

Colonización por levaduras en piel sana de recién nacidos

Yeast Colonization on Healthy Skin in Newborns

Mesa C., Luz¹; González-Morán, Evelyn¹;
Rodríguez-Valero, Sofía¹; Robertiz, Sandra¹;
Urdaneta, Octoban¹; Calvo M., Belinda²;
Silva, Egny¹ y Villalobos, Rafael²

¹Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. ²Cátedra de Medicina Tropical, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Resumen

En el niño recién nacido la colonización por especies de levaduras puede ser el precursor de una infección clínica. En esta investigación se evaluó la colonización por levaduras en piel de neonatos nacidos a término en las primeras 48 horas del nacimiento. Las muestras de piel, de 100 niños, se tomaron de diferentes regiones anatómicas. Se empleó el método de la impronta con cinta plástica transparente. Se realizó un examen directo con azul de metileno (0,25%) y se cultivó en los medios Sabouraud Dextrosa Agar y Dixon con antibióticos. La identificación de los aislados se hizo según metodología clásica. Los resultados indican que los neonatos presentaron una colonización por levaduras en un 45%. Se observó una colonización baja por *Malassezia furfur* (5%) y el predominio de *Candida parapsilosis* (87,9%). Esta especie de *Candida* fue aislada en un 54,2% cuando el nacimiento fue por cesárea y, 33,7% cuando fue por parto. El alto porcentaje de colonización por *C. parapsilosis* tanto en los niños nacidos por parto como por cesárea podría deberse a la transmisión horizontal a partir de las manos del personal de salud que los atiende.

Palabras clave: Colonización, piel sana, recién nacidos, *Candida*, *Malassezia*.

Abstract

In the newborn, colonization by yeast species may be the precursor for a clinical infection. This study assessed yeast colonization on the skin of term infants during the first 48 hours after birth. Skin samples of 100 children were taken from different anatomical regions. The stamp method with transparent plastic tape was used. A direct test with methylene blue (0.25%) was made and cultured in Sabouraud dextrose agar and Dixon media with antibiotics. Isolates were identified according to classic methodology. Results indicate that 45% of the newborns had yeast colonies. Low colonization by *Malassezia furfur* (5%) and the predominance of *Candida parapsilosis* (87.9%) were observed. This species of *Candida* was isolated in 54.2% of births by caesarean section and 33.7% of natural births. The high rate of colonization by *C. parapsilosis* in children born by caesarean as well as normal delivery could be due to horizontal transmission from the hands of health workers taking care of them.

Key words: Colonization, healthy skin, newborn, *Candida*, *Malassezia*.

Introducción

En el recién nacido a término la epidermis y la dermis se encuentran bien desarrolladas. La dermis es más delgada que en el adulto, con fibras de colágeno más pequeñas y fibras elásticas inmaduras. Las características funcionales como la permeabilidad, termorregulación, resistencia mecánica y protección contra agentes externos, varían mucho durante las dos primeras semanas.

Al nacer la piel es estéril, pero al final de la primera semana de vida se coloniza con microorganismos no patógenos (1), a las seis semanas el número total de organismos es comparable al observado en los adultos (2). La colonización fúngica está representada por levaduras no lipofílicas (Especies de *Candida*) y levaduras lipofílicas (Especies de *Malassezia*) (3). La colonización por *Candida* en la piel, tracto gastrointestinal y tracto respiratorio de los neonatos, lo cual ocurre en las primeras horas de vida (4), es el primer paso en la patogénesis de Candidiasis. Especies de *Malassezia* están asociadas a la pustulosis cefálica en neonatos sanos (5).

Candida albicans es comúnmente aislada en infantes colonizados o infectados, sin embargo, en los últimos años colonizaciones

o infecciones con otras especies de *Candida* han aumentado, especialmente en neonatos pretérminos (6).

El propósito de esta investigación fue determinar la colonización por especies de levaduras en la piel de neonatos a término nacidos en el Hospital Central "Dr Urquinaona", ubicado en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela, con la finalidad de determinar la prevalencia de levaduras en las primeras horas de vida.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio analítico, transversal, no experimental, en el cual se evaluaron un total de 100 neonatos, nacidos durante el lapso de Mayo a Junio de 2007, en el Hospital Central "Dr Urquinaona" de la ciudad de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Previo consentimiento de los padres y de la Coordinación del Departamento de Maternidad y bajo los lineamientos establecidos en el tratado de Vancouver, se procedió a la obtención de las muestras.

Población

Estuvo conformada por 100 neonatos, 38 del sexo masculino y 62 del femenino, sin

lesiones en la piel, con un tiempo de nacimiento hasta 48 horas.

Recolección y Procesamiento de las Muestras

Las muestras de la piel de los recién nacidos, a término, con peso adecuado para su edad gestacional, fueron recolectadas en la sala de neonatos. Se tomaron de cuero cabelludo, pabellón auricular, pecho y espalda. Se utilizó el método de la impronta con cinta plástica transparente. De cada región anatómica se obtuvo dos muestras, una se extendió sobre una lámina portaobjeto con unas gotas de azul de metileno al 0,25% y se observó al microscopio con la finalidad de apreciar las estructuras morfológicas características de levaduras (blastoconidias, de forma y tamaño variable).

Para el cultivo, las muestras se colocaron en placas de Petri con el medio Dixon Agar con cloranfenicol y Sabouraud Dextrosa Agar e incubaron a 32 °C por 7 días. Las placas que no presentaron crecimiento característico de levaduras se reportaron como negativas a los 14 días. Las colonias compatibles con *Malassezia* spp se subcultivaron en Dixon Agar con Cloranfenicol y las compatibles con *Candida* spp en Sabouraud para identificar las diferentes especies.

Identificación de los aislados

Para *Malassezia* se realizó siguiendo la metodología para la identificación de especies descritas por Guillot y colaboradores (7) y la prueba de la catalasa (8).

El estudio macro – y micro morfológico se realizó con base en la consistencia, aspecto, color de las colonias y la forma y tamaño de las blastoconidias.

Para el test de difusión en tween, se utilizó una placa de Petri con el medio Sabouraud Dextrosa Agar previamente licuado en

el cual se colocó una suspensión de la colonia a identificar. Luego que se solidificó se hicieron orificios de 3 mm, con un sacabocado, y se colocó con la ayuda de una micropipeta automática, 5µl de los tween 20, 40, 60 y 80. Se incubó en estufa a 32°C por 7 días. Se leyó como positiva la formación de un halo de opacidad alrededor de los diferentes tween. La prueba de la catalasa se realizó mediante la técnica tradicional.

A los aislados de *Candida* se le realizaron estudios morfológicos y fisiológicos: prueba de filamentización (Técnica de Dalmau) en Crema de Arroz Tween 80 Agar, fermentación de azúcares por la técnica de Wickerham (Glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa (2%), rafinosa (4%) y asimilación de carbohidratos por la técnica auxonográfica en placa (glucosa, celobiosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, sorbosa, eritritol, trehalosa, rafinosa, inositol, xilosa, melibiosa, melezitosa, ramnosa, manitol) según metodología tradicional (9).

Análisis Estadístico

Los resultados se presentaron como frecuencias absolutas y relativas. Para identificar las diferencias estadísticas en las variables estudiadas se practicaron el análisis porcentual y la prueba del Chi cuadrado. Se tomó el 95% como índice de confiabilidad estadística ($P < 0,05$).

Resultados

De un total de 100 neonatos estudiados, 45 resultaron positivos al cultivo de levaduras en piel, con un 48,4% en el sexo femenino y un 39,5% en el masculino y 55 resultaron negativos (Tabla 1). La prueba de Chi cuadrado demostró que no había diferencia significativa en la distribución de los cultivos positivos y negativos entre los grupos según el sexo.

Tabla 1. Cultivo de levaduras en piel de niños recién nacidos distribuidos según el sexo.

Cultivos de Levadura	Sexo, N°/%				Total
	Masculino		Femenino		
Positivos	15	(39,5)	30	(48,4)	45
Negativos	23	(60,5)	32	(51,6)	55
Total	38	100	62	100	100

Análisis porcentual a la última fila.

Tabla 2. Aislados de especies de *Candida* y *Malassezia* en piel de niños recién nacidos, distribuidos según el sexo y la forma de nacimiento.

Especie	Sexo /forma de Nacimiento N° (%)				Total N° (%)
	Femenino		Masculino		
	P	C	P	C	
<i>C. parapsilosis</i>	16 (17,4)	10 (10,8)	15 (16,3)	40* (43,4)	81 (87,9)
<i>C. albicans</i>	2 (2,2)	–	1 (1,1)	–	3 (3,3)
<i>C. guilliermondii</i>	–	–	–	2 (2,2)	2 (2,2)
<i>M. furfur</i>	1 (1,1)	3 (3,3)	1 (1,1)	1 (1,1)	6 (6,6)
Total	19 (20,7)	13 (14,1)	17 (18,5)	43 (46,8)	92 (100)

P: Parto C: Cesárea.

Análisis porcentual a la última fila.

$X^2 = 292,22$.

* $P < 0,005$.

La distribución de los aislados de las especies de *Candida* y *Malassezia* en la piel de los neonatos según el sexo y la forma de nacimiento, demostró un predominio de la especie *C. parapsilosis* (87,9%) sobre las otras especies de *Candida* y *Malassezia* aisladas: *C. albicans* (3,3%), *C. guilliermondii* (2,2%) y *M. furfur* (6,6%). Este predominio se observó, particularmente en el sexo femenino y cuando el nacimiento fue por cesárea (43,4%). Los aislados de *M. furfur* se observaron predominantemente en el sexo masculino y en el nacimiento por cesárea (3-3,3%). Tabla 2. La prueba de Chi cuadrado resultó significativa.

La relación de los aislados de las especies de *Candida* y *Malassezia* en la piel de los neonatos con la forma y tiempo del naci-

miento (Tabla 3), confirmó el predominio de *C. parapsilosis* (88%) sobre las otras especies, particularmente cuando el nacimiento fue por cesárea (50-54,3%). El mayor número de aislamientos de *M. furfur* se observó después de 12 horas del nacimiento, mediante cesárea (4-4,3%). La prueba de Chi cuadrado resultó significativa, corroboró el predominio de *C. parapsilosis*, particularmente cuando el nacimiento fue por cesárea independiente del momento cuando se tomó la muestra.

La distribución de los aislados de las especies de *Candida* y *Malassezia* en piel de neonatos según la localización anatómica y el sexo (Tabla 4), mostró el predominio de *C. parapsilosis* en el sexo femenino (55-59,7%) y de *M. furfur* en el sexo masculino.

Tabla 3. Aislados de especies de *Candida* y *Malassezia* en piel de niños recién nacidos, distribuidos según la forma y el tiempo de nacimiento.

Especie	Forma de Nacimiento/ Tiempo N°(%)				Total N° (%)
	Parto		Cesarea		
	<12 H	>12H	<12 H	>12H	
<i>C. parapsilosis</i>	13 (14,1)	18 (19,6)	23 (25,0)	27 (29,3)	81 (88,0)
<i>C. albicans</i>	–	3 (3,3)	–	–	3 (3,3)
<i>C. guilliermondii</i>	–	–	2 (2,2)	–	2 (2,2)
<i>M. furfur</i>	2 (2,2)	–	–	4 (4,3)	6 (6,5)
Total	15 (6,3)	21 (22,9)	25 (27,2)	31 (33,6)	92 (100)

Análisis porcentual a la última fila.

$X^2= 219,83$.

$P<0,05$.

Tabla 4. Distribución según localización anatómica y sexo de aislados de *Candida* y *Malassezia* en piel de niños recién nacidos.

Especie	Sexo	Localización Anatómica, N°(%)				Total N° (%)
		CC	PA	PE	ESP	
<i>C. parapsilosis</i>	M	6 (6,5)	5 (5,4)	6 (6,5)	9 (9,8)	26 (28,2)
	F	16 (17,4)	13 (14,1)	12 (13,0)	14 (15,2)	55* (59,7)
<i>C. albicans</i>	M	1 (1,1)	1 (1,1)	–	–	2 (2,2)
	F	1 (1,1)	–	–	–	1 (1,1)
<i>C. guilliermondii</i>	F	1 (1,1)	1 (1,1)	–	–	2 (2,2)
<i>M. furfur</i>	M	2 (2,2)	1 (1,1)	1 (1,1)	–	4 (4,4)
	F	1 (1,1)	1 (1,1)	–	–	2 (2,2)
Total		28 (30,5)	22 (24,7)	19 (20,6)	23 (25,0)	92 (100)

CC : Cuero cabelludo; PA: Pabellón auricular; PE: Pecho; ESP: Espalda.

M: Masculino F: Femenino.

Análisis porcentual corresponde a los totales expresados en la última fila.

$X^2:=199,4$.

* $P < 0.05$.

(4-4,4%). La localización más colonizada fue el cuero cabelludo (28 -30,5%), seguida de pabellón auricular y espalda (22-24,7%). La colonización de pecho se observó en 19 aislados (20,6%). La prueba de Chi cuadrado indicó que *C. parapsilosis* fue la especie predominante, particularmente en las niñas,

sin diferencia entre los valores de los diferentes sitios estudiados.

Se debe resaltar que se aislaron más de una especie de *Candida* en dos casos: *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* en un recién nacido por cesárea y *C. albicans* y *C. parapsilosis* en un recién nacido por parto. Así mismo, en tres casos se observó *M. furfur* y *C. para-*

psilosis, dos recién nacidos por cesárea y uno por parto. De los cinco niños colonizados por *Malassezia*, en un niño se aisló la levadura en dos localizaciones.

Discusión

En el niño recién nacido la colonización por especies de levaduras puede ser el precursor de una infección clínica (10,11). La colonización y posterior infección van a depender de la exposición, tamaño del inóculo, susceptibilidad del huésped y propiedades del patógeno (12). Las células de *Candida* se adhieren preferentemente a las capas intermedias del tracto vaginal, las cuales se incrementan durante el embarazo, aumentando así la colonización materna y la exposición del infante nacido por parto (13).

En la presente investigación de 100 niños recién nacidos sanos estudiados, 45% resultaron colonizados por levaduras, a diferencia de lo reportado por Sharp y cols.

(4) quienes observaron en una unidad de cuidados intensivos, una incidencia menor (26%) en niños recién nacidos con edad gestacional mayor de 28 semanas, esta diferencia puede ser debido a la transmisión vertical en la institución evaluada. Kaufman y cols (14) reportan hasta un 60% de colonización por levaduras en neonatos préterminos. La diferencia en el porcentaje de colonización de la presente investigación y la señalada anteriormente puede ser debido a la característica de los neonatos a término de presentar una mayor madurez de su sistema inmune. La colonización en piel de neonatos por *Malassezia* ha sido reportada escasa en los primeros 10 días de nacidos, con un aumento de la incidencia a medida que transcurren los días de vida (15), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio,

donde solo se observó un 5% de colonización por *Malassezia*.

Al relacionar las especies de levaduras aisladas según el sexo y la forma de nacimiento se observa un predominio de *C. parapsilosis* (87,9%), con un 43,4% en el nacimiento por cesárea en las niñas; *C. albicans* solo se aisló en un 3,3%. Estos resultados difieren

de los hallazgos de un estudio en Venezuela (11), el cual reporta en piel un 11% de *C. parapsilosis* y un 22,45% de *C. albicans* y de una investigación en la India (16) donde observaron una colonización por *C. albicans* y *C. parapsilosis* con un 19% y 12,3% respectivamente. *M. furfur* se recuperó en seis aislados, con el mayor porcentaje (3,3%) en los neonatos nacidos por cesárea, en el sexo masculino, la baja colonización de *M. furfur* en neonatos ha sido observada (15), sin embargo se han reportado casos de pustulosis cefálica y fungemia en neonatos por esta especie (5, 17). Se conoce que la alta colonización por *Candida albicans* a partir del canal vaginal durante el embarazo condiciona a que el niño durante el pase por ese canal pueda colonizarse por contacto cutáneo, deglución o aspiración de la levaduras, por esto es que la cesárea podría considerarse como una medida preventiva para la colonización o infección. El alto porcentaje de *C. parapsilosis* en los neonatos nacidos tanto por parto o por cesárea podría deberse a la transmisión horizontal por la colonización de las manos del personal de salud que los atiende, lo cual ha sido demostrado en previas investigaciones (10, 18, 19, 20).

En relación a la distribución de las especies según la forma y las horas de nacimiento se corrobora el predominio de *C. parapsilosis* en los nacidos por cesárea, sin diferencia en las horas de nacido en que fue tomada la muestra (hasta 48 horas).

Con respecto a la distribución de los aislados según la localización anatómica y el sexo, se observó que la especie predominante *C. parapsilosis*, particularmente en las niñas, no mostró diferencias entre los sitios anatómicos estudiados. En la literatura revisada los sitios anatómicos estudiados son cavidad oral y región crural (10, 14). En relación a *Malassezia furfur*, de seis aislados obtenidos de cinco neonatos, tres correspondieron a cuero cabelludo (3,3%) a diferencia de Gupta y Kohli (21) quienes reportaron en niños y adultos, la región dorsal como el sitio anatómico más frecuente para *M. furfur*. Leeming y cols (15) en un estudio en neonatos observaron que a los 40 días de nacidos se evidenció una colonización por *M. furfur* de un 100%, en oído. Otras especies de *Malassezia*: *M. sympodialis* y *M. globosa* se han reportado en piel de neonatos con seguimiento clínico lo cual permitió la observación de pustulosis cefálica posteriormente (5). Es necesario profundizar en el conocimiento del origen de la colonización por *Malassezia*, para lo cual sería necesario incluir en las investigaciones de colonización por levaduras medios especiales para el aislamiento de especies de *Malassezia*.

En la presente investigación se observó una elevada colonización por *C. parapsilosis*, especie considerada de baja virulencia, sin embargo, en las últimas dos décadas su prevalencia ha aumentado significativamente convirtiéndose en un patógeno emergente (22). *C. parapsilosis* en ciertas condiciones (catéteres vasculares, altas concentraciones de glucosa por vía endovenosa) puede aumentar su virulencia (11) y producir diseminación, por lo tanto es necesario implementar en las salas neonatales sistemas de vigilancia epidemiológica y educación continua del personal que labora en ellas.

Referencias Bibliográficas

- (1) Evelyne Halpert Z: Dermatología Neonatal. En: Correa J, Gómez J, Posada R. Generalidades y Neonatología: Tomo 1. 2º Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 1999: 581-582.
- (2) Layden JJ. Bacteriology of newborn skin. In: Malbach H, Boisis EK eds. Neonatal skin: Structure and Function. Marcel Dekker Inc, New York. 1982: 167-181.
- (3) Noble WC. Microbiology of Human Skin. 2º ed. Lloyd Luke Medical Books. London, England; 1981.
- (4) Sharp AM, Odds FC, Evans EG. *Candida* strains from neonates in a special care baby unit. Arch Dis Child 1992; 67: 47-52.
- (5) Bernier V, Weill F, Hirigoyen V, Elleau Ch, Feyler A, Labréze Ch et al. Skin colonization by *Malassezia* species in neonates. Arch of Dermatology 2002; 138: 215-218.
- (6) 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. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 263-267.
- (7) Guillot J, Gueho E, Lissourd M, Midgley G, Ghévriér G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species: A approach. J Micol Med 1996; 6: 103-110.
- (8) Madigan MT, Martinko J, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 10 th Ed. Prentice Hall. 2004. 1104 pp.
- (9) Kurtzman C & Fell V. The yeast, A taxonomic study. 4th Ed. Elsevier Science. BV. Amsterdam; 1998:
- (10) Saiman L, Ludington E, Dawson J, Patterson J, Rangel-Frausto S, Wiblin R, et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. Pediatr Infect Dis J 2001; 20: 1119-1124.
- (11) Hartung-Capriles C, Mata-Essayag S, Azpiróz A, Ponente A, Magaldi S, Pérez C, et al. Neonatal candidiasis in Venezuela: Clinical and epidemiology aspects. Rev Lat Microbiol 2005; 47: 11-20.

- (12) Kaufman D, Fairchild K. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low birth weight infants. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 638-680.
- (13) Segal E, Soroka A, Schechter A. Correlative relationship between adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells *in vitro* and candidal vaginitis. *Sabouraudia* 1984; 22: 191-200.
- (14) Kaufman D, Boyle R, Hazen K, Patrie J, Robinson M, Godman L. Fluconazole prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. *N Eng J Med* 2001; 345:1660-1666.
- (15) Leeming J, Sutton T, Fleming P. Neonatal skin as a reservoir of *Malassezia* species. *Pediatr Infect Dis* 1995; 719-721.
- (16) Singh K, Chakrabarti A, Narang A, Gopalan S. Yeast colonization & fungemia in preterm neonates in a tertiary care centre. *Indian J Med Res* 1999; 110: 169- 73.
- (17) Wayne M D, Stephen AS, Joshua F, Charles D. *Malassezia* fungemia in neonates and adults: Complication of hyperalimentation. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 743-753.
- (18) Silva V, Zepeda G, Rybak M, Febré N. Portación de levaduras en manos de Estudiantes de Medicina. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 41-45.
- (19) Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I et al. Horizontal transmisión of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal Intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2363-2369.
- (20) Orozco P, Cortés J, Parra. Colonization by yeasts in newborns and healthcare personnel in a neonatal intensive care unit a university hospital in Bogotá, Colombia. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26: 108-111.
- (21) Gupta A, Kohli Y. Prevalence of *Malassezia* on various body sites in clinically Healthy individuals subjects representing different age groups. *Med Mycol* 2004; 45: 35-42.
- (22) Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungi Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 606-625.