

- 236 -

Vol. 32, Nº 4
Año 2000

REVISTA ARGENTINA DE
MICROBIOLOGIA

PUBLICACION DE LA ASOCIACION ARGENTINA DE MICROBIOLOGIA

Transmisión nosocomial de *Candida albicans* en recién nacidos

L. RODERO¹, F. HOCHENFELLNER¹, H. DEMKURA², R. PEREDA³, S. CÓRDOBA¹, C. CANTEROS¹, M. J. RIAL³, G. DAVEL¹

¹Departamento de Micología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr Carlos G. Malbrán, Av. Velez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, ²Laboratorio de Microbiología, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata,

³Laboratorio de Microbiología, Hospital de Niños Pedro Elizalde, Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. FAX: 5411-4302-5066. E-mail: lrodero@mail.retina.ar

RESUMEN

La mayoría de los neonatos se colonizan con *Candida* spp. ya sea por transmisión vertical (a partir de la madre) u horizontal (por adquisición nosocomial). En estudios preliminares se determinó que *Candida albicans* es el principal agente causal de estas infecciones. A fin de determinar la existencia de transmisión nosocomial, se investigaron todas las cepas de *Candida albicans* (n=26) aisladas de pacientes con candidiasis en 2 salas de neonatología de un hospital de pediatría durante 18 meses. Además se estudiaron 14 aislamientos provenientes de pacientes y de las manos del personal, involucrados en dos posibles brotes en una unidad de terapia intensiva (UTI) y una sala de neonatología de otro hospital pediátrico. Todas las cepas fueron caracterizadas genotípicamente utilizando la técnica de Southern blot e hibridando con la sonda específica para *Candida albicans* 27A. Las cepas provenientes de uno de los hospitales fueron caracterizadas utilizando además otra sonda específica para *Candida albicans* Ca3. Los patrones de bandas obtenidos permitieron demostrar la existencia de transmisión horizontal en todas las salas estudiadas. En una de las salas de neonatología se pudo establecer la transmisión de una cepa entre 4 pacientes a lo largo de un período de 10 meses. En la otra sala se detectaron 3 casos aislados de transmisión entre 2 pacientes, las que ocurrieron en un período de 2 a 20 días. El estudio de las cepas provenientes de los brotes permitió demostrar la existencia de transmisión entre 2 enfermeras y un paciente en un caso (neonatología), y la infección simultánea de 3 pacientes en otro (UTI). La hibridación con sonda Ca3 en adición a la sonda 27A no aumentó el poder de discriminación entre aislamientos. El análisis genotípico permite no sólo la confirmación de la transmisión y la persistencia de las cepas durante periodos prolongados o en brotes esporádicos, sino también facilita las decisiones epidemiológicas necesarias a fin de optimizar las medidas tendientes al control de la infección fúngica nosocomial.

Palabras claves: *Candida albicans*, infecciones fúngicas, transmisión nosocomial

SUMMARY

Nosocomial transmission of *Candida albicans* in neonates. *Candida* spp. colonization in neonates occurs due to vertical or horizontal transmission. Preliminary studies determined that *Candida albicans* is the principal agent of these infections. In order to establish nosocomial transmission, 26 *Candida albicans* strains isolated from patients with candidosis hospitalized during a 18-month period in 2 neonatal intensive care units (NICU) from a pediatric hospital were studied. Fourteen isolates from patients and health care workers, involved in possible outbreaks of an intensive care unit (UCI) and a NICU from another pediatric hospital were also studied. All *Candida albicans* strains were genotyped by Southern blot hybridization with 27A. Isolates for outbreak confirmation were also hybridized with another specific *Candida albicans* probe, Ca3. Hybridization patterns demonstrated horizontal transmission in all the units studied. In a NICU, transmission among 4 patients during a 10-month period could be established and in the other NICU, 3 cases of transmission among 2 patients each were demonstrated in periods of 2 to 20 days. The outbreak studies showed the same strain isolated from 2 nurses and from one patient at the NICU and at the ICU identical strains were found in 3 patients. In this study, hybridization with Ca3 in addition

to 27A probe did not increase discrimination power among isolates. Genotypic analysis allows, not only, determination of transmission and persistence of strains during prolonged periods or in sporadic outbreaks, but also facilitates necessary epidemiological decisions for optimizing nosocomial fungal infection control measures.

Key words: *Candida albicans*, fungal infections, nosocomial transmission.

INTRODUCCION

Durante las dos últimas décadas diversos estudios han documentado el incremento de las candidiasis nosocomiales, constituyendo el género *Candida* la sexta causa más común en infecciones hospitalarias. En los pacientes con candidemia el rango de mortalidad es del 34% (13).

En la población pediátrica la frecuencia de infecciones fúngicas sistémicas es cada vez mayor, en especial en los niños inmunocomprometidos entre los que se incluyen aquéllos con inmunodeficiencia fisiológica (neonatos), los inmunodeficientes congénitos (déficit de granulocitos, déficit de linfocitos T o B, alteraciones del sistema del complemento, hipoesplenismo, fibrosis quística, etc) y los inmunodeficientes por una patología de tipo infeccioso (SIDA) o no infeccioso (hemopatías, tumores malignos, radioterapia, quimioterapia, trasplante, malnutrición, cirugía, diabetes, quemaduras, etc) (9).

La mayoría de los neonatos, tanto prematuros como recién nacidos a término, se colonizan en el canal de parto por *Candida* spp, procedentes del tracto gastrointestinal o aparato genital maternos (1, 14, 16). En el prematuro y en el recién nacido de bajo peso, esta colonización orofaríngea e intestinal puede desempeñar un importante papel en el desarrollo de candidiasis sistémicas. Las unidades de terapia intensiva (UTI) pediátricas y neonatales, donde los pacientes son sometidos a múltiples técnicas invasivas (catéteres centrales, intubación, biopsias, alimentación parenteral, etc) contribuyen al desarrollo de infecciones fúngicas nosocomiales (5, 6, 12, 24).

Si bien los factores de riesgo específicos de las candidemias han sido determinados en neonatos, poco se sabe sobre la epidemiología de la candidemia en las salas de neonatología.

El estudio epidemiológico de las infecciones por *Candida* spp. se realiza utilizando diversos

métodos de biología molecular basados en la detección del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLPs), del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos amplificados mediante PCR (AFLPs), cariotipificación y Southernblot y posterior hibridación con sondas específicas (3, 4, 10, 18, 20, 23). Si bien todos los métodos son potencialmente útiles y eficaces para la diferenciación de cepas, la técnica de "fingerprinting" utilizando sondas específicas no sólo permite identificar una misma cepa en distintos aislamientos y diferenciar completamente las cepas no relacionadas, sino que además facilita la agrupación de las cepas moderadamente relacionadas entre si (11).

El objetivo de este trabajo fue determinar la existencia de transmisión horizontal de *C. albicans* y la posible persistencia de las cepas en las unidades de terapia intensiva pediátrica y neonatal de dos hospitales pediátricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se estudiaron 14 aislamientos de *C. albicans* provenientes de 8 pacientes y de 3 integrantes del personal, involucrados en dos posibles brotes en una sala de UTI y una sala de neonatología del Hospital Pedro Elizalde (PE). Además se estudiaron 26 cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes internados en dos salas de neonatología del Hospital Sor María Ludovica (SML) durante el período julio de 1996 - diciembre de 1997.

Todos los aislamientos provenientes de pacientes fueron obtenidos de cultivos de sangre y/o catéter, reaislados y conservados en medio de Sabouraud. Se les realizó la prueba de tubo germinativo y el estudio de formación de clamidoconidios (clamidosporos) en medio de bilis de Feo para su identificación (8). En los casos que ambas pruebas fueron positivas, se identificó la levadura como *C. albicans*.

Muestreo de las manos del personal

Se realizó en 24 enfermeras y en 9 médicos, sin preparación previa, por inmersión y lavado en una bolsa plástica con 100 ml de solución fisiológica estéril. Los lavados fueron centrifugados y sembrados en medio de Sabouraud con cloranfenicol e incubados a 37 °C por una semana. Solo en tres muestras se obtuvo desarrollo de *C. albicans*.

Análisis genotípico de *C. albicans*

Extracción de ADN: Se utilizó el método descrito previamente por Scherer *et al* (22). La concentración de ADN fue estimada por comparación de las intensidades de las muestras con la cantidad conocida de ADN del fago lambda en un gel 0,8% de agarosa.

Restricción enzimática: El ADN genómico (5 mg) fue digerido con Eco R1. Los fragmentos resultantes fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% durante 16 h a 30 V y 28 mA.

Hibridación: Se utilizaron 2 sondas específicas para *C. albicans*, la sonda 27A (22) (cedida gentilmente por el Dr. Scherer) y la Ca3 (21, 23) (cedida gentilmente por el Dr. Soll), ambas con secuencias repetitivas del genoma de *C. albicans*. Las sondas, una vez extraídas y purificadas (21-23) fueron luego marcadas con DIG-11-dUTP (DIG ADN labelling and detection kit, 1093 657, Boehringer Mannheim).

Los fragmentos de restricción de ADN de los aislamientos de *C. albicans* fueron transferidos por capilaridad desde el gel a una membrana de nylon. Las membranas de nylon transferidas fueron prehibridizadas en una solución de 5xSSC (0,1% N-lauroylsarcosine, 0,02% SDS y 2% blocking reagent DIG ADN labelling and detection kit) a 65 °C durante 4 h. Luego fueron hibridizadas con la misma solución más el agregado de la sonda 27A o de la sonda Ca3 marcadas. Se incubaron a 65 °C durante toda la noche. Las membranas fueron removidas y lavadas dos veces con 2x SSC con 0,1% SDS a temperatura ambiente y luego se realizaron otros dos lavados con 0,5x SSC con 0,1% SDS a 65 °C. Por último, fueron lavadas (1-2 min) en un buffer 0,1 M ac. maleico, 0,15 M ClNa pH 7,5 con 0,3% Tween 20. El análisis de los patrones de bandas se realizó visualmente.

RESULTADOS

La caracterización genética de los aislamientos de *C. albicans* provenientes de la UTI y de la sala de neonatología del Hospital PE fue realizada mediante la hibridación con ambas sondas específicas de *C. albicans* 27A y Ca3.

El análisis visual de los patrones de bandas obtenidos tanto con la sonda 27A (Figura 1) como con la sonda Ca3 (Figura 2) permitió distinguir un patrón idéntico para la cepa del paciente 2 (P2), las cepas del paciente 4 (P4) y las cepas del paciente 8 (P8). Además se pudo determinar otra cepa del paciente 6 (P6) con un perfil de bandas igual al encontrado en dos aislamientos provenientes de dos de los integrantes del personal asociado a la UTI (E1 y E3).

Como puede observarse en el estudio de estas cepas, el agregado de otra sonda específica no aumentó el poder de discriminación entre estos aislamientos (Figuras 1 y 2).

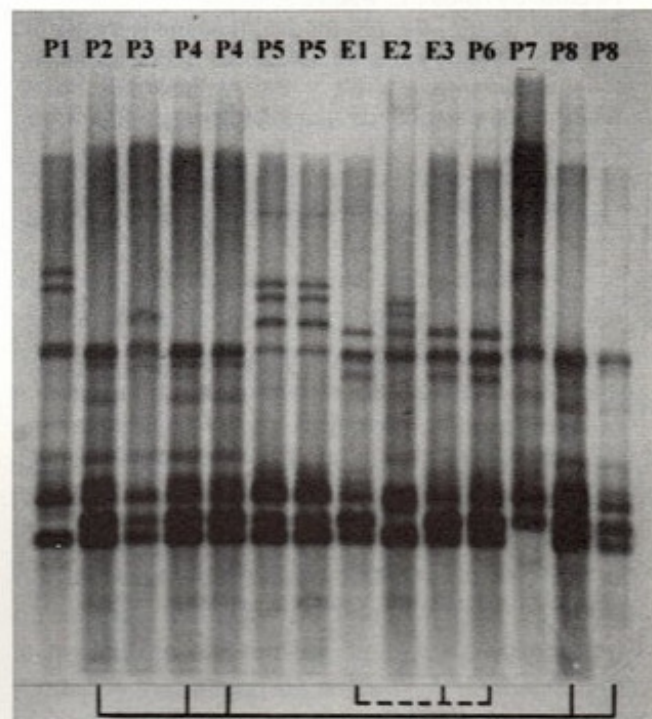


Figura 1. Southern blot de aislamientos de *C. albicans* hibridados con sonda 27A. Sala de neonatología del Hospital de niños PE. PM: Peso molecular lambda Eco R1 Hind III. (P1, P2, P3, P6 y P7): Aislamientos de *C. albicans* de cada paciente, P4, P5 y P8: dos aislamientos de paciente. E1, E2 y E3: Aislamientos de *C. albicans* del personal de neonatología.

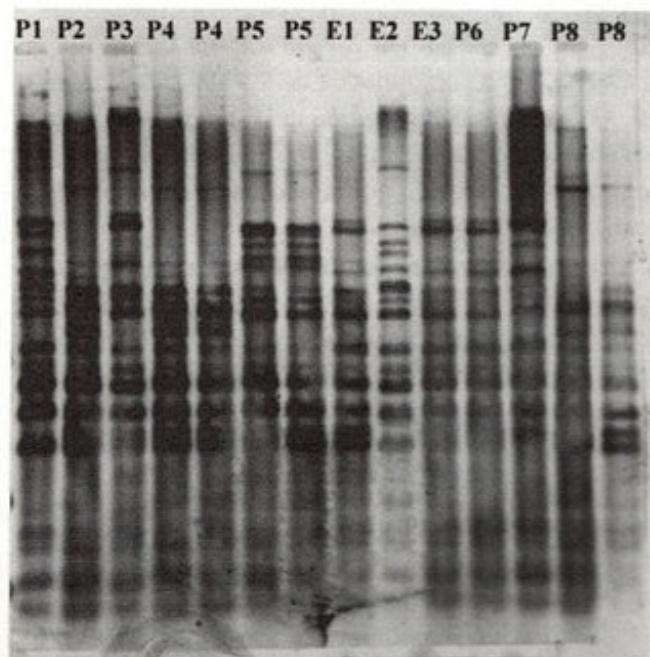


Figura 2. Southern blot de aislamientos de *C. albicans* hibridizados con sonda Ca3. Sala de neonatología del Hospital de niños PE. PM: Peso molecular lambda *Eco* R1 *Hind* III. (P1, P2, P3, P6 y P7): Aislamientos de *C. albicans* de cada paciente, P4, P5 y P8: dos aislamientos de paciente. E1, E2 y E3: Aislamientos de *C. albicans* del personal de neonatología.

Los aislamientos de *C. albicans* obtenidos en las salas de neonatología del Hospital SML, fueron agrupados según perteneciera a la sala 11 o a la 12 y caracterizados genéticamente mediante la hibridación con la sonda 27A. En la sala 11 de este hospital, se detectó que las cepas aisladas de 4 pacientes (2, 8, 9, 12) compartían un mismo perfil de bandas, como se muestra en la Figura 3. Por otra parte, es importante destacar la persistencia de esta cepa en esta sala durante un período de 10 meses, ya que fue aislada en el paciente 9 el 11/11/96, en el paciente 2 el 1/4/97, en el paciente 8 el 31/7/97 y finalmente en el paciente 12 el 15/9/97.

En la sala 12 (Figura 4), la transmisión se observó en tres oportunidades, en cada una de ellas estaban involucrados 2 pacientes infectados con la misma cepa: (P1-P2) y (P4-P13) y otros 2 pacientes, en los cuales las cepas no resultaron idénticas pero fueron consideradas muy relacio-

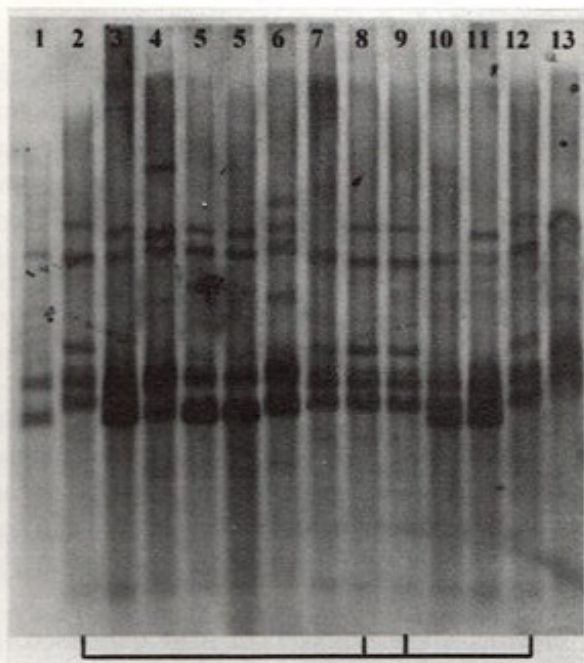


Figura 3. Southern blot de aislamientos de *C. albicans* hibridizados con sonda 27A. Sala 11 de neonatología del Hospital de niños SML. PM: Peso molecular lambda *Eco* R1 *Hind* III. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13: Aislamientos de *C. albicans* de cada paciente, 5: paciente 5, con dos aislamientos.

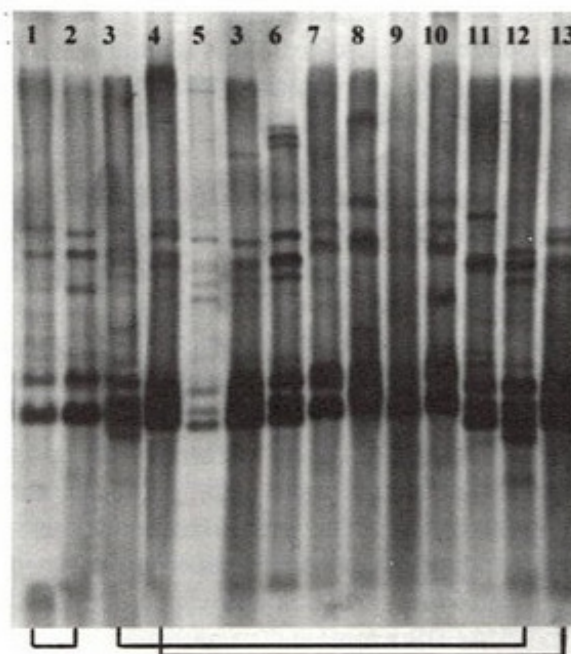


Figura 4. Southern blot de aislamientos de *C. albicans* hibridizados con sonda 27A. Sala 12 de neonatología del Hospital de niños SML. PM: Peso molecular lambda *Eco* R1 *Hind* III. 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13: Aislamientos de *C. albicans* de cada paciente, 3: paciente 3, con dos aislamientos.

nadas (P3-P12). En todos los casos el período de transmisión entre los 2 pacientes nunca fue mayor a un mes.

DISCUSION

Candida spp. es el agente causal de aproximadamente el 8% de todas las infecciones nosocomiales en E.U.A.(15). Al ser un microorganismo comensal, se pueden considerar diversas fuentes de infección. Cada vez existe mayor evidencia de que los microorganismos comensales de los pacientes son la fuente de infección mas frecuente dentro de las micosis nosocomiales (17). Por otra parte el personal involucrado en la atención de estos pacientes y los individuos que los visitan también son transportadores de levaduras, por lo que resulta posible la transmisión entre estas personas y los pacientes (20). En el caso de los neonatos que desarrollan una infección nosocomial en una unidad de terapia intensiva neonatal (UTIN), la colonización de *Candida* spp puede provenir de la madre (vertical) o del ambiente hospitalario (horizontal).

Diversos estudios moleculares han demostrado que una sola cepa de *Candida* spp. fue la responsable de un número de brotes intrahospitalarios (12, 24). En algunos casos las cepas aisladas de las manos del personal fueron genéticamente idénticas o similares a las aisladas de pacientes (5, 6).

En este estudio, el análisis genético de los aislamientos de *C. albicans* realizado en uno de los hospitales no sólo determinó la transmisión entre 3 de los 8 pacientes con candidemias a *C. albicans*, sino que además permitió detectar la infección cruzada, a través del contacto de las manos del personal. Consideramos importante que frente a la aparición inusual de un grupo de pacientes de una UTI infectados con la misma especie de *Candida*, se tomen las medidas de control apropiadas y conjuntamente se realicen los estudios moleculares capaces de confirmar la posibilidad de un brote y se detecte la vía de transmisión.

El análisis genético realizado sobre las cepas aisladas de los pacientes del otro hospital, permitió no sólo confirmar la transmisión de *C. albicans* entre pacientes de las dos UTIN, sino detectar la persistencia de una cepa durante un período de 10

meses. A pesar de que en este caso no se pudo efectuar el muestreo de las manos del personal, ni en el ambiente, se podría pensar que la fuente de infección fue exógena ya que 4 pacientes estaban infectados con la misma cepa .

Cada vez que se sospecha una posible fuente de infección exógena, lo aconsejable es que las cepas aisladas sean analizadas genéticamente a fin de determinar si todas tienen un origen en común (25). Actualmente existen diversos métodos para la tipificación molecular los que permiten realizar estudios epidemiológicos sobre la infección fúngica. En este estudio la utilización conjunta de las sondas 27A y Ca3 no mejoró la resolución obtenida con cada una de ellas por separado. Por otra parte, ambas presentan un poder de discriminación similar y suficiente para llevar a cabo este tipo de estudios (7, 11).

A pesar que en la mayoría de los neonatos las fungemias tienen su origen en una colonización endógena (2, 19), estos estudios son importantes ya que permiten confirmar existencia de otra vía de transmisión, y de esta forma mejorar las medidas de control intrahospitalario.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue en parte realizado mediante un subsidio de la Fundación Roemmers Argentina.

REFERENCIAS

1. Akova M, Akalin H E, Uzun O, Hayran M, Tekuzman G, Kansu E, Aslan S, Telatar H (1994) Efficacy of fluconazole in the treatment of upper gastrointestinal candidiasis in neutropenic patients with cancer: factors influencing the outcome. *Clin. Infect. Dis.* 18: 294-304.
2. Baley J E, Kliegman R M, Fanaroff A A (1984) Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: clinical manifestations and epidemiology. *Pediatrics* 73: 144-52.
3. Bart-Delabesse E, Van Deventer E H, Goessens W, Poirot J L, Lioret N, van Belkum A, Dromer F (1995) Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3278-3283.
4. Branchini M L, Geiger D C, Fischman O, Pignatari A C (1995) Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. *Rev. Instit. Med. Trop. Sao Paulo* 37: 438-487.
5. Burnie J P (1986) *Candida* and hands. *J. Hosp. Infect.* 8: 1-4.

6. Burnie JP, Matthews R, Lee W, Philpott-Howard J, Brown R, Damani N, Breuer N J, Honeywell K, Jordans Z (1987) Four outbreaks of nosocomial systemic candidiasis. *Epidemiol. Infect.* 99: 201-211.
7. Diaz-Guerra T M, Martinez-Suarez J V, Laguna F, Rodriguez Tudela J L (1997) Comparison of four molecular typing for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 856-861.
8. Feo M (1974) Estudio de las condiciones de formación de las clamidosporas. *Rev Lat-amer. Microbiol.* 16: 105-110.
9. Hernández-Sampelayo T, Navarro Gomez M L, HernándezMolina J M, Gomez Campderá J A (1997) Importancia de las infecciones fúngicas en pediatría. *Revista Clínica Española* 197: 60-66.
10. Khatib R, Thirumoorthi M C, Riederer K M, Sturm L, Oney LA, Baran J Jr (1998) Clustering of *Candida* infections in the neonatal intensive care unit concurrent emergence of multiple stains simulating intermitent outbreaks. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17: 130-134.
11. Marco F, Lockhart S, Pfaller MA, Pujol C, Rangel-Fausto MS, Wiblin T, Blumberg H M, Edwards JE, Jarvis W, Saiman L *et al* (1999) Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2817-2828.
12. Moro M L, Maffei C, Manso G, Morace, Polonelli L, Biavasco F (1990) Nosocomial outbreak of systemic candidiasis associated with parenteral nutrition. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 11: 27-35.
13. Nguyen MH, Peacock JE, Tanner DC, Morris AJ, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Yu VL (1995) Therapeutic approaches in patients with candidemia. *Arch. Intern. Med.* 155: 2429-2435.
14. Pfaller M, Cabezudo L, Koontz M, Bale M, Gingrich R (1987) Predictive value of surveillance cultures for systemic infection due to *Candida* species. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 628-633.
15. Pfaller M A, Jones R N, Doren G V, Sader H S, Hollis R J, Messer SA, for the SENTRY participant group (1998) International surveillance of bloodstream infection due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1886-1889.
16. Pfaller M A (1995) Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1535-1539.
17. Reagan D R., Pfaller M A, Hollis R J, Wenzel R P (1990) Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemias using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2733-2738.
18. Robert F, Lebreton F, Bougnoux M E, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J (1995) Use of random amplified polymorphic ADN as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2366-2371.
19. Rowen J L, Rench M A, Kozinatz C A, Adams J M, Baker C J (1994). Endotracheal colonization with *Candida* enhances risk of systemic candidiasis in very low birth weight neonates. *J. Pediatr.* 124: 789-794.
20. Ruiz-Diez B, Martinez V, Alvarez M, Rodriguez Tudela J L, Martinez Suarez. J V (1997) Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 856-861.
21. Sadhu C, Mc Eachern M J, Rastchenko-Bulgac E P, Schmid J, Soll D R, Hicks J B (1991) Teleomeric and dispersed repeat sequences in *Candida* yeasts and their use in strain identification. *J. Bacteriol.* 173: 842-850.
22. Scherer S, Stevens D A (1988) A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1452-1456.
23. Schmid J, Voss E, Soll D R (1990) Computer-assisted methods for assessing *Candida albicans* strain relatedness by Southern blot hybridization with repetitive sequence Ca3. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1236-1243.
24. Sherer R.J, Gledhill K S, Hampton K D, Pfaller M A, Givner L B, Abramson J S, Dillard R G (1992) Outbreak of *Candida* blood stream infections associated with retrograde medication administration in a neonatal intensive care unit. *J. Pediatr.* 120: 455-461.
25. Yhu-Chering H, Tzou-Yein L, Hwei-Ling P, June-Hsieh W, Hwan-You C, Hsieh-Shong L (1998) Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Scand. J. Infect. Dis.* 30: 137-142.