutos.

Reacción de PCR

Para la identificación los primers usados fueron los ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3'), ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'), e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') con el fin de identificar la regiones conservadas 18S, 5.8S, y 28S ADNr de acuerdo con las recomendaciones de trabajos anteriores.¹² La amplificación fue desarrollada a un volumen de 50 µl.

La amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos a 30 ciclos de desnaturalización, alineación en 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 4 minutos. El sistema Perkin Elmer 480 fue usado para esta técnica.

Electroforesis

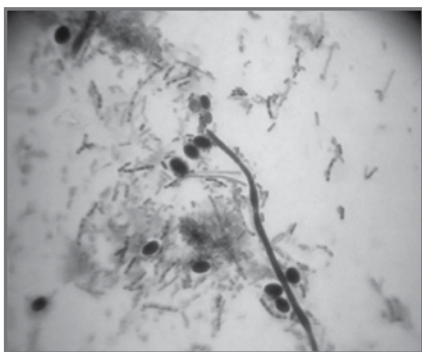
Los productos de amplificación junto con el marcador de peso molecular (GeneRuler 50bp DNA ladder Fermentas®) fueron corridos en geles de agarosa al 1.5% con un búfer TBE en un voltaje de 300 mV durante 45 minutos.

Resultados

Los aislados de los hemocultivos fueron identificados de manera fenotípica mediante el medio CHROMagar y tinciones de Gram (Fotografía 1), las propiedades genotípicas fueron evaluadas por la técnica de PCR; para evitar identificaciones erróneas la amplificación de RNA 18S fue comparada con un control ATTC y otras especies no *albicans* de *Candida* como *C. tropicalis* y *C. parapsilopsis*. Se observaron las características de *C. albicans* comparada con la cepa ATTC. La amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 muestra las bandas correspondientes a *C. albicans* (Fotografía 2).

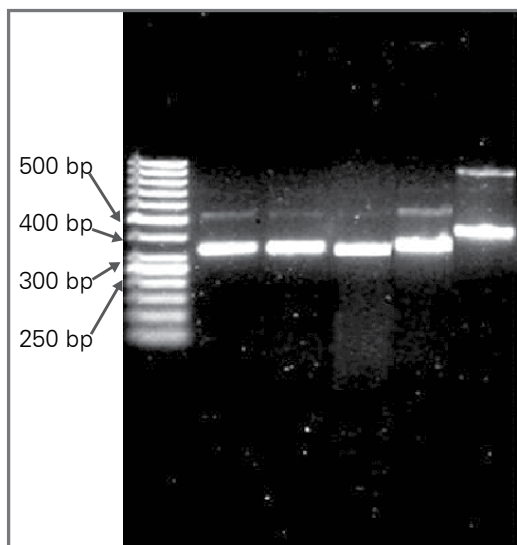
Fotografía 1

Observación microscópica de un aislado clínico de un paciente pediátrico, la imagen muestra la estructura morfológica típica de levaduras y pseudohifas.



Fotografía 2

Geles de agarosa mostrando los amplificados de PCR de las tres *C. albicans* aisladas del brote: Línea 1, marcador molecular de 50 pb; Línea 2,3,4, muestran las líneas aisladas del brote; Línea 5 muestra una cepa ATTC 90028 de *C. albicans* para referencia; Línea 6 muestra una especie no *albicans* (*C. glabrata*).



Los factores de riesgo asociados con el brote fueron el uso de antibióticos de amplio espectro y larga estancia con CVC. Se realizaron reuniones mensuales con los neonatólogos y pediatras para evaluar: la epidemiología de la flora bacteriana, analizar problemas y revisar casos de CVC. Se cerró de manera temporal el servicio.

Discusión

Candida spp. es una causa de infecciones locales y sistémicas. La incidencia de candidemia se ha incrementado durante varias décadas. La candidemia ocurre usualmente en un intervalo de 0.5 a 1% de los casos por 1000 pacientes admitidos en el servicio de cuidados intensivos neonatales. *C. albicans* es la especie más comúnmente aislada en muestras clínicas y se encuentra entre el 50-70% de los casos de candidiasis invasiva, seguidos de *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. La identificación adecuada es requerida con el fin de establecer un tratamiento correcto porque algunas especies no *albicans* han demostrado resistencia intrínseca a algunos agentes antifúngicos.⁷

Algunos factores predisponentes están implicados en sepsis neonatal como el uso de agentes antibacterianos de amplio espectro, bajo peso al nacer, nacimiento prematuro, nutrición parenteral, pacientes con ventilación e intubación endotraqueal.

La incidencia de candidemia es baja en pacientes con bajo peso al nacer (< 1500) es reportada en un 3-4%, con mal pronóstico, en el presente estudio dos de los pacientes (caso 1 y caso 2) murieron en la unidad del recién nacido. Uno de los pacientes fue prematuro (caso 2), la prematuridad es un factor de riesgo muy importante debido a que el sistema inmunológico está inmaduro y los linfocitos T y neutrófilos son bajos.¹³

La aplicación de CVC constituye un procedimiento invasivo y expone al paciente al ambiente externo; fue necesario monitorear el catéter así como la aplicación de precauciones de barrera al retirar los catéteres si no son necesarios.

Después del brote determinamos qué microorganismo fue aislado en todos los casos del catéter usado para la aplicación de NPT, así que se procedió al cierre temporal de la unidad y a aplicar las medidas de sanidad mencionadas anteriormente.

La aplicación de antibióticos de amplio espectro fue un factor importante en el desarrollo de la fungemia debido a la eliminación de la flora normal que competía con las levaduras.

Frecuentemente el aislamiento del patógeno no es necesario para relacionarlo con un brote porque el aislamiento coincide varias veces, así que es necesario identificar un elemento común para reducir el impacto epidemiológico cuando se remueva. En otros brotes de enfermedades se ha relacionado la presencia de intercambio de objetos, así como el incumplimiento de las precauciones básicas en el manejo del bebé y el lavado de manos, lo

cual por lo general conduce a la transmisión horizontal de patógenos.¹⁴

En nuestros pacientes se identificaron microorganismos de la piel que sumados a los catéteres usados en la aplicación de NPT fueron probablemente los factores predisponentes para la septicemia.

Referencias

1. Kossoff E H, Buescher E S, Karlowicz M G 1998. "Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases". *Pediatr Infect Dis J* 7:504-508.
2. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Blumberg HM, Pfaller M, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W 2001. "Risk factors for Candida species colonization of neonatal intensive care unit patients". *Pediatr Infect Dis J* 20:1119-1124.
3. Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH y Pfaller MA 2007. Murray PR. *Manual of clinical microbiology*. 9a ed. Vol. II, ASM Press, Washington, p. 2256.
4. Filler SG, y Sheppard DC 2006. « Fungal Invasion of normally non-phagocytic host cells". *PLoS Pathog* 2: 129.
5. Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Kugler KC, Beach ML, Sader HS 2000. "Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with blood stream infections in the USA, Canada, and Latin America SENTRY Participants Group". *Int J Antimicrob Agents* 13:257-271.
6. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R 2006. "Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance". *Int J Antimicrob Agents* 27: 359-366.
7. Swinne D, Watelle M, Van der Flaes M, Nolard N 2004. "In vitro activities of voriconazole (UK-109, 496), fluconazole, itraconazole and amphotericin B against 132 non-albicans bloodstream yeast isolates (CANARI study)". *Mycoses* 47:177-83.
8. Pfaller M A, Jones R N, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ 2000. "Bloodstream infections due to Candida species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998". *Antimicrob Agents Chemother* 44:747-751.
9. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, da Matta DA, Colombo AL 2003. "Species distribution and antifungal susceptibility profile of Candida spp. Bloodstream isolates from latin american hospitals". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 401-405.
10. Bautista-Muñoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C 2003. "Identification of Candida spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between Candida albicans and Candida dubliniensis by direct PCR methods". *J Clin Microbio* 41:414-20.
11. Olivas-Escárcega V, Rui-Rodríguez MS, Fonseca-Leal MP, Santos-Díaz MA, Gordillo-Moscote A, Nernández-Sierra JF, de J Pozos-Guillén A. 2008. "Prevalence of oral candidiasis in chronic renal failure and renal transplant pediatric patients". *J Clin Pediatr Dent* 32:313-317.
12. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T 2001. "Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains". *J Clin Microbiol* 39: 3617-3622.
13. Schelonka RL, Infante AJ 1998. "Neonatal immunology". *Semin Perinatol* 22:2-14.
14. Damjanovic V, Connolly CM, van Saene HK, Cooke RW, Corkill JE, van Belkum A, van Velzen D 1993. "Selective decontamination with nystatin for control of a Candida outbreak in a neonatal intensive care unit". *J Hosp Infect* 24: 245-259.