



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**UMAE HOSPITAL DE PEDIATRIA CENTRO MEDICO NACIONAL
SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**GENOTIPIFICACION Y SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *CANDIDA*
AISLADAS EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS
NEONATALES.**

TESIS

**PARA OBTENER DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN:
INFECTOLOGÍA**

P R E S E N T A

DR.CARLOS EDUARDO AGUIRRE MORALES

TUTOR: DRA MARIA GUADALUPE MIRANDA NOVALES



MEXICO D.F.

JULIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Concepto	Página
Resumen	2
Introducción	3
Justificación	7
Objetivos	8
Material y Métodos	9
Resultados	18
Discusión	27
Conclusiones	33
Referencias	34

RESUMEN

Introducción: Las infecciones por *Candida* se han incrementado en las últimas décadas, principalmente por especies no-*albicans*. La colonización es una condición previa al desarrollo de infección.

Objetivos: Establecer la frecuencia de colonización por especies de *Candida* en pacientes que ingresan a la unidad de cuidados intensivos neonatales, manos del personal de salud y dispositivos médicos, el perfil de susceptibilidad a antimicóticos, y la relación genotípica por medio de electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE).

Métodos. Estudio de cohorte. Se tomaron cultivos de pliegues de cuello, axilas, ingles, boca y ano a los pacientes a su ingreso a UCIN, y cada 7 días mientras permanecieran hospitalizados, al mismo tiempo se tomaron cultivos de barandales de cunas térmicas, estetoscopios, termómetros y cintas métricas. De las manos del personal de salud en dos ocasiones durante el estudio. A las cepas identificadas como *Candida* se les realizó susceptibilidad a antimicóticos mediante el método de microdilución seriada en caldo. Para la relación genotípica se tipificaron por el método de PFGE, las cepas de la misma especie y cariotipo se sometieron a análisis de restricción.

Resultados: Se incluyeron 98 pacientes en 8 meses, se documentó colonización por especies de *Candida* en 39, 24 estaban colonizados al momento del ingreso, 15 durante su estancia. Los sitios de mayor colonización fueron recto 58.9% y axilas 51.3%. En cuanto a los aislamientos, *Candida parapsilosis* n=25 (64%) fue la especie más comúnmente aislada, seguida por *Candida albicans* en 11 (28.2%), *Candida lusitanae* en 4 (10.2%) y otras en 2 (5.1%). Ningún paciente desarrollo infección micótica sistémica. Se determinó la susceptibilidad en 124 cepas, en su mayoría *C. parapsilosis*, se encontró resistencia a itraconazol en el 8% de las 73 cepas de *C. parapsilosis* y en el 26% de las 32 cepas de *C. albicans*, en total se documentó que 13% de cepas fueron resistente a Itraconazol, no hubo resistencia para el resto de antifúngicos. Para la Genotipificación de las 19 cepas de *C. albicans* se encontraron dos patrones, uno predominante (A) que incluyó once cepas con cariotipo idéntico : 9 de pacientes colonizados, una de manos y una cinta métrica. Las restantes ocho cepas tuvieron cariotipos distintos. En cuanto a *C. parapsilosis* se encontró una identidad genotípica en 48 cepas (81%), de las cuales 44% correspondieron a cepas tomadas del personal de salud, 43% de los pacientes y los ambientes el 13% mientras que 11 cepas (19%) no mostraron relación clonal entre ellas.

Conclusión. Cerca del 40% de los pacientes que permanecen en UCIN por más de 21 días se colonizan. Predomina una clona de *Candida parapsilosis* en pacientes y manos del personal, lo cual se puede corroborar en el estudio genotipificación. Ningún paciente presentó infección invasiva.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por levaduras del género *Candida* han incrementado en las últimas décadas. Entre los grupos más afectados se encuentran los recién nacidos prematuros que permanecen hospitalizados por tiempo prolongado en las unidades de cuidado intensivo neonatal (UCIN). La frecuencia registrada de infecciones micóticas invasivas en recién nacidos de muy bajo peso es de 1.6–9% y de 10-16% en los que tienen peso extremadamente bajo, con una letalidad de 30–75%, a pesar de un tratamiento adecuado, pero mayor al 80% cuando el diagnóstico no se realiza oportunamente.¹⁻² En las últimas 2 décadas destaca la transición de especies de *Candida* como causantes de infecciones invasivas. Hasta la década de los 80's *Candida albicans* predominaba en cerca del 60% casos. Sin embargo, a partir de la década de los 90' aparecen los reportes que señalan un cambio a favor de las especies diferentes a *C. albicans*.³⁻⁵ En un estudio de un hospital pediátrico de tercer nivel en la Ciudad de México, se registró que durante 1998, el 66% de las especies aisladas en pacientes con candidemia correspondían a *Candida albicans*, y para 2003, la frecuencia era similar para especies no-*albicans* y *albicans* (51% vs 49%).⁶ Este cambio se ha atribuido principalmente al uso cada vez más frecuente de terapia empírica y la utilización de profilaxis antimicótica en pacientes de riesgo.⁷⁻⁹

Además de los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de enfermedad micótica, en recién nacidos, la colonización se ha destacado como uno de los eventos más importantes y una condición previa necesaria para el desarrollo de infección. Farmaki y cols. encontraron que el riesgo para presentar candidemia en neonatos colonizados fue de 4.4 veces más en comparación con los no colonizados, y esta diferencia resultó estadísticamente significativa (IC95% 2.59-9.06, $p=0.002$).⁹

El neonato se coloniza desde su nacimiento con la microbiota vaginal; se ha documentado que hasta en 40% de los recién nacidos tienen una cepa genéticamente idéntica a la de su madre (en el

caso de *Candida albicans*),¹⁰⁻¹¹ y posteriormente adquiere cepas diferentes en las salas de hospitalización, donde intervienen múltiples factores. En general, los sitios de mayor colonización son tubo digestivo y piel, principalmente axilas, ingle, y cicatriz umbilical. A pesar de la elevada frecuencia de colonización (70%), algunos autores no han podido demostrar la presencia de levaduras en el personal de salud.¹²

En un estudio retrospectivo en el Instituto Nacional de Perinatología en el periodo del 2002 al 2006, se analizaron las infecciones micóticas invasivas en neonatos, encontrando predominio de *Candida albicans* en un 40%, seguida de *Candida parapsilosis* en 22%; en conjunto las especies no-*albicans* fueron responsables del 60% de las infecciones.¹³ En el reporte SENTRY 2003, se incluyeron 336 cepas de varios países de América Latina, de las cuales 36.5% correspondieron a *C. albicans*, seguido de *C. parapsilopsis* (26.4%).¹⁴ En Monterrey, de 398 cepas de cinco hospitales, el 68% correspondió a especies no-*albicans*.¹⁵

En forma habitual, se ha considerado que un aislamiento de la misma especie y con el mismo perfil de susceptibilidad antimicrobiana puede tener el mismo origen, siempre y cuando exista una relación epidemiológica de temporalidad entre los aislamientos (área física, tipo de cultivo, métodos de aislamiento, duración de estancia hospitalaria, fecha de toma de cultivo). Gracias al desarrollo de los métodos de biología molecular, en los últimos años ha sido posible establecer la relación clonal (origen) de diferentes microorganismos, incluidos bacterias, parásitos y hongos.

Candida puede tipificarse mediante diferentes métodos moleculares, la Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) tipifica su cariotipo y así es posible determinar si los diferentes aislamientos en un paciente tienen un mismo origen. El hecho de permitir un análisis del cariotipo lo hace ser mejor que otros métodos para comparación, como RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism) el cual tiene un principio similar, pero utiliza enzimas

de restricción de cortes frecuentes que originan fragmentos más pequeños que los obtenidos por PFGE, por lo que su capacidad discriminatoria entre diversas cepas es menor^{16,17}. Estas dos técnicas fueron comparadas para el análisis de *Candida rugosa* por Dib y cols¹⁸, que encontraron una mayor discriminación por la técnica de PFGE, con mejor desempeño que RFLP.

Las variaciones del cariotipo realizado mediante PFGE, ha tenido buen resultado para discriminar especies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, por lo que al momento, es uno de los principales métodos que se sugieren deben utilizarse para la tipificación de especies del género *Candida*¹⁹. El poder de discriminación de este método mejora si se utilizan enzimas de restricción que cortan en forma infrecuente el genoma de las levaduras; sin embargo, tiene la desventaja de ser una técnica laboriosa que requiere entre 5 y 7 días para obtener resultados. Otros métodos como el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar por (RAPD, Randomly-Amplified Polymorphic DNA) y el PCR-*fingerprinting* también han sido utilizados para estudiar la relación clonal en aislados clínicos y más recientemente la tipificación por secuencias de múltiples *loci* o por análisis de microsatélites polimórficos²⁰.

Inicialmente los estudios que emplearon el método de PFGE para la tipificación de levaduras fueron de brotes intrahospitalarios. Posteriormente se extendió su uso a situaciones endémicas, como el trabajo de Chen y cols., que demostraron la presencia de la misma clona independientemente del sitio anatómico de colonización, y establecieron el momento en que hubo la selección de una clona resistente de *C.tropicalis*²¹ la homología de las cepas aisladas de diferente sitio anatómico en un paciente ya había sido reportada por Huang en recién nacidos de muy bajo peso en una UCIN²².

En otro estudio en Túnez, Ben Abdeljelil J., y cols compararon aislamientos de *Candida albicans* de neonatos con candidemia con los aislamientos de los trabajadores de la salud (manos), mediante

PFGE. En los 38 aislamientos que probaron se encontraron 3 tipos, que designaron I, II y III. El tipo I fue el más frecuente, y se encontró en 17 pacientes y un aislamiento de manos, con lo cual concluyen que existió una transmisión horizontal efectiva entre estos pacientes y un miembro del equipo de salud ²³. De igual forma, Lupetti y cols demostraron que existió transmisión horizontal entre personal de salud y un paciente con candidemia por *C.parapsilosis* ²⁴. En la UCIN del Hospital de Pediatría, CMN SXXI las infecciones sistémicas por *Candida* no se encuentran en las primeras causas de infección nosocomial. El número de casos registrados disminuyó a partir de 2003, sin embargo, se ha documentado una elevada colonización por *C.parapsilosis* tanto en pacientes como en manos del personal.

Se destaca el alto porcentaje de colonización encontrada en las manos del personal, factor fundamental en la transmisión horizontal y susceptible de modificarse con medidas estrictas y concientización en la importancia del lavado de manos antes y después del contacto con los pacientes. Es necesario conocer la distribución por especies más frecuentes que colonizan a los pacientes y si se recuperan del ambiente hospitalario y del personal de salud, así como establecer cuál es el perfil de susceptibilidad de estas cepas y determinar por medio de biología molecular la relación entre las cepas obtenidas de las manos, ambiente y las recuperadas en los pacientes .

JUSTIFICACIÓN

Más de la mitad de los pacientes que son referidos a la UCIN del Hospital de Pediatría tienen estancias hospitalarias superiores a 7 días. Ya que la colonización es la condición previa para la infección de mayor peso en estas unidades, y que se ha demostrado que la transmisión horizontal también influye en la diseminación de las especies de *Candida no-albicans* es necesario conocer la distribución por especies más frecuentes que colonizan a los pacientes y si se recuperan del ambiente hospitalario y del personal de salud , posterior a ello establecer la relación genotípica de estos aislamientos se podrá confirmar si existe transmisión cruzada en la UCIN.

OBJETIVO PRINCIPAL

1. Establecer la colonización por especies de *Candida* en pacientes, personal y dispositivos médicos en una unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar la susceptibilidad de los aislamientos a los antifúngicos.
2. Comparar el genotipo de las cepas de *Candida spp* (*albicans* y *parapsilosis*) obtenidas de las manos del personal de salud y equipo médico con el genotipo de las recuperadas de sitios de colonización de los pacientes, mediante electroforesis en gel por campos pulsados y análisis de restricción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio de realización.

Unidad de Cuidados Intensivos neonatales, Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria y Laboratorio Clínico del Hospital de Pediatría CMN S XXI IMSS.

Diseño.

Estudio descriptivo, longitudinal, comparativo.

Universo de trabajo:

Recién nacidos que ingresaron a la UCIN, personal de salud ubicado en el área de UCIN y dispositivos médicos que se encuentran en contacto frecuente con los pacientes (estetoscopios, termómetros, cintas métricas y barandales de cunas térmicas). Cepas de *Candida* obtenidas de pacientes hospitalizados y cultivos de manos del personal de salud y equipo médico en la UCIN obtenidas del julio 2008 a febrero 2009.

Criterios de inclusión:

- Pacientes que ingresen a la UCIN.
- Personal de salud (enfermeras, médicos de base, médicos residentes, y personal de laboratorio, radiología e inhaloterapia que se encontraron en la unidad al momento de la toma de muestras y que tuvieran contacto con los pacientes).
- Se incluyeron cepas de *C. parapsilosis* y *C. albicans* colectadas de las manos del personal de salud y de los pacientes de UCIN.

Criterios de exclusión:

- Pacientes en los cuáles los padres o tutores negaron su consentimiento para participar en el estudio.
- Personal de salud que no dio su consentimiento para la toma de muestras (cultivo de manos).

Criterios de eliminación:

- Cuando no se pueda obtener el genotipo por PFGE.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición operativa	Clasificación
Edad gestacional	Tiempo transcurrido desde la concepción hasta el nacimiento	Cuantitativa continua Unidad de medición: semanas
Vía de nacimiento	Vía mediante la cual se obtiene el producto de la concepción.	Nominal dicotómica Categoría: vaginal/ abdominal
Estancia hospitalaria	Tiempo transcurrido desde el ingreso del paciente hasta el momento actual.	Cuantitativa discreta Unidad de medición: Días
Uso previo de antimicrobianos de amplio espectro	Administración de antimicrobianos de uso sistémico, con espectro que incluye gram-negativos y gram positivos	Nominal dicotómica Categoría: si/ no.
Uso previo de antimicótico	Administración de antimicrobiano con espectro contra levaduras, local o sistémico	Cualitativa nominal. Categorías: nistatina, miconazol, fluconazol, anfotericina B.
Personal de salud	Trabajador que se encuentre realizando sus actividades dentro el área de UCIN, asignado por un periodo mínimo de un mes.	Cualitativa nominal. Categorías: enfermeras, médicos, personal técnico (laboratorio, rayos X e inhaloterapia), personal de servicios básicos.
Ambiente hospitalario	Superficie inanimada de objetos que se encuentran en el área de UCIN, y que utiliza el personal de salud.	Cualitativa nominal. Categorías: mesas pasteur, mesa de preparación de medicamentos, escritorios, lavabos, tarjas.
Dispositivos médicos no críticos	Objetos utilizados en la atención y monitoreo de los pacientes en UCIN que tienen contacto con piel indemne.	Cualitativa nominal. Categorías: termómetros, estetoscopios, parches, brazaletes, bandejas, barandales de la cuna,
Colonización por especies de <i>Candida albicans</i>	Aislamiento mediante cultivo de <i>Candida albicans</i> obtenida de un sitio habitualmente no estéril, y que no se encuentra causando enfermedad en el neonato.	Nominal dicotómica Categorías: Colonizado, no colonizado.
<i>Candida no- albicans</i>	Levadura del género <i>Candida</i> que se diferencia de <i>albicans</i> por su incapacidad para formar tubo germinativo cuando se incuba en medio líquido (suero).	Cualitativa nominal. Categorías: <i>C. tropicalis</i>, <i>C. parapsilopsis</i>, <i>C. krusei</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. guilliermondii</i>, <i>C. famata</i>, <i>C. rugosa</i>, <i>C. lusitaniae</i>,
Colonización por especies de <i>Candida no-albicans</i>	Aislamiento mediante cultivo de <i>Candida no-albicans</i> obtenida de un sitio habitualmente no estéril, y que no se encuentra causando enfermedad en el neonato.	Nominal dicotómica Categorías: Colonizado, no colonizado.

Colonización del personal de salud por especies de <i>Candida no-albicans</i>	Aislamiento mediante cultivo de una levadura que se identifique como <i>Candida no-albicans</i> obtenida de cultivo de manos	Nominal dicotómica Categorías: colonizado/no colonizado
Colonización del ambiente hospitalario por especies de <i>Candida no-albicans</i>	Aislamiento mediante cultivo de una levadura que se identifique como <i>Candida no-albicans</i> obtenida de dispositivos médicos no críticos, y del ambiente hospitalario (mobiliario).	Nominal dicotómica Categorías: Colonizado/ No colonizado.
Susceptibilidad a antimicóticos	Concentración mínima inhibitoria a itraconazol, fluconazol, anfotericina B, y voriconazol.	Cualitativa nominal. Categorías: susceptible, (susceptible-dependiente de dosis), intermedio y resistente.
Genotipo	Constitución genética de un organismo en relación a un rasgo hereditario específico o a un conjunto de ellos	Nominal dicotómica Categorías idéntica o diferente
Identidad/Distancia genética	Cualidades que identifican a una persona u organismo, similitud. Divergencia genética entre poblaciones dentro de una especie. Distancias genéticas más pequeñas indican una relación genética.	Nominal dicotómica Categorías: <i>Idéntica: de un mismo origen, aquellas cepas con un número y tamaño igual de cromosomas.</i> <i>No relacionado: más de una banda (cromosoma) diferente.</i>

Muestreo:

Por ser un estudio descriptivo, no se realizó cálculo de tamaño de muestra. La principal finalidad fue obtener al menos 50 cepas de *Candida spp.* de los pacientes, tomando en cuenta el número de pacientes que ingresan por mes (30) y un porcentaje mínimo de colonización de un 40%. De acuerdo a resultados de estudios previos, se esperaba coleccionar al menos 30 cepas del personal de salud y dispositivos médicos clase I (termómetros, estetoscopios, cintas métricas y barandales de cunas térmicas).

Se emplearon para la comparación entre ellas, 78 cepas coleccionadas de los pacientes, manos de personas y ambiente divididos en 59 cepas de *C. parapsilosis* y 19 de *C. albicans*.

Descripción del estudio

Toma de muestra de pacientes.

A su ingreso al estudio, se solicitó el consentimiento verbal de los padres o tutores, al ser afirmativo se le tomaron al paciente cultivos de piel (pliegues de cuello, ingles y axilas) cultivo de mucosa oral y recto mediante un hisopo húmedo estéril el cual se inoculó en un tubo que contenía 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) suplementado con vancomicina (5 mg/dl) y gentamicina (5mg/dl). En el laboratorio se agitó por 5 segundos (Vortex) y posteriormente se retiró el hisopo. El tubo se incubó a 37 Cº por 10 días y se revisó cada 24 h en busca de turbidez. Los cultivos se repitieron cada semana mientras el paciente permaneció internado en la sala o hasta que se documentó colonización de al menos un sitio. Si el paciente tenía un cultivo positivo desde la primera toma se consideró colonizado y no se tomaron los subsiguientes cultivos. Todos los pacientes fueron evaluados diariamente hasta su egreso.

Toma de muestra de los dispositivos

Se tomaron cultivos de los barandales de la cuna térmica y de los dispositivos médicos clase I (barandales de cunas térmicas, termómetro, estetoscopio y cinta métrica) al momento del ingreso del paciente y cada 7 días mientras permaneció internado en la unidad o se documentó colonización en al menos un sitio. Al igual que los cultivos de los pacientes El hisopo se introdujo dentro del tubo con BHI suplementado con antibiótico y se transportó al laboratorio donde se agitó por 5 segundos (Vortex) y posteriormente se retiró el hisopo. El tubo se incubó por 10 días a 37 Cº y se revisó cada 24 h en busca de turbidez.

Toma de muestra de las manos del personal de salud.

Los cultivos se tomaron mediante técnica de bolsa la cuál consistió en una bolsa de plástico estéril que contenía 20 mL de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) suplementado con vancomicina 5mg/dl y gentamicina 5mg/dl en la cual la persona introdujo y agitó su mano dominante por un periodo de 15 segundos. Este caldo fue posteriormente vertido en un tubo estéril e incubado por 10 días a 37°C y revisado cada 24 h en busca de turbidez. Los cultivos se realizaron en varias ocasiones y al azar incluyendo al personal de los 3 turnos.

Todas las muestras tomadas se procesaron en los siguientes 30 minutos. En caso de que el tubo se observara turbio se inoculó una cantidad de 125 µl en placas de gelosa sabouraud dextrosa con antimicrobiano (vancomicina 5mg/Dl y gentamicina 5mg/dL). Si no hubo turbidez, o sospecha de crecimiento, se sembró a los 7 días de incubación, si no había desarrollo en la placa de gelosa, el tubo se descartó a los 10 días. A todas las colonias que se observaron en las placas se les hizo tinción de gram y las que correspondieron a levaduras, se les realizó prueba fisiológica de formación de tubo germinativo. Las que fueron negativas, se identificaron mediante patrón de utilización de carbohidratos ID 32C de BioMerioux (Marcy l'Etoile, France). Todas las cepas se conservaron en BHI y glicerol al 20% a -20°C para realizar posteriormente los ensayos de susceptibilidad a antimicóticos. Se anotaron todos los datos demográficos al ingreso de los pacientes así como su evolución, procedimientos y resultados de los cultivos realizados en la hoja de recolección correspondiente para su análisis posterior.

Pruebas de sensibilidad a antifúngicos.

Se prepararon diluciones seriadas por duplicado de cada agente antifúngico tal como se indica en el documento M27-A2 del Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico por su siglas en inglés (CLSI, antes NCCLS)¹⁵. Las diluciones finales se hicieron en un medio con 3 antibióticos (Difco,

Detroit, MI) para la anfotericina B AMB y el medio RPMI 1640 con L-glutamina y con un buffer de 165 mM de ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS; Hardy Diagnostics) para fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC) y caspofungina (CAS) . Las concentraciones finales de los antifúngicos variaron desde 0,03 hasta 64 µg/ml de FLC y CAS . De 0,015 a 8 µg/ml para la AMB, ITC y VCR. Los inóculos de levaduras se prepararon espectrofotométricamente y se diluyeron adicionalmente con el fin de obtener concentraciones que van desde $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC / ml.

Los tubos se incubaron a 35 ° C y se leyeron después de 24 h para CAS y después de 48 h para el resto de los agentes antifúngicos. La concentración mínima inhibitoria (MIC) para AMB se considera a la concentración probada de fármaco más baja capaz de prevenir cualquier crecimiento visible. El punto final de la MIC para los azoles se definió como la concentración de fármaco más baja probada obteniéndose una reducción del crecimiento del 80% en comparación con el crecimiento del control libre de fármaco ¹⁵. El punto final de MIC para el CAS se midió como la concentración más baja de fármaco que produjo una disminución significativa (50%) en el crecimiento en comparación con el control libre de fármaco ¹⁵. *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 fueron los organismos de control en todos los experimentos. Los puntos de corte de MIC para FLC e ITC fueron las sugeridas por el documento M27-A2 del CLSI ¹⁵. Los aislamientos con MIC de 8 µg/ml de FLC y de 0,125 µg/ml de ITC se consideraron susceptibles. Los aislamientos con MIC de 16 a 32 µg/ml de FLC y de 0,25 a 0,5 µg/ml de ITC fueron consideradas como susceptibles dependientes de la dosis. Una MIC de 64 µg/ml de FLC y de 1 µg/ml de ITC se consideraron resistentes. Los aislamientos con una MIC de 1 µg/ml de AMB se clasificaron como susceptibles y aquellos con de 2 µg/ml como resistentes ²⁵⁻²⁶. En el caso de VRC, se consideró una susceptibilidad de una manera dependiente de la dosis a 2 µg/ml y resistente en 4 µg/ml. ²⁶⁻²⁷

Procedimiento de PFGE

Para realizar el procedimiento para obtener el cariotipo, de acuerdo al método descrito por Dib y colaboradores¹⁸. En resumen, las cepas se sembraron en cajas con agar dextrosa sabouraud incubándose a 37°C durante 24 h. Se tomó una colonia y se inoculó en 10 ml de caldo dextrosa sabouraud, incubándose a 37°C por 24h, de este crecimiento, 1 mL se colocó en un microtubo de 1.5mL estéril, y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 2 minutos. Se decantó el medio de cultivo, dejando el paquete celular. Se agregaron 500 µl de buffer suspensión celular (50 Mm de EDTA sódico pH 8.0), para lavar, centrifugando nuevamente con las condiciones anteriores.

El botón celular se resuspendió en 150 µl de buffer suspensión celular y se agregaron 6 µl de liticasa (2000U/mL). Se agregaron 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1.6% a 50°C, y se prepararon los bloques de agarosa en moldes (5 x 8 mm).

Cada bloque se depositó en un tubo de 1.5 ml con 500 µl de buffer lisis II más 20 µl de liticasa, y se incubó a 37°C toda la noche. A la mañana siguiente, se eliminó el buffer lisis y se agregó buffer de proteinasa K 500 µl más proteinasa K 20 µl. Se incubó en baño maría con agitación constante a 50°C toda la noche. Los bloques se lavaron en agitación durante 30 minutos con buffer de lavado (TE1X) por seis veces; en este mismo buffer se almacenó a 4°C hasta realizar el corrimiento del gel. La mitad del bloque se depositó en uno de los pozos de un gel de agarosa al 0.8%. El gel se colocó en una cámara de electroforesis de campos pulsados, con buffer TBE 0.5x (0.089 M Tris-0.089 M borato 0.0025 M EDTA diluido en agua destilada). Se utilizó una temperatura constante de 14°C, con pulsos 130 s a 140 V por 20 horas, y 14 horas 300 s a 150 V, y 22 horas con 300 s a 110 V (Sistema Gene Path, Bio-Rad). Al terminar el corrimiento, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV. Se empleó como marcador de tamaño molecular *Sacharomyces cerevisiae*.

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

Todo el ADN de las células como se describió anteriormente se digirió con Sfil y BssHII (Promega) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La condición electroforética que dio la mejor separación era intervalos de pulso de 1 a 38 s a 185 V durante 17 h. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y fotografiados bajo iluminación UV. Las diferencias entre los aislados se determinaron por comparación visual de los patrones de ADN. Se consideran distintos de cariotipo si los patrones difieren por una banda. Se consideran distintos de patrón digestión PFGE si los patrones difieren en más de tres bandas ¹⁸.

Interpretación.

Se consideraron de un mismo origen aquellas cepas de *Candida* spp que mostraron un cariotipo idéntico (número de bandas y posición) .

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva, con medidas de resumen para variables nominales.

Aspectos éticos

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación, este estudio se clasifica como sin riesgo. El protocolo se autorizó por el Comité Local de Investigación en Salud con número de registro R-2007-3603-36 y R-2010-3603-47 .

RESULTADOS

Durante el periodo de estudio de julio de 2008 a febrero del 2009, se incluyeron 102 pacientes de los cuales tres se eliminaron debido a que no fue posible tomar los cultivos a su ingreso, y uno porque los padres no dieron su consentimiento para la toma de cultivos. Se contó en total con resultados de 98 pacientes. La mediana de edad al ingreso fue de 9 días (rango 0 a 63 días), con una estancia hospitalaria de 10 días (rango 1-90 días), la mediana del peso al nacimiento fue de 2250g, con una edad gestacional de 35 semanas (media 33.5) [Cuadro I].

Cuadro I. Características generales de los pacientes

	Total pacientes	Pacientes colonizados	Colonizados durante estancia en UCIN	Pacientes no colonizados
Número (N)	98	39	15	59
Género M/F	54/44	23/16	10/5	31/28
Mediana de peso al nacimiento en g	2250 (700-3970)	1500 (755-3920)	1830 (830-3920)	2465 (700-3970)
Mediana edad gestacional	35 (26-40)	32 (25-40)	33 (27-39)	35 (26-40)
Mediana de días de estancia	10 (0-90)	20 (4-90)	—	9 (0-31)
Mediana de edad al ingreso	9 (0-63)	7 (0-63)	—	4.5 (0-60)
Tipo de Parto Cesárea/vaginal	58/40	25/14	5/10	38/29
Defunciones+	15/98 (15.3%)	8/39 (20.5%)	3/12(25%)	7/59(11.8%)

+No hubo defunciones relacionadas a infecciones fúngicas.

Se documentó colonización por especies de *Candida* en 39 (39.8%) de los 98 pacientes. Del total de pacientes colonizados, 24 (61.5%) tuvieron cultivos positivos al ingreso, y en los 15 restantes (42.8%), durante su internamiento. De estos, 5/15 se colonizaron durante la primera semana, 3/15 en la segunda, 6/15 en la tercera y 1/15 en la cuarta semana de internamiento [Cuadro II].

Cuadro II. Colonización de pacientes con respecto al tiempo y sitio.

	Ingreso	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Cultivo negativo (n)	74	42	19	3	1
Cultivo positivo (n)	24	5	3	6	1
Sitio colonización					
Oral	4	0	0	0	0
Rectal	14	2	2	5	0
Cuello	6	1	0	0	0
Axilas	11	5	1	2	1
Ingles	8	1	0	1	0

El sitio de mayor recuperación de levaduras en general fue el recto, seguido por axilas, ingles, cuello y por último mucosa oral. De los 24 pacientes colonizados a su ingreso el 50% tuvieron solo un sitio anatómico, 25% dos sitios y el 25% más de dos sitios anatómicos. En los 15 pacientes que se colonizaron durante su estancia en la UCIN se documentó en un solo sitio anatómico en 73%, 6.7% dos sitios y 20% más de dos sitios. Ningún paciente desarrollo infección sistémica.

Candida parapsilosis fue la especie más comúnmente aislada correspondiendo a 25 pacientes (64%), seguida por *Candida albicans* en 11 (28.2%), *Candida lusitaniae* 4 (10.2%) y otras en 2 (5.1%).

Colonización de dispositivos médicos.

Se tomaron un total de 738 cultivos de dispositivos médicos. En total se tomaron 182 de los barandales de las cunas térmicas, 182 de cintas métricas, 182 de termómetros, 182 de los estetoscopios asignados a cada paciente, y 10 cultivos adicionales de estetoscopios de los

residentes o médicos adscritos al servicio de la unidad (en diferentes ocasiones y al azar). De los barandales 5 (3.9%) fueron positivos (4 con *Candida parapsilosis*, en dos casos, se recuperó la misma especie de levadura en el paciente [1.5%] y 1 con *Candida famata*). De las cintas métricas 7 (5.4%) fueron positivas, 5 (3.9%) para *Candida parapsilosis*, 1 (0.78%) para *Candida albicans* y 1 (0.78%) para *Candida famata*. En 4 casos de colonización por *Candida parapsilosis* y uno de *Candida albicans* la especie coincidió con la del paciente. Solo un estetoscopio resultó positivo para *Candida parapsilosis* coincidiendo con la especie recuperada del paciente. No se documentó colonización en los estetoscopios de los médicos, ni de los termómetros.

Colonización de las manos del personal.

Se tomaron 89 cultivos de las manos del personal los cuales fueron 23 de residentes, 54 de enfermeras, 11 de médicos adscritos y 1 de personal técnico. Se encontró colonización por *Candida spp* en 49 (55%) de las manos del personal de los cuales correspondieron a 10 (43%) de los residentes, 34 (62%) de las enfermeras, 4 (36%) de los médicos adscritos y uno del personal técnico. La especie más frecuentemente aislada de las manos del personal fue *Candida parapsilosis* en un 62.9%, seguida por *Candida albicans* en 11.1%, *Candida tropicalis* 7.4%, *Candida famata* 7.4%, y *Rhodotorula spp* 3.7%, *Candida guilliermondii* 3.7% y *Candida lusitanae* 3.7%. 2 personas colonizadas por *Candida albicans* también se encontraban colonizadas por *Candida non-albicans*.

Susceptibilidad

Se determinó la susceptibilidad en 124 cepas, en su mayoría *C. parapsilosis*. Solamente se encontró resistencia a itraconazol en el 8% de las 73 cepas de *C. parapsilosis* y en el 26% de las 32 cepas de *C. albicans*, no hubo resistencia para el resto de antifúngicos. Todas las cepas de otras especies también fueron sensibles. [Cuadro III]

Cuadro III. Porcentaje de resistencia a antimicóticos en 124 cepas de las diferentes especies de *Candida*.

Especie	No.	Fluconazol	Itraconazol	Anfotericina B	Voriconazol	Caspofungina
<i>C. parapsilosis</i>	73	0	8	0	0	0
<i>C. albicans</i>	32	0	26	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	6	0	0	0	0	0
Otras *	13	0	0	0	0	0
Total	124	0%	13%	0%	0%	0%

*= *C. lusitanae* (5), *C. famata* (4), *C. rugosa* (2), *C. tropicalis* (1), *C. sake* (1).

ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)

Se analizaron 78 cepas en total de dos especies con mayor número de muestras. En el caso de *C. parapsilosis* se analizaron 59 cepas, de las cuales veinticinco correspondían a manos del personal, veintisiete a sitios de colonización de pacientes y además se incluyeron 7 cepas del ambiente (cuatro de cinta métrica, dos de barandales y un termómetro). Para *C. albicans* se analizaron doce de pacientes, seis de manos y una de cinta métrica. **[Cuadro IV]**

Cuadro IV. Cepas a comparar de *C. parapsilosis* y *C. albicans*

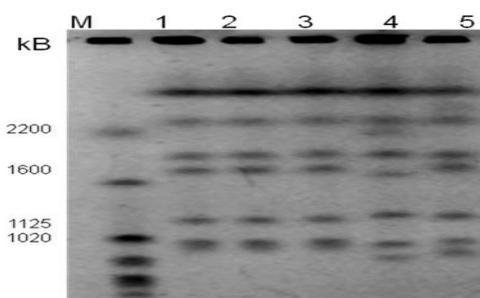
CEPA	MANOS	PACIENTES	AMBIENTE
<i>C. parapsilosis</i>	25	27	7
<i>C. albicans</i>	6	12	1

Para las 19 cepas de *C. albicans* se encontró que hubo tres patrones diferentes. Once cepas tuvieron cariotipo idéntico al que se denominó patrón A, hubo dos cepas con cariotipo también idéntico (patrón B) pero diferente del patrón A, y en seis cepas el cariotipo fue diferente entre ellas y distintas a A y B [Cuadro V, Figura 1]. En global el 58 % de las cepas de los pacientes eran del patrón A, de los cuales cinco ya ingresaron colonizados, uno se colonizó en la primera semana y tres se colonizaron en la tercera semana. Solamente una de las seis cepas de manos del personal tuvo patrón A. El patrón B correspondió a dos cepas de manos. Mientras las del patrón distinto tres correspondían a manos del personal y 3 a sitios de colonización de pacientes, las cuales se distribuyeron 2 al ingreso del paciente y uno a la primera semana.

Cuadro V . Cariotipo de las cepas de *C.albicans* de acuerdo al origen de la muestra.

Patrón	Total	Manos	Pacientes	Ambiente
A	11(58%)	1 (9%)	9(82%)	1(9%)
B	2(10%)	2 (100%)	-----	-----
Distinto	6 (32%)	3(50%)	3(50%)	-----

Figura 1. Cariotipo de cepas de *C. albicans* mediante PFGE



Cariotipo electroforético de *Candida albicans* obtenidas de pacientes que se muestran en el carril 1 a 3 y que corresponden al patrón A. Mientras que en el carril 4 y 5 corresponde al cariotipo denominado patrón B, cepas de manos. Y en el carril M, se encuentra *Sacharomyces cerevisiae* como marcador de tamaño molecular

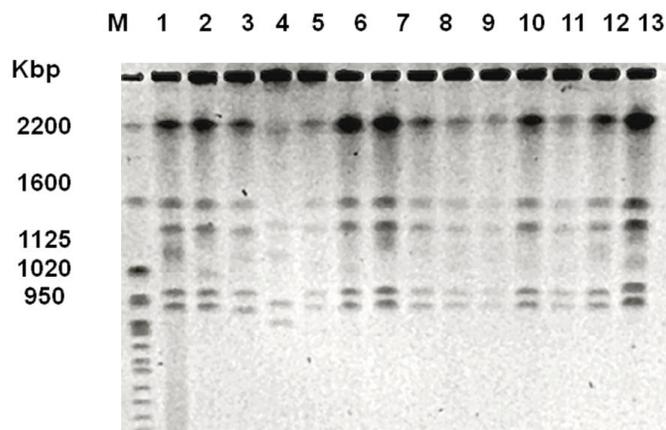
Con respecto a *Candida parapsilosis* se encontró que en 48 casos fue idéntico de acuerdo al patrón de bandas denominado patrón A, en 11 casos se encontró un cariotipo distinto. El 81% tuvo un patrón idéntico [Cuadro VII, Figura 2 y 3]. Las siete cepas aisladas de los dispositivos médicos fueron patrón A. De las manos del personal el 44% tuvo también cariotipo A. De los pacientes con una cepa con cariotipo idéntico, diez ya ingresaron colonizados, seis en la primera semana, cuatro en la segunda semana y uno se colonizaron en la tercera semana.

Cuadro VII .

Cariotipo de las cepas de *C.parapsilosis* de acuerdo al origen de la muestra.

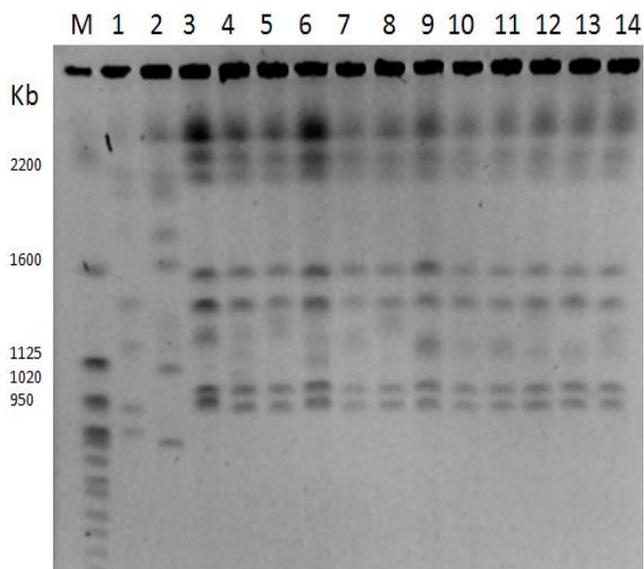
Patrón	Total	Manos	Pacientes	Ambiente
A	48(81%)	20 (44%)	21(43%)	7(13%)
Distinto	11(19%)	5(45%)	6(55%)	-----

Figura 2. Cariotipo de cepas de *C. parapsilosis* mediante PFGE .



Cariotipo electroforético de *Candida parapsilosis* obtenidas de pacientes que se muestran en el carril 1 a 10 y que corresponden al patrón A cepas, exceptuando el carril 4 que corresponde a un patrón distinto. Mientras que en el carril 11 al 13 son cepas obtenidas de cintas métricas y que corresponden al patrón cariotípico A y que son idénticas entre ellas. Y en el carril M, se encuentra *Sacharomyces cerevisiae* como marcador de tamaño molecular

Figura 3. Cariotipo de cepas de *C. parapsilosis* mediante PFGE



Cariotipo electroforético de *Candida parapsilosis* obtenidas de manos. Se muestra en el carril 1,2,6 y 9 un patrón cariotípico distinto entre si y con el resto de los carriles que son idénticos y que corresponden a un patrón cari típico A. Y en el carril M, se encuentra *Sacharomyces cerevisiae* como marcador de tamaño molecular

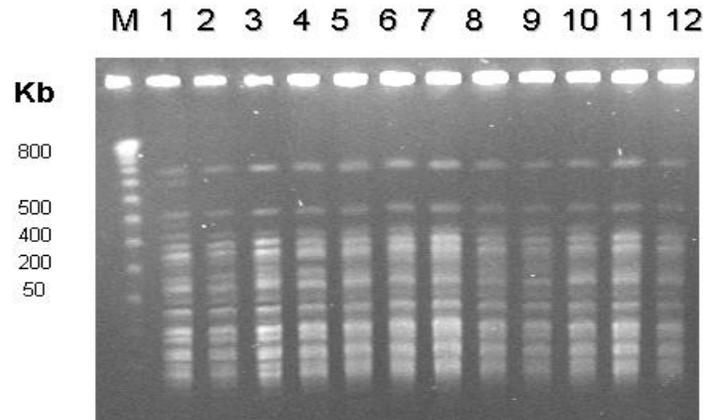
Análisis con enzimas de restricción.

Para las 19 cepas de *C. albicans* se eliminaron las 6 cepas con patrón distinto y se analizaron el patrón A y B encontrándose que hubo dos patrones diferentes (I y II). De las once cepas del patrón A, nueve eran del patrón I y las restantes fueron del patrón II. Mientras que del patrón electroforético B, ambas tuvieron un patrón de restricción idéntico [Cuadro VI, Figura 4].

Cuadro VI . Restricción de las cepas de *C.albicans* de acuerdo al origen de la muestra.

Patrón	Total	Manos	Pacientes	Ambiente
I	11	3	8	--
II	2	--	1	1

Figura 4 . Restricción de *C. albicans* empleando enzimas de restricción Sfil y BssHII



Cariotipo de *C. albicans* empleando enzimas de restricción Sfil y BssHII. Los patrones de RFLP provienen de cultivos de pacientes y manos y que corresponden al patrón I . El patrón distinto se localiza en el carril 1. Se empleo Lambda Ladders como marcador de tamaño molecular.

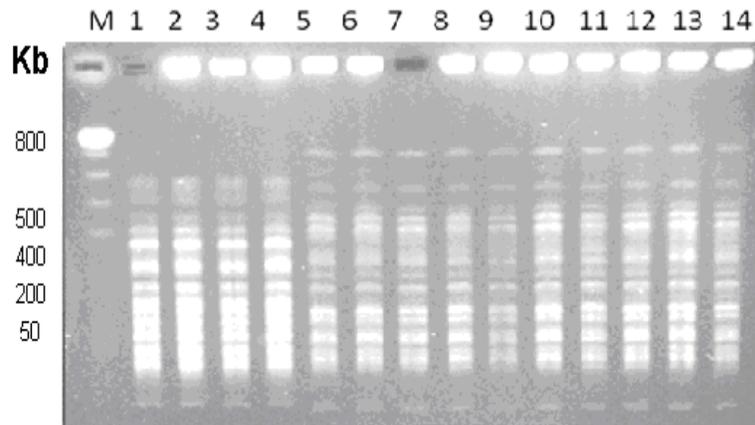
Con respecto a *Candida parapsilosis* se eliminaron las del patrón distinto y se encontró tres patrones de restricción denominado I,II,III, Solo 4 de las cepas con patrón A tuvieron patrones de restricción distinto [Cuadro VIII , Figura 5].

Cuadro VIII.

Restricción de las cepas de *C.parapsilosis* de acuerdo al origen de la muestra.

Patrón	Total	Manos	Pacientes	Ambiente
I	45	20	19	6
II	2	--	2	--
III	1	--	--	1

Figura 5 . Restricción de *C. parapsilosis* empleando enzimas de restricción Sfil y BssHII



Cariotipo de *C. parapsilosis* empleando enzimas de restricción Sfil y BssHII. Los patrones de RFLP provienen de cultivos de pacientes y que corresponden al patrón B los carriles 1-4 . Mientras que los carriles 5-14 corresponden al patrón A. Se empleo Lambda Ladders como marcador de tamaño molecular.

DISCUSIÓN

La candidiasis diseminada es una causa importante de morbimortalidad en los recién nacidos, la colonización es un factor inicial plenamente reconocido en el desarrollo de la enfermedad. Esta colonización puede ser vertical (a través del canal del parto) u horizontal (por medio de los objetos utilizados en la atención del paciente y las manos del personal de salud)^{10,11,28}. En este estudio encontramos que un 24.5% de los pacientes ya estaban colonizados al momento de su ingreso. En mayor proporción son los que se refieren de otras unidades y que contribuyen con el 55% de los colonizados. En lo que respecta a los pacientes que se colonizaron en la UCIN del hospital, durante las primeras semanas se van agregando un número similar (5, 3 y 6 respectivamente), pero el número de estos pacientes que permanecen hospitalizados es sustancialmente menor. Para el final de la cuarta semana se suma un paciente más, que nos da el total de los 15 que se colonizaron durante su estancia. Así el total de pacientes que permanecen hospitalizados más de un mes (cinco a seis semanas) se podría considerar que siguen colonizados, sin embargo, ya que el paciente no vuelve a cultivarse una vez demostrada la colonización, esta aseveración es un supuesto. Llama la atención que los pacientes que estuvieron colonizados, tanto a su ingreso, o posteriormente, tienen peso menor y menor edad gestacional. No se realizó una comparación estadística para estas variables ya que el estudio no fue diseñado para establecer o corroborar los factores de riesgo ya descritos ampliamente en la literatura.^{9,29,30} El sitio más colonizado fue el recto y solo 41% de los pacientes estaban colonizados en más de un sitio anatómico. Esto contrasta con los estudios realizados en otros países en donde la colonización es más rápida (90% a las tres semanas) y el número de sitios anatómicos colonizados es mayor (76% de colonizados en más de un sitio anatómico)^{9-12,30}.

En nuestra unidad la frecuencia de infección fúngica invasiva ha disminuido importantemente en la última década lo que suponemos está en relación con medidas más estrictas en el control de antimicrobianos de amplio espectro, a la vigilancia activa en el lavado de manos y a la menor densidad de colonización observada en nuestro estudio.

Históricamente las especies de *Candida* predominante corresponden a *Candida albicans* y, en el caso de los estudios en los que predominan las especies de no-*albicans*, a *Candida tropicalis*^{9,30} en el presente estudio encontramos principalmente especies que correspondieron a *Candida no albicans* (79%) y de éstas el 64% correspondió a *Candida parapsilosis*. Solo el 28% de las colonizaciones correspondieron a *Candida albicans* y su mayor frecuencia de colonización ocurrió en la primera semana de internamiento. La frecuencia de especies de *Candida* diferentes a *albicans* varía considerablemente entre los distintos países y el periodo de tiempo. Actualmente *Candida glabrata* es la segunda especie aislada en América del norte, mientras que *Candida parapsilosis* lo es en Europa y algunos países de América latina y en otros (Argentina) corresponde a *Candida tropicalis*.^{14,31,32,33} No se había documentado previamente la distribución de las especies que colonizan a los recién nacidos en la UCIN de nuestro hospital, es posible que el predominio de *Candida parapsilosis* haya ocurrido desde años atrás, cuando se estableció la transición epidemiológica en infecciones fúngicas invasivas donde el predominio fueron especies *no- albicans*. Para la recuperación de levaduras en las manos del personal de salud se han utilizado distintos métodos (desde la aplicación directa de un dedo sobre una placa de agar, el frote de las manos con hisopos húmedos hasta la inmersión de la mano en caldo de cultivo suplementada con antimicrobianos)³⁴⁻³⁷ con resultados que varían desde un 0% a un 75% de recuperación microbiológica lo que dificulta la comparación de los mismos.

Strausbaugh y cols. analizaron los diversos métodos descritos y encontraron que la bolsa con caldo de cultivo suplementada con antibióticos tuvo el mayor porcentaje de recuperación de levaduras (80%) comparada con bolsas con caldo sin antibióticos (62%) y aplicación directa sobre placa de agar (29%)³⁸ Esta fue la razón por lo que elegimos esta técnica para la realización de nuestro estudio. Destacamos el alto porcentaje de colonización encontrada en las manos del personal y el predominio de *Candida parapsilosis* en los aislamientos (62.9%), comportamiento que ha sido descrito en otros países donde se han llevado a cabo estudios de colonización con una técnica similar y que se considera factor fundamental en la transmisión horizontal y susceptible de modificarse con medidas estrictas y concientización en la importancia del lavado de manos antes y después del contacto con los pacientes³⁴⁻³⁷. La transmisión horizontal de levaduras mediante las manos de voluntarios se ha estimado hasta en un 69% en estudios experimentales. La recuperación de levaduras de objetos inanimados como cunas térmicas, estetoscopios, termómetros y cintas métricas, a pesar de ser un evento poco frecuente, no disminuye la posibilidad de que estos objetos sean parte de la cadena necesaria para mantener una transmisión horizontal eficiente,¹¹ ya que también se demostró en modelos experimentales que las levaduras son capaces de permanecer viables en objetos inanimados e inorgánicos hasta por cuatro meses si no se realizan medidas de higiene adecuadas, y que la transmisión de levaduras de un objeto inanimado a las manos y viceversa es hasta de 90%³⁹⁻⁴⁰. En la UCIN la limpieza de estos dispositivos médicos se realiza diariamente y la recuperación microbiológica puede estar en relación al tipo de material de los dispositivos ya que los que son principalmente de vidrio y materiales no porosos (estetoscopios, termómetros) tuvieron menor colonización en nuestro estudio comparados con aquellos compuestos de material poroso y con dificultad para la limpieza adecuada (en el caso de las cintas métricas).

No se ha podido establecer con precisión el predominio de *C. parapsilosis* como colonizante, sin embargo, su importancia como patógeno es que esta especie en particular es capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa y formar biopelículas en materiales sintéticos como acrílicos. La mayor capacidad de formación de biopelículas de *C. parapsilosis* comparada con otras especies como *C. albicans* se asocia a la capacidad de colonizar catéteres intravasculares (los cuales actúan como reservorios) en pacientes que se encuentran con soluciones con altas concentraciones de glucosa como nutrición parenteral⁴¹⁻⁴³. Esto nos pone en alerta, ya que en cualquier momento puede pasar de los sitios colonizadores a causar enfermedad.

Se ha referido por algunos autores, como Bliss J. y Alcará D, que el origen de *C. albicans* ocurre por transmisión vertical, al demostrar que la misma cepa se encuentra en la mucosa vaginal y diferentes sitios de colonización en el recién nacido. Posteriormente la colonización se va modificando al incrementar los días de estancia en las unidades de cuidado intensivo^{44,45}. Para este estudio, se seleccionaron los aislamientos de los pacientes de diversos sitios anatómicos de colonización (piel, orofaringe y tubo digestivo), se tomó solo una cepa. Huang y cols.²² demostró previamente que un paciente que se coloniza en varios sitios anatómicos tiene un genotipo idéntico, por lo que una sola cepa es la que se encuentra en un solo momento en el paciente. Esto se explica por la competencia que se establece con otras levaduras y bacterias que conforman la microbiota del individuo. La incidencia de enfermedad invasiva por *Candida* es baja en la UCIN del Hospital del Pediatría, a pesar de la elevada colonización, posiblemente se deba al control que se tiene en el uso de antimicrobianos de amplio espectro. La importancia de la adquisición de una especie no-*albicans* repercute en el tratamiento de los pacientes, ya que en general, la susceptibilidad de *C. albicans* a los antimicóticos es mayor⁴⁶.

Se ha demostrado que la transmisión cruzada influye en la diseminación de las especies de *Candida no-albicans*⁴⁷⁻⁴⁸ y en la actualidad los métodos de biología molecular permiten discriminar el origen de las cepas. Debido al ingreso de pacientes que no tienen relación epidemiológica (procedencia de un hospital diferente) se empleó una enzima de restricción para descartarla; se observó la alta relación entre las cepas, lo que confirma la transmisión cruzada.

Considerando que la colonización es la antesala para la infección invasora por hongos, lo reportado en nuestro estudio hace un llamado a concientizar al personal sobre las medidas de precaución estándar en las unidades de cuidados intensivos así como continuar con las campañas para mejorar el apego a la higiene de manos y disminuir así la transmisión.

Este estudio tiene la limitante de haberse realizado en un hospital de tercer nivel sin unidad de obstetricia por lo que los pacientes ingresados son referidos de diversas unidades, esto dificulta el conocimiento en los patrones de colonización desde el nacimiento y la situación epidemiológica de cada una de las unidades que refieren a los pacientes afectando directamente los resultados de los cultivos iniciales.

CONCLUSIONES.

- Más de la tercera parte de los pacientes de la Unidad de cuidados intensivos neonatales se encuentra colonizada o se coloniza durante su permanencia en la unidad.
- El sitio de mayor colonización es el recto. La cepa predominante correspondió a *Candida parapsilosis*.
- Hay una alta frecuencia de colonización en las manos del personal de salud (55%) con un claro predominio de *Candida parapsilosis*. La colonización en objetos inanimados es baja.
- Se encontró una clona que predomina de *Candida parapsilosis* en las manos del personal de salud, dispositivos y pacientes en un 82%.
- Para *Candida albicans* no hubo una clona predominante, sin embargo la mayoría de los pacientes con esta especie ya estaban colonizados al ingreso y proceden de otros hospitales.

REFERENCIAS.

1. Rodríguez D, Almirante B, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Sánchez F, et al. Candidemia in neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:224-229.
2. Celebi S, Hacimustafaoglu M, Koksall N, Ozkan H, Cetinkaya M, Ener B. Neonatal candidiasis: results of an 8 year study. *Pediatr Int* 2012;54:341-349.
3. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1997; 24:1122-1128.
4. Beck-Sague CM, Jarvis WR, and the National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993;167:1247-1251.
5. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, et al. National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units *Clin Infect Dis*. 1999; 29:253-258.
6. Sánchez-Huerta G, Díaz-Ponce H, Díaz-Ramos R, Solórzano-Santos F, Jiménez-Galicia C, Miranda-Novales G. Epidemiología de las infecciones sistémicas por *Candida* en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2004;61: 289-296.
7. Hope WW, Castagnola E, Groll AH, Roilides E, Akova M, Arendrup MC, ESCMID fungal Infection Study Group. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. *Clin Microbiol Infect* 2012;18 (suppl 7):38-52.
8. Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996; 100:617-623.
9. Farmaki E, Evdoridou J, Pouliou T, Bibashi E, Panagopoulou P, Filoti J, et al. Fungal colonization in the neonatal intensive care unit: risk factors, drug susceptibility and association with invasive fungal infections. *Am J Perinatol* 2007;24:127-135.
10. Alcará D, Da Silva L, Matuura C, Goldenberg E, Duarte M, Hahn R, et al. *Candida* isolated from vaginal mucosa of mothers and oral mucosa of neonates. *Pediatr Infect Dis* 2007;26: 553-557.
11. Bliss J, Basavegowda P, Watson W, Sheik A, Ryan R. Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low weight infants using DNA fingerprint techniques. *Pediatr Infect Dis* 2008;27: 231-235.

12. Mendiratta DK, Rawat V, Thamke D, Chaturvedi P, Chhabra S, Narang P. *Candida* colonization in preterm babies admitted to neonatal intensive care unit in the rural setting. *Ind J Med Microb* 2006;24:263-267.
13. Reyna J, Fragoso A, Ortiz F, Soriano D, Bermúdez G, Plazola N. Epidemiología hospitalaria de candidiasis en el Instituto Nacional de Perinatología en un periodo de 5 años. *Enf Inf Microbiol* 2007; 27: 110-113.
14. Messer S, Jones R, Fritche T. International surveillance of *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2003). *J Clin Microbiol* 2006; 44:1782-1787.
15. Gonzalez GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004-2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* 2008;46:2902-2905.
16. Verduyn-Lunel FM, Verweij PE, Belkum AV, Meis JFGM, Voss A. Molecular epidemiology of *Candida* infections. *Rev Med Microbiol* 1999;10(2): 115-124
17. Goering R. The molecular epidemiology of nosocomial infection. An overview of principles, application, and interpretation. En: *Rapid detection of infectious agents*. Edit. Specter y col. 1988; 131-157
18. Dib JC, Dube M, Kelly C, Rinaldi MG, Patterson JE. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and Restriction Fragment Length Polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1996;34(6): 1494-1496
19. Birren E., Lai E. Pulsed Field Gel Electrophoresis. A Practical Guide. Birren E., Lai E., editors. San Diego, CA: Academic Press; 1993: 85-96
20. Olive DM; Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA- Based Typing of Microbial Organisms. *J Clin Microbiol* 1993,7: 1661-1669
21. Chen KW, Chen YC, Lin YH, Chou HH, Li SY. The molecular epidemiology of serial *Candida tropicalis* isolates from ICU patients as revealed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Genet Evol.* 2009; 9:912-920.
22. Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Genotyping analysis of colonizing *Candida* isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2004; 58:200-203.
23. Abdeljelil J, Ben Saida N, Saghrouni F, Fathallah A, Boukadida J, Sboui H, Ben Said M. Systemic neonatal candidosis: the karyotyping of *Candida albicans* strains isolated from neonates and health-workers. *Mycoses.* 2010 ;53:72-77.

24. Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2002 Jul;40:2363-2369.
25. Larru B, Zaoutis TE. Newer antifungal agents. Curr Opin Pediatr 2013;25:110-115.
26. Brunetti L, De Caro F, Boccia G, Cavallo P, Capunzo M. Surveillance of nosocomial infections: a preliminary study on yeast carriage on hands of health care workers. J Prev Med Hyg 2008;49:63-68.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
28. Pfaller M, Messer S, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis R, et al. Further standardization of broth microdilution methodology for in vitro susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species by use of an international collection of more than 3,000 clinical isolates. J. Clin. Microbiol 2004; 42:3117–3119.
29. Pfaller M, Diekema D, Rex J, Espinel-Ingroff A, Johnson E, Andes D et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. J Clin Microbiol 2006; 44:819–826.
30. Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Francesconi A, Kasai M, Filioti J, et al. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. J Clin Microbiol 2003;41:735-741.
31. Manzoni P, Farina D, Galletto P, Leonessa M, Priolo C, Arisio R, et al. Type and number of sites colonized by fungi and risk of progression to invasive fungal infection in preterm neonates in intensive care unit. J Perinat Med 2007; 35: 220-226.
32. Singhi S, Rao R, Chakrabarti A. *Candida* colonization and candidemia in a pediatric intensive care unit. Pediatr Crit Care Med 2008; 9: 91-95.
33. St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, Bourgault AM, Libman M, Lemieux C, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and Other normally sterile Sites: Results of a 2-Year (1996-1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. J Clin Microbiol 2001;39: 949-953.
34. Silva V, Díaz MC, Febré N, Chilean Invasive Fungal Infections Group. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during 1-year period. Med Mycol 2004;42: 333-339.
35. Pooli L, Nocetti M, Pereda R, Rial MJ, Califano G. Candidemia en una unidad de cuidados intensivos neonatales: Identificación de factores de riesgo. Arch Argent Pediatr 2006;104: 393-398.

36. Yildirim M, Sahin I, Kucukbayrak A, Ozdemir D, Tevfik Yavuz M, Oksuz S, et al. Hand carriage of *Candida* species and risk factors in hospital personnel. *Mycoses* 2007;50:189-192.
37. Strausbaugh L, Sewell D, Tjoelker R, Heitzman T, Webster T, Ward T, et al. Comparison of three methods for recovery of yeast from Hands of Health-care workers. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 471-473.
38. Strausbaugh L, Sewell D, Ward T, Pfaller M, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2299-2300.
39. Bonassoli L, Bertoli M, Svidzinski T. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* 2005; 59: 159-162.
40. Traoré O, Springthorpe V, Sattar S. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 549-555.
41. Rangel-Frausto M, Houston A, Bale M, Fu C, Wenzel R. An experimental model for study of *Candida* survival and transmission in human volunteers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 590-595.
42. Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, Pfaller MA. In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2009;47:3170-3177.
43. Reyna J, Fragoso A, Ortiz F, Soriano D, Bermúdez G, Plazola N. Epidemiología hospitalaria de candidiasis en el Instituto Nacional de Perinatología en un periodo de 5 años. *Enf Inf Microbiol*. 2007; 27: 110-113
44. Alcará D, Da Silva L, Matuura C, Goldenberg E, Duarte M, Hahn R, Rodrigues C. *Candida* isolated from vaginal mucosa of mothers and oral mucosa of neonates. *Pediatr Infect Dis*. 2007; 26: 553-557.
45. Bliss J, Basavegowda P, Watson W, Sheik A, Ryan R. Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low weight infants using DNA fingerprint techniques. *Pediatr Infect Dis*. 2008; 27: 231-235.
46. Strausbaugh L, Sewell D, Ward T, Pfaller M, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2299-2300.
47. Azbeck V, Huang Y, Markham A, Clemons K, Stevens D. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia*. 2007;164: 287-293.
48. Rodiles E, Farmaki E, Evdoridou J, Kasai M, Filioti J, Tsvitanidou M, Sofianou D, Kremenopoulos G, Walsh TJ. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol* 2003; a 41:735-741.