

ARTICULO ORIGINAL

CANDIDIASIS ORAL EN NEONATOS: CARACTERIZACION DE AISLAMIENTOS DE CANDIDA POR ANALISIS DEL ADN

Guillermo Adolfo Hoyos Gaviria,* José Nellin Montoya Ruiz**

RESUMEN.

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, en el Servicio de Recién Nacidos del Hospital General de Medellín durante el período comprendido entre el 21 de abril de 1994 y el 21 de abril de 1995. Se encontró que la incidencia de candidiasis oral clínica fue del 2.4% (21 pacientes). De las 21 cepas aisladas, 20 (95.2%) se clasificaron como *Candida albicans* y una cepa se identificó como *Candida parapsilosis*. La prueba de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción con la enzima Eco RI, así como con Msp I, de cada uno de los 20 aislamientos de *C. albicans* mostró patrones de bandas diferentes para cada aislamiento, excepto en dos pares, los cuales compartían entre sí el mismo perfil de restricción. Esto indica que hubo transmisión nosocomial de *C. albicans* de un paciente a otro en dos ocasiones. Cada pareja de pacientes a los que pertenecían los aislamientos que mostraron patrones idénticos estaban relacionados epidemiológicamente en tiempo y espacio. El aislamiento de *C. parapsilosis* mostró un patrón de bandas diferente a los obtenidos de los aislamientos de *C. albicans* con ambas endonucleasas.

PALABRAS CLAVES: *Candida*, neonatos, candidiasis oral, tipificación genética.

SUMMARY

In a 1-year period, from 04-21-94 to 04-21-95, in the newborn ward of the Hospital General de Medellín, the incidence of oral candidiasis was 2.4% (21 patients). From each patient, a clinical isolation of *Candida* was obtained. *Candida albicans* was identified from 20 patients (95.2%) and *Candida parapsilosis* from one patient. These isolates were studied by restriction fragment length polymorphism analysis using the restriction enzymes Eco RI, and Msp I. The patterns of restriction fragment length polymorphisms of the DNA extracted from the *C. albicans* isolates were different from each other, except for two pairs of isolates. These two pairs shared the same restriction profile between them, and were epidemiologically connected. This suggested that nosocomial patient to patient cross infection with *C. albicans* occurred twice. The *C. parapsilosis* isolated was found to have a different restriction profile from those of *C. albicans* isolations using both enzymes.

KEY WORDS: *Candida*, newborn, oral candidiasis, genetic typing.

INTRODUCCION

Las especies de *Candida* son organismos ubicuos usualmente confinados a reservorios humanos y animales, pero que también pueden ser aisladas del suelo, los alimentos y el ambiente hospitalario. Son habitantes normales del tracto genital femenino y de todo el tracto gastrointestinal, incluyendo la orofaringe, el recto y el periné.^(1,2,3) La mayoría de los humanos son portadores de *C. albicans* como parte de su microflora comensal, la que, sin embargo, puede transformarse en patógena,⁽⁴⁾ tanto en huéspedes normales como inmunocomprometidos. Este cambio de comensal a patógeno puede ser promovido por factores de riesgo como un catéter central, una sonda vesical, dos o más antibióticos, uremia, traslado a un hospital de tercer nivel, diarrea y candiduria⁽⁵⁾. En la mayoría de los pacientes la candidiasis es localizada, pero causa un grado considerable de malestar. Para ciertos grupos de pacientes de alto riesgo, por ejemplo quemados, recién nacidos de bajo peso y leucémicos, se ha encontrado una incidencia del 5 al 15% de fungemia por *Candida* lo que conlleva una alta tasa de mortalidad asociada^(4,6,7).

Se acepta que las levaduras que ya están presentes como parte de la microflora comensal del hospedero normal, usualmente son los agentes etiológicos de la candidiasis^(4,8,9). Por métodos de tipificación molecular, varios investigadores han confirmado esta hipótesis en pacientes neutropénicos y no neutropénicos^(10,11,12,13). Por otro lado, los brotes de candidiasis nosocomial que ocurren, sugieren la posibilidad de transmisión de cepas virulentas a los pacientes hospitalizados⁽¹⁴⁾. Por ello, sería importante determinar si la transmisión persona a persona contribuye al desarrollo de la candidiasis nosocomial. De ser así, previniendo la transmisión se reduciría la incidencia de la enfermedad⁽⁴⁾.

La mayoría de los métodos de diferenciación de las cepas se basan en las características fenotípicas del organismo⁽¹⁵⁾. Uno de estos métodos está basado en la forma y extensión de los bordes de las colonias^(15,16). Otros métodos recurren a la serotipificación⁽¹⁵⁾, a la resistencia a varios químicos⁽¹⁷⁾, a la tipificación con isoenzimas^(18,19) y a la biotipificación, la cual emplea una mezcla de patrones de resistencia y pruebas bioquímicas⁽¹⁷⁾.

* Residente de Pediatría, CES.

** Estudiante de Bacteriología, U. de A.

Asesores: Angela Restrepo Moreno, PhD, Juan Guillermo, McEwen Ochoa, MD., PhD.

La clave para prevenir la infección cruzada se basa en la habilidad para tipificar, en forma rápida, los aislamientos de levaduras. Esto es posible únicamente si se usa un sistema de tipificación reproducible que tenga un poder discriminatorio adecuado y que, además, sea capaz de dar una respuesta lo suficientemente rápida para ser útil a los clínicos⁽⁸⁾. Los recientes avances en el campo de la biología molecular han permitido el uso de mejores métodos de caracterización de cepas conducentes al estudio de la epidemiología de la candidiasis. Algunos de estos nuevos métodos son: la electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas celulares⁽²⁰⁾, el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) cromosomal con enzimas de restricción^(17,20,21,22,23), el análisis de hibridación de tipo Southern que usa sondas de ADN^(24,25,26,27,28,29,30,31), la tipificación por cariotipo electroforético por electroforesis de campo pulsado^(13,19,32,33,34), la electroforesis en gel con campo eléctrico homogéneo^(23,35) y el uso de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa^(4,13,35).

El análisis del ADN cromosomal que usa enzimas de restricción tiene un alto grado de reproducibilidad y discriminación^(11,36) y ha facilitado el desarrollo de un sistema de tipificación a nivel molecular, o sea, de subespecies^(3,10), que permite distinguir las diferentes especies de *Candida* y muchos subtipos de *C. albicans*, incluyendo cepas que son fenotípicamente similares^(21,36,37,38,39).

En esta investigación se empleó el análisis del ADN cromosomal digerido con enzimas de restricción según el método de identificación de secuencias denominado prueba de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, para estudiar las cepas de *Candida* aisladas de la cavidad oral de neonatos con candidiasis oral hospitalizadas en el Servicio de Recién Nacidos del Hospital General de Medellín. El objetivo del estudio fue determinar si los pacientes estudiados estaban infectados con cepas genéticamente diferentes o, si por el contrario, las cepas aisladas eran iguales desde el punto de vista genético, lo que indicaría una contaminación a partir de una fuente común, intrahospitalaria.

MATERIALES Y METODOS

Universo y muestra

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, en el Hospital General de Medellín y en la Corporación para Investigaciones Biológicas tomando como universo muestral la totalidad de niños con signos clínicos de infección por *Candida* que fueron admitidos al Servicio de Recién Nacidos del mencionado hospital, durante el período comprendido entre abril de 1994 y abril de 1995. Se ingresaron 21 niños, todos los cuales presentaban lesiones clínicas características en la cavidad oral. No se presentaron casos de candidiasis sistémica durante el período del estudio.

A pesar de que en el servicio de recién nacidos donde

se efectuó este trabajo se realizan frecuentemente hemocultivos a los pacientes con infección severa o con sospecha de la misma, no se aislaron levaduras de los cultivos de sangre efectuados durante el período de estudio de esta investigación.

A cada uno de los pacientes que ingresaron al estudio se le llevó un registro con los siguientes datos: peso al nacer, edad gestacional, sexo, modo del parto, factores obstétricos, diagnóstico neonatal, tratamiento con antibióticos antes del desarrollo de la candidiasis clínica, modo de presentación, tipo de nutrición y resultado final.

A cada paciente con candidiasis oral se le tomó una muestra de las lesiones evidentes clínicamente, empleando un aplicador de algodón estéril que luego fue conservado en un tubo que contenía 2 ml de solución salina normal estéril, mientras era transportado al laboratorio de micología, lo que no tomó más de una hora; cuando la remisión tomaba más tiempo, la muestra se colocaba en refrigeración a 4° C.

Cada muestra fue cultivada en placas de agar dextrosa de Sabouraud (Difco). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente bajo condiciones aeróbicas durante 3 días, luego de los cuales fueron examinados. Los métodos básicos usados para identificar las levaduras aisladas fueron la prueba de producción de tubos germinales después de una incubación de 2 horas en suero bovino, la formación de clamidiosporas luego de un crecimiento de 3 a 5 días en agar de harina de maíz y la prueba de asimilación de azúcares^(1,2,40). En esta investigación la unidad de análisis fue cada una de las cepas de *Candida* aisladas de los pacientes.

Métodos, técnicas y procedimientos

Aislamiento del ADN genómico total (Ver cuadro 1). Cada una de las cepas de *Candida* se cultivó en 10 ml de caldo YEPD: 1% de extracto de levadura, 2% de Bacto-Peptone Difco y 2% de dextrosa; y se dejó incubando durante una noche en incubadora con agitación a 37° C y a 200 rpm.

Para preparar el ADN se usó el método descrito por Scherer y Stevens⁽¹⁷⁾ con algunas modificaciones^(46,47,48,49). Cada cultivo se centrifugó a 4,000 rpm por 5 minutos, se lavaron las células con agua destilada, se centrifugaron de nuevo, y se recogieron las levaduras precipitadas en un volumen de 1.5 ml en un tubo de microcentrífuga. Se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm. Las células empacadas se lavaron con 1.0 ml de Sorbitol 1M. Se centrifugó de nuevo y las células empacadas se resuspendieron en 1.0 ml de una solución de sorbitol 1M, tampón fosfato de potasio 50mM con pH 7.5, 2-Mercaptoetanol al 0.1%, vol/vol, y Zymolase 20 T a una concentración de 2.5 mg/ml, ICN Biomedicals, Costa Mesa, California. Se incubó durante 60 minutos a 37° C. Luego los esferoplastos se centrifugaron por 30 segundos a 10,000 rpm y se resuspendieron en 0.5 ml de una solución tampón de EDTA de sodio 50 mM (pH 8.5) y dodecyl sulfato sódico al 0.2%. Esto se mezcló y luego

se incubó a 60° C por 30 minutos para lisar los esferoplastos.

Cuadro I. Esquema del proceso de preparación del ADN.



Después de esta incubación se practicó la extracción de los ácidos nucleicos usando una solución saturada de TE, Tris 10 mM-EDTA 1 mM, pH 8.4, -fenol-cloroforno (49), de tal modo que a cada muestra se le agregaron primero 250 microlitros de fenol y luego 250 microlitros de cloroforno, se mezcló bien, aunque con delicadeza, para no fragmentar el ADN; se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta a otro tubo de microcentrifuga, evitando la interface. Luego se repitió el mismo procedi-

miento 2 veces con fenol-cloroforno, después con cloroforno únicamente y al sobrenadante obtenido al final, se le practicó la precipitación con acetato de potasio, agregándole al sobrenadante 1/10 de su volumen en acetato de potasio 5 M, pH 7.0. Finalmente, se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se agitaron suavemente las muestras y luego se colocaron durante una hora a -70° C.

Los ácidos nucleicos fueron descongelados y luego centrifugados a 10,000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón se lavó con etanol frío al 80%. Se centrifugó de nuevo con los mismos parámetros y se secó en horno al vacío por 15 minutos. Luego los ácidos nucleicos se resuspendieron en 200 microlitros de la solución tampón Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0, con 2 microgramos por cada 200 microlitros de RNasa A, Sigma[®]. Se incubó por 30 minutos a 37° C.

Se practicó precipitación del ADN por adición de 200 microlitros de alcohol isopropílico. Después de 2 minutos se centrifugó el ADN a 10,000 rpm por 10 minutos, se lavó con etanol frío al 80%, se volvió a centrifugar con los mismos parámetros y se secó en un horno al vacío por 15 minutos.

Finalmente, las muestras de ADN se disolvieron en 100 microlitros de solución tampón TE, Tris 1 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0 y se hizo una medición cuantitativa de la concentración del ADN obtenido empleando un espectrofotómetro de luz ultravioleta. Las muestras se almacenan a 4° C hasta que se les realizó la electroforesis.

Digestión con endonucleasas de restricción

Cada muestra de ADN genómico total se digirió con Eco RI (Amersham), en la solución tampón adecuada para la enzima, durante 1 hora en 40µl final de reacción, a 37° C, empleando 2µl de enzima (24 unidades) para cada muestra de 15µg de ADN. Una alícuota de cada muestra de ADN también se digirió con Msp I (New England Biolabs, Beverly), en la solución tampón adecuada para la enzima, durante 1 hora en 40µl de volumen final de reacción, a 37° C, empleando 4µl de enzima (80 unidades) para cada muestra de 15µg de ADN. En la digestión con Msp I se usó más cantidad de la enzima porque el lote que se utilizó mostró menor actividad.

Electroforesis en gel

El ADN digerido se corrió en un gel horizontal de agarosa al 0.7% que contenía 0.5µg de bromuro de etidio por ml (50), a 15 V por 16 horas con una solución tampón TBE 0.5X, Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2.8 mM, pH 8.3, junto con ADN de bacteriófago λ digerido con Hin dIII como marcador de peso molecular(47). Los fragmentos de ADN se examinaron en un transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm y se fotografiaron a través de un filtro anaranjado con película Polaroid 667.

Análisis

Las fotografías de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se inspeccionaron visualmente para comparar el patrón de bandas. Se identificó cada banda mayor y menor, y se midió la distancia del origen del gel al marcador de peso molecular del fago λ.

Se usó el esquema de tipificación de ADN descrito por Scherer y Stevens⁽¹⁷⁾ y Stevens y colaboradores⁽²¹⁾, basado en el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de bandas de ADN que codifican para los ácidos ribonucleicos ribosomales (este ADN se denomina ADN ribosomal). En este sistema, que emplea como enzima de restricción la endonucleasa Eco RI, una banda dímórfica de ADN ribosomal separa los aislamientos en dos grupos principales: IA, que posee una banda de 3.7 kb, o IB, el cual tiene una banda de 4.2 kb. Se han caracterizado subtipos adicionales en cada grupo principal de acuerdo con los patrones de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de bandas de ADN ribosomal situadas entre 6 y 7 kb y 2.5 y 3.0 kb y la presencia o ausencia de las restantes bandas menos intensas, y de las áreas de tinción de baja intensidad⁽⁵⁰⁾. Las cepas se consideraron significativamente diferentes si cualquier banda detectable, mayor o menor, era diferente⁽⁵¹⁾. Todas las bandas tenían que coincidir exactamente para clasificar las cepas aisladas como idénticas; cualquier diferencia en una banda mayor o menor fue considerada importante^(12, 44). Se usó la enzima Msp I para corroborar los resultados obtenidos con Eco RI, por medio del examen de los patrones de bandas de la misma manera como se hizo con los geles de ADN digerido con Eco RI.

RESULTADOS

Análisis de los pacientes

El promedio del peso al nacer de los 21 niños afectados por candidiasis oral fue de 1700g y el de la edad gestacional fue de 33 semanas y media. En cuanto a sexo, no hubo diferencia significativa, pues fueron 11 hombres y 10 mujeres. (Tabla 1) Catorce niños nacieron por parto vértice espontáneo, 6 por cesárea y uno en podálica por vía vaginal. La gran mayoría estaba recibiendo o había recibido por lo menos dos antibióticos al momento del diagnóstico de la candidiasis oral. La edad cronológica promedio de los niños al momento del diagnóstico fue de 13 días.

Tabla 1. Distribución según sexo y edad gestacional de los niños con candidiasis oral. H.G.M., abril 1994 - abril 1995.

	Semanas de Gestación		
	28-32	33-37	38-42
Sexo			
Hombres	3	1	2
Mujeres	5	5	0
Promedio de edad gestacional: 33.5 semanas			

Los diagnósticos más comunes en estos pacientes fueron: prematurez, 17 niños; sepsis neonatal, nueve pacientes; siete presentaron el cuadro de enterocolitis necrotizante; cuatro niños desarrollaron enfermedad de membrana hialina y cuatro presentaron hipoglicemia neonatal. Algunos tenían más de un diagnóstico. (Tabla 2)

En cuanto a los factores obstétricos, se encontraron cinco madres que habían recibido esteroides parenterales (betametasona), como parte del manejo de la amenaza de parto prematuro. Sólo uno de los 21 niños del estudio necesitó esteroides como parte del manejo de la hipoglicemia neonatal refractaria.

Tabla 2. Diagnósticos neonatales y peso al nacer de los niños con candidiasis oral. H.G.M., abril 1994 - abril 1995.

Diagnóstico	Peso al nacer (gramos)		
	1000-1499	1500-1999	2000 o más
Prematurez	7	9	1
Sepsis neonatal	3	1	2
Enterocol necrotizante	3	4	2
Enf. de memb. hialina	1	3	0
Hipoglicemia neonatal	3	0	0
Promedio de peso al nacer: 1700 gramos			

De los 21 pacientes ingresados a la investigación, seis estaban recibiendo o habían recibido nutrición parenteral. Es de anotar que en el Servicio de Recién Nacidos del Hospital General sólo excepcionalmente se colocan líneas centrales para la administración de los líquidos endovenosos y de la nutrición parenteral total. De los siete niños con enterocolitis necrotizante, uno murió, pues presentó perforación intestinal; este fue el único niño de los que entraron en esta investigación, cuyo desenlace final fue fatal. El resto de los niños fue dado de alta del servicio en buenas condiciones generales.

Análisis de los organismos aislados

Se lograron aislar 21 cepas de levaduras, 20 de las cuales al ser cultivadas y examinadas fueron clasificadas como *C. albicans*. Este número corresponde al 95.2 % del total de pacientes con candidiasis oral. Sólo un niño resultó infectado por la especie *C. parapsilosis*, identificada por medio de la prueba de asimilación de azúcares. Se evaluaron 20 aislamientos de *C. albicans* y un aislamiento de *C. parapsilosis* por medio de la prueba de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. Se obtuvieron patrones electroforéticos distinguibles de los ADN cromosomales usando las endonucleasas Eco RI y Msp I. La electroforesis en gel de agarosa reveló múltiples bandas correspondientes a fragmentos de

ADN, unos 33 para las digestiones con Eco RI y aproximadamente 60 con Msp I, dependiendo de las horas de electroforesis. Al aumentar el tiempo de corrido se lograba una mejor separación de las bandas, apareciendo algunas nuevas que quedaban superpuestas a otras en las electroforesis de menor tiempo de corrido. Así se pudo determinar que el tiempo adecuado de electroforesis con el equipo disponible era de 6 horas, a un voltaje de 30 V. El tamaño de las bandas se determinó al efectuar la electroforesis del ADN de los aislamientos de *Candida* en líneas adyacentes a fragmentos de ADN de bacteriófago λ de longitud conocida. Los fragmentos de ADN cromosomal estudiados tenían tamaños variables entre 1 y 18 kb cuando la enzima de restricción empleada fue Eco RI; cuando era Msp I, el rango de tamaño de las bandas fue de 0.5 a 16 kb.

Entre todo el conjunto de bandas que presentaba cada aislamiento, se destacaban varias más intensamente teñidas. Cuando la digestión del ADN se efectuó con Eco RI, los patrones de restricción de los aislamientos presentaban las tres o cuatro bandas intensas en las que se basa la clasificación descrita en varios estudios previos (17, 21, 50). De este modo, se encontró que cuatro (20%) de los 20 aislamientos de *C. albicans* mostraban la banda de 4.2 kb por lo que se clasificaron como pertenecientes al grupo IB. La mayoría, 16 aislamientos (80%),

presentaban la banda de 3.7 kb, por lo que se clasificaron dentro del grupo IA.

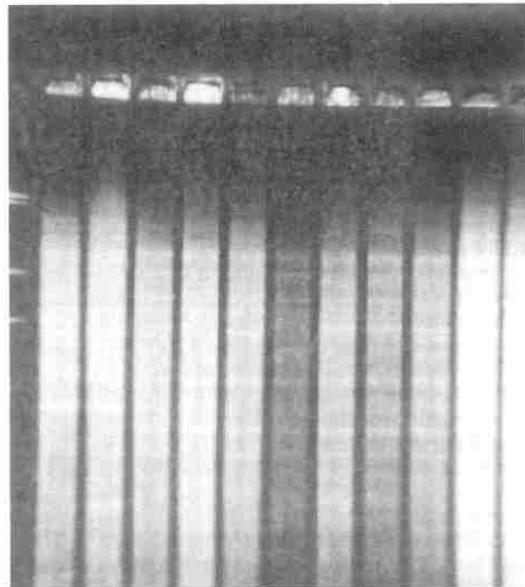
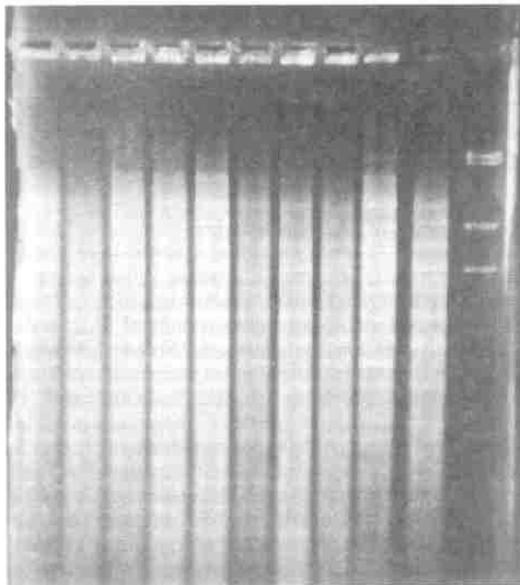


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de ADN cromosomal de los veinte aislamientos de *C. albicans* y del aislamiento de *C. parapsilosis*, después de la digestión con la endonucleasa de restricción Eco RI; las líneas situadas en ambos extremos contienen los marcadores de referencia de tamaño clásico de ADN de bacteriófago λ digerido con Hin dIII.



Las figuras 1 y 2 muestran los patrones de bandas con Eco RI y Msp I, respectivamente, para los 21 aislamientos estudiados, en las cuales se puede apreciar la ubicación de las diferentes bandas de cada aislamiento, comparada con los marcadores de peso molecular constituidos por fragmentos de tamaño conocido de ADN de bacteriófago λ .

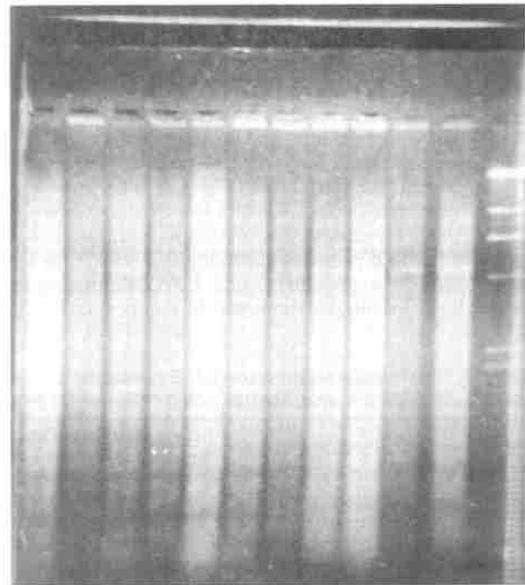
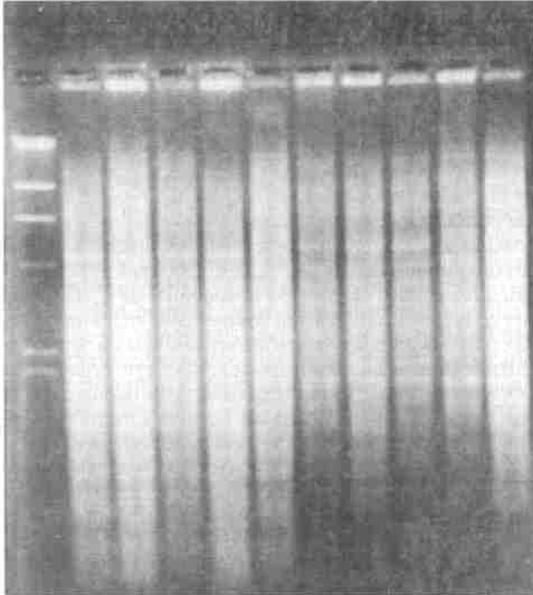


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de ADN cromosomal de los 20 aislamientos de *C. albicans* y del aislamiento de *C. parapsilosis*, después de digestión con la enzima Msp I; las líneas situadas en ambos extremos contienen los marca-dores de tamaño de ADN de bacteriófago λ digerido con Hin dIII.



Al analizar los patrones de bandas de cada aislamiento, se logró determinar que había dos pares de aislamientos con patrones idénticos. Se trata de los aislamientos números 3 y 4, que presentaron patrones iguales tanto con Eco RI como con Msp I. Los pacientes a quienes pertenecían estos aislamientos compartieron hospitalización algunos días, en incubadoras contiguas. El otro par de aislamientos con patrones idénticos entre sí con ambas enzimas de restricción, fueron los números 7 y 8, cuyos respectivos pacientes también estuvieron en incubadoras contiguas durante algunos días.

Se repitió el mismo procedimiento de digestión del ADN cromosomal de los aislamientos de *C. albicans* tanto con la enzima Eco RI como con Msp I, y los resultados obtenidos fueron similares a los que se obtuvieron previamente, indicando la adecuada reproducibilidad de las pruebas basadas en los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción. Los mismos 2 pares de aislamientos que habían resultado con patrones de bandas iguales, resultaron nuevamente con perfiles de restricción idénticos al repetir los análisis.

El patrón de bandas del aislamiento de *C. parapsilosis* era distinto de los diferentes patrones de los aislamientos de *C. albicans*, tanto con la enzima Eco RI como con Msp I, aunque algunas bandas eran comunes para ambas especies.

DISCUSION

La incidencia de candidiasis oral en el recién nacido varía según las diferentes investigaciones. Se han reportado tasas tan altas como del 18%, pero el promedio parece ser el 4%⁽¹⁾. En el presente estudio la incidencia fue del 2.3%.

Está bien establecido que la vaginitis candidiásica durante el embarazo contribuye a la candidiasis oral en el recién nacido⁽¹⁾. Un porcentaje pequeño pero significativo se debe a la contaminación cruzada a partir de otros niños, las madres y el personal de enfermería⁽¹⁾. Se ha aislado frecuentemente *C. albicans* de los dedos, siendo éstos los vectores probables de la diseminación intrapersonal, como también de la diseminación persona a persona.

El análisis genético de los aislamientos de *C. albicans* obtenidos en esta investigación, muestra que la mayor parte pertenecía al grupo IA, el cual comprende el 80% de los aislamientos estudiados. El 20% restante se clasificó en el grupo IB.

Esta distribución es similar a la descrita por Stevens y col.⁽²¹⁾, en cuanto a sus dos grupos principales, determinados por la presencia o ausencia en los patrones de restricción con Eco RI de la banda de 4.2 kb. Estos autores encontraron que al grupo IB pertenecía el 14% de los aislamientos analizados y el resto, o sea la mayoría, hacía parte de los diferentes subtipos del grupo IA, dentro del cual, el subtipo IA2 predominaba como el más común, comprendiendo el 41% de los aislamientos caracterizados⁽²¹⁾, lo cual es similar a lo encontrado por Clemons y col.⁽⁵⁰⁾, quienes clasificaron dentro del subtipo IA2 al 38,8% de los aislamientos.

Tabla 3. Distribución de aislamientos de *C. albicans* por tipos de ADN, de acuerdo con diferentes estudios.

Estudio (Referencia)	Tipo de ADN (%)		No. de aislamientos
	IA	IB	
Scherer y Col. (17)	94	6	17
Stevens y Col. (21)	86	14	104
Clemons y Col. (50)	92,3	7,7	13
Esta investigación	80	20	20

Debido a la falta de cepas de referencia para clasificar los diferentes subtipos de los grupos IA y IB en los que se pueden agrupar los aislamientos, en la presente investigación no fue posible determinar los subtipos.

Aunque ocurren brotes de candidiasis invasiva en los hospitales, rara vez se ha confirmado, en forma inequívoca, que una misma cepa sea la causante de un brote⁽²⁾. Ha sido difícil desarrollar una técnica que permita identificar claramente las cepas de *Candida* aisladas en un brote, pues los métodos son muy diversos, cada uno con ventajas y desventajas en relación con la capacidad de tipificación, el grado de reproducibilidad, poder discriminatorio, costo y facilidad de uso. Hunter⁽¹⁴⁾ ha llegado a

concluir que la transmisión nosocomial de *C. albicans* no ha sido probada en forma inequívoca, lo cual es apoyado por Schmid⁽⁴⁾. En una unidad de cuidados intensivos de un hospital de Londres hubo un brote de candidiasis sistémica, el cual fue reportado como debido a una sola cepa de *C. albicans*, pero al estudiar las cepas con un método de tipificación del ADN, se logró demostrar que el brote era atribuible a múltiples cepas^(4,21).

Aunque raros, los brotes de candidiasis nosocomial debidos a la misma cepa de *Candida* pueden darse, como es el caso de un brote reportado en ocho pacientes que habían sido sometidos a cirugía de revascularización coronaria, todos los cuales se infectaron de la misma fuente con *C. tropicalis*. Se identificó como portadora a una enfermera encargada de hacer la asepsia de los pacientes antes de la cirugía. Esto se confirmó mediante la tipificación basada en el análisis de los fragmentos de restricción del ADN de las cepas aisladas de los pacientes afectados y de la nasofaringe y pulpejos de los dedos de la enfermera implicada^(2,38).

Los reportes más recientes confirman que las características fenotípicas no son confiables para inferir la igualdad o diferencia de las cepas aisladas durante estudios epidemiológicos. Tal falta de correlación es particularmente marcada cuando se aplica a la investigación de brotes de infección nosocomial^(8,36,21).

El enfoque empleado en esta investigación para distinguir diferentes cepas de *Candida*, basado en el análisis de los fragmentos del ADN cromosomal digerido por la enzima de restricción Eco RI, ha sido utilizado con éxito por otros investigadores en diferentes partes del mundo^(8,20,22,39,51). Romano y col.⁽⁸⁾ estudiaron un brote nosocomial de candidiasis sistémica usando este método y lograron probar su naturaleza epidémica, ya que la mayoría de los pacientes presentaron infección cruzada y, además, los resultados implicaron las manos de los trabajadores de la salud como transmisores determinantes de la epidemia.

Vaudry y col.⁽²⁰⁾ investigaron un brote de infección sistémica por *C. albicans* en una unidad de cuidados intensivos neonatales y emplearon el análisis de los patrones de fragmentos de restricción del ADN total y la electroforesis de proteínas.

Encontraron que de las tres enzimas de restricción usadas (Eco RI, Hin dIII y Pvu II), la más útil fue la Eco RI pues generó patrones de bandas bien separadas en la electroforesis en gel de agarosa. Estos autores encontraron evidencia de infección cruzada probable entre dos niños.

Betremieux y col.⁽⁴³⁾ estudiaron un brote de sepsis por *C. albicans* en una unidad de cuidado intensivo neonatal por medio de cinco técnicas diferentes, cuatro basadas en características fenotípicas y una en la tipificación genética. Compararon los aislamientos obtenidos en seis niños prematuros con los obtenidos del personal que los cuidaba y encontraron que un aislamiento de las manos de uno de los miembros del equipo de salud, pertenecía a la misma cepa que infectó a los niños. Esto sugiere la

ocurrencia de contaminación cruzada de esta cepa de *C. albicans*, de un paciente a otro por medio de un portador. Los autores afirman que deben usarse varios métodos para identificar la fuente de un brote. La tipificación morfológica y el análisis de hibridación con una sonda de ADN fueron las técnicas con mayor capacidad discriminativa en este estudio.

En otra unidad de cuidado intensivo neonatal, Reagan y col.⁽⁴⁴⁾ también encontraron evidencia de diseminación nosocomial de *C. albicans* como causa de infección del torrente sanguíneo. Ellos tipificaron los aislamientos por medio del análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción con una sonda de ADN específica para *C. albicans*. Tres de los cuatro pacientes afectados en el período de la epidemia estaban infectados con cepas idénticas, las cuales eran diferentes a cepas no relacionadas epidemiológicamente de la misma unidad de cuidados intensivos neonatales. Estos autores concluyen que ocurrió transmisión nosocomial de *C. albicans* en este brote y reafirman que los neonatos en las unidades de cuidados intensivos pueden representar un grupo de alto riesgo para adquirir infecciones por este organismo. Doebbleling y col.⁽⁵¹⁾ investigaron un brote de infecciones por *C. tropicalis* aisladas de heridas esternas, por medio del análisis de los fragmentos de restricción. Las cepas aisladas de cada uno de los ocho pacientes afectados por el brote resultaron idénticas y fueron diferenciadas de manera fácil de cepas de control, por medio del análisis de los fragmentos de restricción de ADN. Además, los autores lograron confirmar la relación epidemiológica entre una enfermera que era la encargada de hacer la asepsia a los pacientes y los pacientes infectados.

Vazquez y col.⁽³⁹⁾ realizaron un estudio epidemiológico sobre la adquisición nosocomial de *C. albicans* empleando el análisis con enzimas de restricción. Encontraron que los tipos de cepas que colonizaban a los pacientes eran idénticas a las que, más tarde, causaron infecciones en la mayoría de ellos. Estos hallazgos son similares a los de Reagan y col.⁽¹¹⁾, quienes encontraron que todos los pacientes estaban colonizados con tipos de cepas idénticas a las que más tarde causaron infección.

Magee y col.⁽²²⁾ encontraron que el análisis del polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción en el ADN, era muy útil en la biotipificación de varias cepas de *C. albicans*, puesto que podía servir para el estudio de la epidemiología de las infecciones, la autoinfección en pacientes susceptibles, así como también para ayudar a definir la ocurrencia de reinfección o de recaída. Además, ellos encontraron que en los geles teñidos, los fragmentos son tan característicos que pueden emplearse para la identificación de especies, sin que sea necesario utilizar la hibridación.

Existen también métodos con mayor capacidad de discriminación entre diferentes cepas de *Candida*^(4,52,53,54). Algunos de ellos son asistidos por computador, los que son más complejos de llevar a cabo y mucho más costosos. Voss y col.⁽⁵⁵⁾ investigaron la transmisión de *C.*

albicans durante un brote ocurrido en una unidad de cuidados intensivos quirúrgica. Emplearon tipificación molecular de las cepas por medio del análisis del cariotipo electroforético y del análisis con endonucleasas de restricción del ADN genómico con las enzimas Bss HII y Sfi I, seguido de electroforesis en campo pulsado. La combinación de estas técnicas les permitió encontrar perfiles únicos del ADN de los aislamientos de cada paciente y de cada uno de los trabajadores de la salud estudiados. Ninguno de los aislamientos de los pacientes o de los trabajadores compartía todos los marcadores del ADN.

Schmid y col.⁽⁴⁾ encontraron evidencia de la transmisión nosocomial de *C. albicans* por el análisis «dactiloscópico» del ADN con la sonda Ca3, asistido por computador, este es el método más exacto y más altamente discriminativo disponible en la actualidad.

Entre los 20 aislamientos de *C. albicans* analizados en la presente investigación, se encontraron dos parejas que presentaban patrones de restricción idénticos, tanto al usar Eco RI como con Msp I. Los aislamientos número 3 y 4 pertenecían a dos niños que compartieron varios días de hospitalización en incubadoras contiguas. Estos pacientes eran cuidados por el mismo grupo de enfermeras y de personal médico. Los perfiles de bandas de estos dos aislamientos eran idénticos entre sí, pero distintos de todos los demás patrones obtenidos. Lo mismo sucedió con los pacientes a quienes pertenecían los aislamientos número 7 y 8, quienes también estuvieron hospitalizados en incubadoras contiguas durante algunos días, y cuyos aislamientos presentaron patrones de restricción iguales entre sí, aunque diferentes a todos los demás. Estos dos casos de aislamientos con patrones de bandas iguales, pueden indicar contaminación nosocomial cruzada con *C. albicans* de un paciente a otro, a través de algún miembro del personal médico o paramédico, o por medio de algún objeto que se usó en forma compartida para ambos miembros de cada pareja de pacientes afectados. Otra explicación pudiera ser que la capacidad de discriminación de la técnica usada, a pesar de haber efectuado las pruebas con dos enzimas de restricción diferentes, Eco RI y Msp I, no haya sido lo suficientemente precisa como para lograr diferenciar entre estos dos pares de aislamientos. Vasquez y col.⁽²³⁾ al comparar el análisis con las enzimas de restricción Eco RI y Msp I con la técnica de electroforesis en gel de gradiente con campo pulsado, encontraron que el análisis con enzimas de restricción distinguió 17 tipos de cepas mientras que la electroforesis en gel de gradiente con campo pulsado fue capaz de distinguir 23 tipos de cepas entre 35 aislamientos de *C. albicans*, indicando la mayor capacidad de discriminación de esta última técnica.

Recientemente, Deresinski y col.⁽⁵⁶⁾ estudiaron un aparente brote de aislamientos de *C. parapsilosis* obtenidos de especímenes clínicos y lograron demostrar, tanto por técnicas de epidemiología clásica como molecular, que se trataba de una pseudoepidemia que resultó de una contaminación de las muestras clínicas en el laboratorio.

Los patrones del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN extraído de los aislamientos clínicos y de un reactivo de laboratorio empleada para procesar las muestras, fueron idénticos entre sí. En este caso, no hubo necesidad de emplear sondas de ADN y los resultados fueron rápidos y confiables.

La técnica de tipificación del ADN de las especies de *Candida* basada en el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, aunque requiere de algún equipo adicional, puede ser desarrollada a nivel de laboratorios de referencia en Colombia. Como no exige el uso de sondas de ADN marcadas con material radioactivo, su aplicación se facilita enormemente, y los costos, por lo mismo, son relativamente bajos. Además, la técnica, una vez desarrollada, permite obtener resultados rápidos, que ayudarían a estudiar brotes nosocomiales de infecciones por especies de *Candida* y lograr su control de una forma más efectiva.

CONCLUSIONES

Los métodos de tipificación del ADN pueden usarse en forma efectiva para estudiar las infecciones nosocomiales; ello ayudaría a controlarlas de una manera más eficaz, cuando se compruebe que se trata de verdaderos brotes y no de un agrupamiento al azar de varios casos, producido cada uno por un aislamiento diferente.

Es posible en nuestro medio emplear la técnica de tipificación basada en el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, para responder preguntas acerca de la colonización, transmisión, infecciones recurrentes y también, como herramienta de epidemiología molecular en varias categorías de enfermedades infecciosas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angela Restrepo Moreno y a los doctores Juan Guillermo McEwen Ochoa y John Santiago Mejía, por su valiosa colaboración académica y técnica.

BIBLIOGRAFIA

1. Rippon JW. Medical mycology. Philadelphia: WB Saunders, 1988:539-541.
2. Kwon-Chung KJ, Bennet JE. Medical mycology. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992:280-336.
3. Sanchez V, Vázquez JA, Barth-Jones D, Dembry L, Sobel JD, Zervos MJ. Nosocomial acquisition of *Candida parapsilosis*: An epidemiologic study. American Journal of Medicine 1993; 94:577-582.
4. Schmid J, Tay YP, Wan L, Carr M, Parr D, McKinney W. Evidence of nosocomial transmission of *Candida albicans* obtained by Ca3 fingerprinting. Journal of Clinical Microbiology 1995;33:1223-1230.
5. Hughes WT. Candidiasis. En: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. 3ª ed. Philadel-

- phia: WB Saunders, 1992.
6. Johnson DE, Thompson, TR, Green TP, Ferrieri, P. Systemic candidiasis in very low-birth-weight infants (<1,550 grams). *Pediatrics* 1984;73:138-143.
 7. Baley JE, Kliegman RM, Fanaroff, AA. Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: clinical manifestations and epidemiology. *Pediatrics* 1984;73:144-152.
 8. Romano F, Ribera G, Giuliano M. A study of a hospital cluster of systemic candidosis using DNA typing methods. *Epidemiology and Infection* 1994;112:393-398.
 9. Odds FC. *Candida* and candidosis: A review and bibliography. 2nd ed. London: WB Saunders, 1988:468.
 10. Fox BC, Mobley LT, Wade JC. The use of DNA probe for epidemiological studies of candidiasis in immunocompromised hosts. *Journal of Infections Diseases* 1989;159:488-494.
 11. Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *Journal Clinical Microbiology* 1990;28:2733-2738.
 12. Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Doebbeling BN. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 1994;32:975-980.
 13. van Belkum A, Melchers W, de Pauw BE, Scherer S, Quint W, Meis JF. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. *J Infect Dis* 1994;169:1062-1070.
 14. Hunter PR. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. *Critical Reviews in Microbiology* 1991;17:417-434.
 15. McCullough MJ, Ross BC, Dwyer BD, Reade PC. Genotypic and phenotype of oral *Candida albicans* from patients infected with the human immunodeficiency virus. *Microbiol* 1994;140:1195-1202.
 16. Phongpaitit S, Mackenzie DWR, Fraser C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. *Epidemiol Infect* 1987;99: 421-428.
 17. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *Journal Clinical Microbiology* 1987;25:675-679.
 18. Lin D, Wu L, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol* 1995;33:1815-1821.
 19. Doebbeling BN, Lehmann PF, Hollis RJ, Wu LC, Widmer, AF, Voss A, Pfaller MA. Comparison of pulsedfield gel electrophoresis with isoenzyme profiles as a typing system for *Candida albicans*. *Clinical Infectious Diseases* 1993;16:377-383.
 20. Vaudry WL, Tierney AJ, Wenman WM. Investigation of a cluster of systemic *Candida albicans* infections in a neonatal intensive care unit. *Journal Infectious Diseases*. 1988;158:1375-1379.
 21. Stevens DA, Odds FC, Scherer S. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. *Reviews of Infectious Diseases* 1990;12: 258-266.
 22. Magee BB, D'Souza TM, Magee PT. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *Journal Clinical Microbiology* 1987;169:1639-1640.
 23. Vasquez JA, Beckley A, Sobel JD, Zervos MJ. Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsedfield gradient gel electrophoresis as a typing system for *Candida albicans*. *Journal Clinical Microbiology* 1991;29:962-967.
 24. Powderly WG, Robinson K, Keath, EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. *Journal of Infectious Diseases* 1993; 168:463-466.
 25. Mercure S, Poirier S, Lemay G, Auger P, Montplaisir S, de Repentigny, L. Application of biotyping and DNA typing of *Candida albicans* to the epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Journal of Infectious Diseases* 1993;168:502-507.
 26. Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Durussel C, Addo M, Pagani JL, Chave JP, Bille J. Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. *Journal Clinical Microbiology* 1995;33:1129-1135.
 27. Scherer S, Stevens DA. A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1452-1456.
 28. McCullough M, Ross B, Reade PC. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Journal Clinical Microbiology* 1995;33:696-700.
 29. Hellstein J, Vawter-Hugart H, Fotos P, Schmid J, Soll DR. Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. *Journal Clinical Microbiology* 1993;31:3190-3199.
 30. Schmid J, Rotman M, Reed B, Pierson CL, Soll DR. Genetic similarity of *Candida albicans* strains from vaginitis patients and their partners. *Journal Clinical Microbiology* 1993;31:39-46.
 31. Schmid J, Odds FC, Wiselka MJ, Nicholson KG, Soll DR. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. *Journal Clinical Microbiology* 1992;30:935-941.
 32. Lischewski A, Ruhnke M, Tennagen I, Schönan G, Morschhäuser J, Hacker J. Molecular epidemiology of *Candida* isolates from AIDS patients showing different fluconazole resistance profiles. *Journal Clinical Microbiology* 1995;33:769-771.
 33. Merz WG, Connelly C, Hieter P. Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal Clinical Microbiology* 1988;26:842-845.
 34. Lupetti A, Guzzi G, Paladini A, Swart K, Campa M, Senesi S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that

- with healthy carriers. *Journal Clinical Microbiology* 1995;33:1238-1242.
35. Barton RC, van Belkum A, Scherer S. Stability of Karyotype in serial isolates of *Candida albicans* from neutropenic patients. *Journal Clinical Microbiology* 1995;33:794-796.
 36. Matthews R, Burnie J. Assessment of DNA fingerprinting for rapid identification of outbreaks of systemic candidiasis. *British Medical Journal* 1989;298:354-357.
 37. Pingoud A, Alves S, Geiger R. Restriction enzymes. En: Burrell MM, ed. *Methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1993: 107-200.
 38. Odds FC, Auger P, Krough P, Neely AN, Segal E. Biotyping of *Candida albicans*: Results of an International collaborative survey. *Journal Clinical Microbiology* 1989;27:1506-1509.
 39. Vásquez JA, Sánchez V, Dmuchowski C, Dembry LM, Sobel JD, Zervos MJ. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: An epidemiologic study. *Journal of Infectious Diseases* 1993;168:195-201.
 40. Restrepo A. Candidiasis (Candidosis). En: Vélez H, Borrero J, Restrepo J, Rojas W, eds. *Fundamentos de Medicina. Enfermedades Infecciosas*. 4ª ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas, 1991.
 41. Magee PT, Bowdin L, Staudinger F. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *Journal Clinical Microbiology* 1992;30: 2674-2679.
 42. Schmid J, Voss E, Soll DR. Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. *Journal Clinical Microbiology* 1990;28:1236-1243.
 43. Betremieux P, Chevrier S, Quindos G, Sullivan D, Polonelli L, Guiguen C. Use of DNA fingerprinting and biotyping methods to study a *Candida albicans* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1994;13:899-905.
 44. Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP. Evidence of nosocomial spread of *Candida albicans* causing bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. *Diagn Microbiology of Infectious Diseases* 1995;21:191-194.
 45. Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari B. Molecular identification of *Candida albicans*. *Journal of Medical Veterinary Mycology* 1995;33:205-207.
 46. Pfaller MA. The use of molecular techniques for epidemiologic typing of *Candida* species. En: Borgers M, Hay R, Rinaldy MG, eds. *Current Topics in Medical Mycology*. Vol. 4. New York: Springer-Verlag, 1992:43-44.
 47. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 48. Magee BB. Formation of *Candida albicans* spheroplast. En: Maresca B, y Kobayashi GS, eds. *Molecular Biology of pathogenic fungi, a laboratory manual*, 2ª ed. Nueva York: Telos Press, 1994:113-115.
 49. Davis L, Kuehl M, Battey J. *Basic methods in molecular biology*, 2ª ed. Norwalk: Appleton and Lange, 1994.
 50. Clemons LV, Shankland GS, Richardson MD, Stevens, DA. Epidemiologic study by DNA typing of a *Candida albicans* outbreak in heroin addicts. *Journal Clinical Microbiology* 1991;29:205-207.
 51. Doebbeling BN, Hollis RJ, Isenberg, HD, Wenzel, RP, Pfaller MA. Restriction fragment analysis of a *Candida tropicalis* outbreak of sternal wound infections. *J Clin Microbiol* 1991;29:1268-1270.
 52. Niesters HGM, Goessens WHF, Meiss JFMG, Quint WGV. Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1993;31:904-910.
 53. Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, Smith J, Farinacci G, Fothergill AW, Rinaldi MG. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1994;32:59-64.
 54. Lehmann PF, Ling D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1992;30:3249-3254.
 55. Voss A, Pfaller MA, Hollis RJ, Rhine-Chalberg J, Doebbeling BN. Investigation of *Candida albicans* transmission in a surgical intensive care unit cluster using genomic DNA typing methods. *J Clin Microbiol* 1995;33:576-580.