

# Biofilm Formation by Candida Species and its Effect on their Resistance to Antifungal Therapy in Ain Shams pediatric ICU

*Thesis*

*Submitted for Partial Fulfillment of Master Degree in  
Pediatrics*

**By**

**Anas Hassan Abd-Elwahab**

*M.B.B. Ch, (2002)*

**Under Supervision of**

**Professor Doctor. Hanan Mohamed Ibrahim**

*Professor of Pediatrics*

*Faculty of Medicine-Ain Shams University*

**Doctor. Asmaa El-Huseiny Ahmed**

*Lecturer of Pediatrics*

*Faculty of Medicine-Ain Shams University*

**Doctor. Shereen Bendary El-Sayied**

*Ass. Professor of Medical Microbiology and Immunology*

*Faculty of Medicine Ain Shams University*

**Faculty of Medicine  
Ain Shams University  
2010**

تأثير الغشاء الحيوى المكون بواسطة فطر  
الكانديدا على مقاومته لمضادات الفطريات  
(دراسة فى الرعاية المركزة للأطفال بمستشفى  
عين شمس الجامعى)

توطئة للحصول على درجة الماجستير فى طب الأطفال

مقدمه من:

الطبيب/أنس حسن عبد الوهاب  
بكالوريوس الطب والجراحة - جامعة عين شمس (٢٠٠٢)

تحت إشراف

الأستاذة الدكتورة/ حنان محمد إبراهيم

أستاذ طب الأطفال  
كلية الطب - جامعة عين شمس

الدكتورة/ أسماء الحسينى أحمد

مدرس طب الأطفال  
كلية الطب - جامعة عين شمس

الدكتورة/ شيرين بندارى السيد

أستاذ مساعد الميكروبيولوجى الطبية والمناعة  
كلية الطب - جامعة عين شمس

كلية الطب

جامعة عين شمس

٢٠١٠

---

## Contents

---

	<i>Page</i>
<b>List of Abbreviations</b> .....	i
<b>List of Tables</b> .....	ii
<b>List of Figures</b> .....	iii
<b>Introduction and Aim of the Work</b> .....	1
<b>Review of Literature</b> .....	3
* Critically ill child .....	3
* Fungal Infections in PICU .....	17
* Virulence Factors of Candida and Its Antifungal Resistance .....	28
<b>Subjects and Methods</b> .....	50
<b>Results</b> .....	57
<b>Discussion</b> .....	83
<b>Summary</b> .....	91
<b>Conclusion</b> .....	94
<b>Recommendations</b> .....	95
<b>References</b> .....	96
<b>Arabic Summary</b> .....	--

## List of Tables

<i>Table</i>	<i>Subject</i>	<i>Page</i>
<b>Tables of Review of Literature</b>		
1	Common conditions presenting as cardiopulmonary failure	4
2	Criteria for PICU and PIICU admission	7
3	Vital signs at various ages	8
4	Child's Glasgow coma scale	12
5	Clinical staging of encephalopathy	13
6	Verbal responses of pediatric scales	16
<b>Tables of Results</b>		
1	Distribution of studied cases as regards general data	57
2	Distribution of the studied cases as regards causes of admission to PICU	57
3	Distribution of the studied cases as regards type of treatment	58
4	Distribution of the studied cases as regards invasive maneuvers performed	59
5	Distribution of the studied cases as regards laboratory data	59
6	Distribution of the studied cases as regards predicted death rate according to PRISM and the real outcome	60
7	Mortality rate in relation to the cause of admission to ICU	61
8	Frequency of colonization of different Isolates of candida (D0)	61
9	Frequency of acquisition of different Isolates of candida (D3)	62
10	Frequency of biofilm forming at D0 and D3 between all isolates	63
11	Sensitivity of different isolates to different antifungal drugs	63

## List of Tables (Cont.)

<i>Table</i>	<i>Subject</i>	<i>Page</i>
12	Death rate in colonizing candida isolates(at D0)	64
13	Death rate due to different acquired candida Isolates (at day3)	65
14	Death rate due to biofilm former isolates at D0	66
15	Death rate due to biofilm former isolates at D3	66
16	Comparison between frequency of biofilm formation in different candida Isolates (D0)	68
17	Comparison between Frequency of biofilm formation in different Candida Isolates (D3)	69
18	Comparison between sensitivity of different Candida Isolates to Amphoterecin-B at D0	70
19	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to Itraconazole at D0	70
20	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to ketoconazole at D0	71
21	Comparison between sensitivity of different Isolates to fluconazole at D0	71
22	Comparison between sensitivity of different Isolates to flucytosine at D0	72
23	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to nystatin at D0	72
24	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to clotrimazole at D0	73
25	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to voriconazole at D0	73
26	Comparison between sensitivity to different antifungal drugs between biofilm former Isolates at D0	74
27	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to amphotericin-B at D3	76

### List of Tables (Cont.)

<i>Table</i>	<i>Subject</i>	<i>Page</i>
28	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to itraconazole at D3	76
29	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to ketoconazole at D3	77
30	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to fluconazole at D3	77
31	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to flucytosine at D3	78
32	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to nystatin at D3	78
33	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to clotrimazole at D3	79
34	Comparison between sensitivity of different candida Isolates to voriconazole at D3	79
35	Comparison between sensitivity to different antifungal drugs between biofilm formers at D3	80

## List of Figures

<i>Fig.</i>	<i>Subject</i>	<i>Page</i>
	<b>Figures of Review</b>	
1	Pathway of deterioration in critical illness.	5
2	Superficial mucocutaneous candidiasis	21
3	Histology of oesophageal candidiasis	22
5	Conidial head of <i>Aspergillus niger</i>	26
6	Candida albicans without biofilm	31
7	Candida albicans with biofilm	31
	<b>Figures of Results</b>	
1	Distribution of the studied cases as regards causes of admission to PICU.	58
2	Mortality percent by different candida isolates at D0 shows highest mortality by C.glabrata and C.tropicalis	64
3	Mortality percent by different candida isolates at D3	65
4	Comparison between Fatality in BF isolates at D0 and at D3	67
5	Comparison of ability of different candida isolates to form biofilm at D0	68
6	Comparison of ability of different candida isolates to form biofilm at D3	69
7	Comparison between resistance of BF isolates on different antifungal drugs at D0	75
8	Comparison between resistance of BF isolates on different antifungal drugs at D3	81
9	Comparison of effectiveness of different antifungal drugs on total BF isolates	82

## الملخص العربي

إن حدوث العدوى الفطرية في مرضى الحالات الحرجة ازدادت بشكل ملحوظ في العقود الأخيرة، ومعظم هذه العدوى نتيجة الإصابة بفطر الكانديدا بالتحديد، حيث أن هذا النوع يمتلك عامل خطورة مهم (عامل الالتصاق) وهو القدرة علي تكوين أغشية حيوية، وقد ثبت أن وجود فطر الكانديدا بالأغشية الحيوية هذه يجعله أكثر مقاومة لمضادات الفطريات أكثر من غيره.

وفي هذه الدراسة كان هدفنا هو قياس قدرة العينات الإكلينيكية لمختلف أنواع فطر الكانديدا لتكوين غشاء حيوي في الأنابيب داخل المعمل، ومقارنة مقاومة مضادات الفطريات بواسطة الكانديدا ذات الغشاء الحيوي والأخرى من غير هذا الغشاء.

وتم عمل هذه الدراسة علي المرضى المحجوزين في الرعاية المركزة للأطفال بمستشفى عين شمس الجامعي.

تم إجراء هذه الدراسة علي (٥٠) حالة حرجة تم حجزهم بالرعاية المركزية للأطفال من يوليو ٢٠٠٩م وحتى شهر ديسمبر ٢٠٠٩م وقد تم الكشف علي الحالات وأخذ العينات منهم مرة عند دخولهم الرعاية ومرة أخرى في اليوم الثالث لهم بالرعاية المركزة.

وقد خضع كل هؤلاء المرضى لعمل الاتي:

- تسجيل بياناتهم وفحصهم إكلينيكيًا.
- قياس معدل احتمالية الوفاة للأطفال (PRISM).
- تسجيل القياسات المعملية الخاصة بالحالات المسجلة في تذاكر الدخول وتم جمع العينات ومتابعة الحالات وتسجيل مصير كل منهم سواء تحسن وخروج أو وفاة.



\*تم أخذ العينات من الأماكن الآتية (البلعوم الفموي، الإبط، المستقيم) وتم زرعها في مادة (SDA).

وتم عمل الآتي لكل عينة:

- فحص مباشر، زرع، عزل، اختبارات تعرف علي الكانديدا المختلفة.
- اختبار حساسية ومقاومة مختلف العينات لمضادات الفطريات مرتين.

**المرّة الأولى:** بطريقة (MIC).

**المرّة الثانية:** بعد تحفيز الكانديدا لتكوين أغشية حيوية بطريقة (MIBC)

وظهرت نتائج هذه الدراسة كالتالي:

- ٧٠% من مرضانا قد أصيبوا بالكانديدا قبل دخول الرعاية المركزة.
- إن جميع أنواع الكانديدا لها قدرة كبيرة علي تكوين أغشية حيوية وأكثرهم كانت *C. Tropicalis* , *C. Parapsilosis* *C. Krusi*.
- إن تكوين الأغشية الحيوية ارتفع داخل الرعاية المركزة وإن معدل الوفيات ارتفع بين الإصابات بالكانديدا ذات الأغشية الحيوية (٦٥%).
- بالنسبة للحساسية لمضادات الفطريات وجدنا أنه الفوريكونازول كان الأكثر تأثيراً علي كل العينات بنسبة ١٠٠% (المكونة للأغشية الحيوية والأخرى الغير مكونة).
- الأمفوتيريسين ب والفلويسيتوسين يليما الفوريكونازول في التأثير علي عينات الكانديدا ذات الأغشية الحيوية.
- ولكن الأزولات القديمة (الفلوكونازول ، الإتراكونازول، الكلوتريمازول ، الكيتوكونازول) كانوا أقل تأثيراً علي الكانديدا ذات الأغشية الحيوية.
- وأخيراً النيستاتين لم يكن له أي تأثير علي الكانديدا ذات الأغشية الحيوية.
- وإنه لمن الواضح في دراستنا هذه أن الكانديدا ذات الأغشية الحيوية أكثر مقاومة لمضادات الفطريات من غيرها.

وأخيرا نوصى بالآتى:

- \_ عمل دراسات تشمل أعداد أكثر من عينات الكانديدا لتقييم الاختلاف فى تأثير مضادات الفطريات على الكانديدا المكونة للأغشية الحيوية والأخرى الغير مكونة.
- \_ ننصح عند طلب مزرعة و حساسية للكانديدا ان تكون بطريقة MIBC .
- \_ نوصى باستخدام الفوريكونازول لحين ظهور نتيجة المزرعة.

## **Introduction**

The incidence of nosocomial infection by candida has surged over the past decade, from the eighth to the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infections in the general hospitals population (*Playford, 2006*).

Many candida Spp. Produce surface-adherent biofilm populations that are resistant to antifungal compounds and other environmental stresses (*Harrison et al., 2007*).

Biofilms are microbial communities that are associated with solid surfaces such as intravascular Catheters, Candida species are a major cause of medical device – associated infections.

Twenty percent to 70% of all candidemias are associated with this biofilms process (*Nett et al., 2007*).

Usage of bio-prostheses such as IV lines and urinary catheters provide ample opportunity for candida biofilms to set up nidus for disease that is not easily amenable to conventional antifungal therapy (*Kumar CP and Menon T, 2006*).

In the recent years, there has been a marked increase in the incidence of treatment failures in Candidiasis patients receiving long-term antifungal therapy, which has posed a serious problem in its successful use in chemotherapy, Biofilm associated candida show uniform resistance to a wide spectrum of antifungal drugs (*Mishra et al., 2007*).

## **Hypothesis**

Colonizing candidal strains in pediatric ICU patients that can form biofilm need high concentration of antifungal drugs to be eradicated.

## **Aim of the Work**

The aim of the work is to study the ability of clinical isolates of candida Spp. To form biofilms in vitro and to compare the antifungal susceptibility of sessile cells and their planktonic counterparts in patients admitted in pediatric ICU in Ain Shams University Hospitals.

## **Critically Ill Child**

### **Historical review:**

The first pediatric ICU was established in Europe by Goran Haglund in 1955 at Children's Hospital of Goteburg in Sweden, 10 years before the unit at Children's Hospital of the District of Columbia developed by Cheston Berlin. John Downes opened the *next* recorded pediatric ICU at Children's Hospital of Philadelphia in 1967 (*Downes, 1992*).

Over the next 40 years, hundreds of pediatric ICUs would be established in academic institutions, children's hospitals, and many community hospitals throughout North America and Europe identified 306 general pediatric ICUs in the United States in 1995 and 349 in 2001 (*Randolph et al., 2004*).

### **Introduction:**

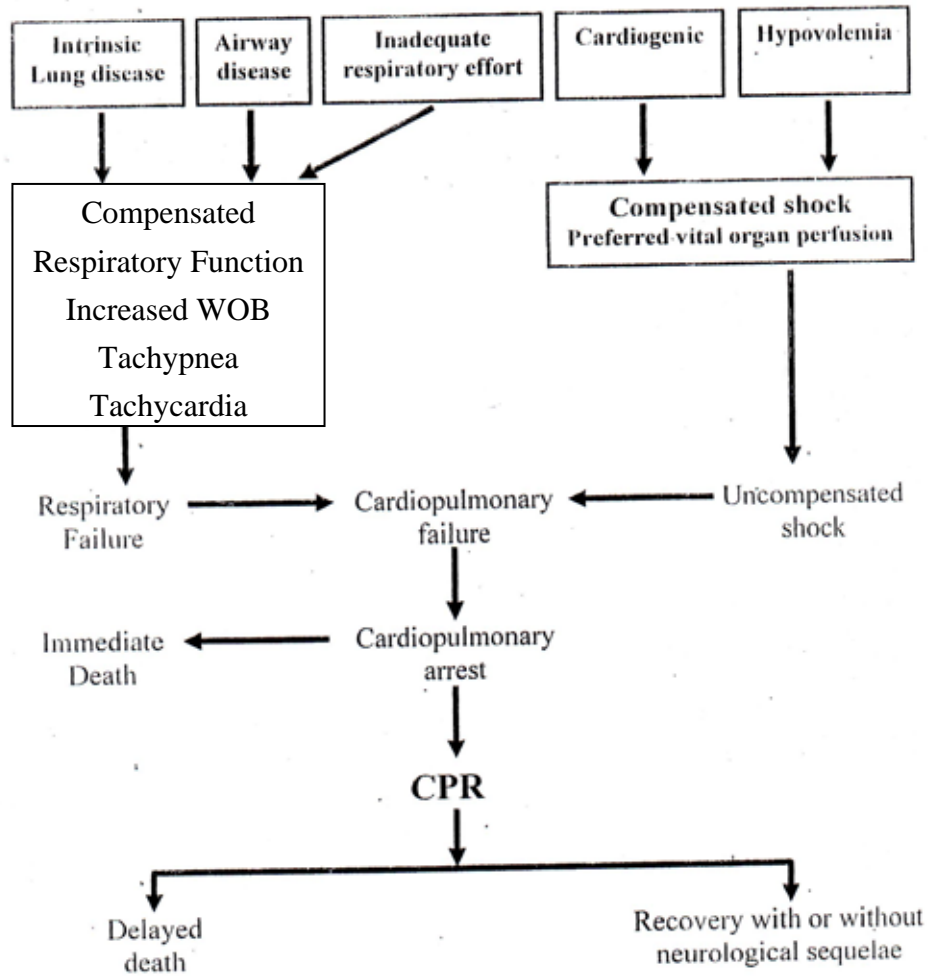
Patients requiring intensive care usually require support for hemodynamic instability (hypertension/hypotension), airway or respiratory compromise (such as ventilator support), acute renal failure, potentially lethal cardiac dysrhythmias, and frequently the cumulative effects of multiple organ system failure. Patients admitted to the intensive care unit not requiring support for the above are usually admitted for intensive/invasive monitoring (*Kahn et al., 2006*).

A common denominator of critical illness in children is cardiopulmonary compromise, this typically occurs as a result of Progressive deterioration of respiratory and circulatory function during the course of various diseases as outlined in (Fig. 1) and (Table 1) (*Chameides, 1990*).

**Table (1):** Common conditions presenting as cardiopulmonary failure

<b>1- Intrinsic lung diseases</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Pneumonia</li><li>-Adult respiratory distress syndrome</li><li>- Loss of lung volume</li><li>- Pleural effusion</li><li>- Pneumothorax</li></ul> <b>2- Airway diseases</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Bronchiolitis</li><li>- Acute severe bronchial asthma</li><li>- Laryngotracheobronchitis</li><li>- Epiglottitis</li><li>- Foreign body aspiration</li></ul> <b>3- Inadequate respiratory effort</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Sepsis</li><li>- Severe trauma</li><li>- Poisoning</li><li>- Guillain-Barre syndrome</li><li>- Poliomyelitis</li></ul>	<b>4- Cardiogenic shock</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Myocarditis</li><li>-Congenital heart disease</li><li>- Cardiac tamponade</li></ul> <b>5- Hypovolemia</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Burns</li><li>- Diabetic ketoacidosis</li><li>- Hemorrhage</li><li>- Gastrointestinal losses</li></ul>
---	--

*(Chameides, 1990)*



**Fig.(1):**Pathway of deterioration in critical illness.  
Common diseases in groups 1 through 5 lined in table (1).

WOB: Work of breathing (*Chameides, 1990*).

Unlike pediatric patients who require general care, these patients usually have a disease process that affects more than one organ system, commonly referred to as multiple organ system failure (MOSF) or dysfunction (MOSD). Successful PICUs use a multidisciplinary approach to care for these patients (*Frankel, 2004*).