

# Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais\*

## *Identification of Candida species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with superficial candidiasis*\*

Elisete I. Crocco<sup>1</sup>  
Valéria M. Souza<sup>5</sup>

Lycia M. J. Mimica<sup>2</sup>  
Lígia R. B. Ruiz<sup>6</sup>

Laura H. Muramatu<sup>3</sup>  
Clarisse Zaitz<sup>7</sup>

Cristina Garcia<sup>4</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTO – Leveduras do gênero *Candida* determinam colonização, infecções superficiais e infecções sistêmicas em imunodeprimidos. As várias apresentações da doença levam à necessidade de utilizar diferentes métodos diagnósticos e tratamentos.

OBJETIVOS – Diferenciar as espécies de *Candida* e correlacioná-las com as regiões anatômicas. Avaliar a susceptibilidade a cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B.

MÉTODOS – Foram avaliados 100 pacientes imunocompetentes com candidíase cutânea ou mucosa atendidos na Santa Casa de S. Paulo entre maio de 1999 e julho de 2001. Correlacionou-se a região acometida e a espécie de *Candida*, isolada através técnica CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>. Avaliou-se a susceptibilidade das espécies a cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B, através do Etest<sup>®</sup>.

RESULTADOS – *C. albicans* foi isolada em 76,0% dos materiais, *C. krusei* em 19% e *C. tropicalis* em 1%. Não houve correlação significativa entre a região acometida e as espécies. A maioria das amostras mostrou susceptibilidade aos antifúngicos.

CONCLUSÃO – *C. albicans* foi a espécie mais observada. A maioria das amostras de *Candida* mostrou-se susceptível aos antifúngicos.

Descritores: *Candida albicans*; *Candida tropicalis*; Candidíase cutânea; Itraconazol.

**Abstract:** BACKGROUND – Yeasts of the genus *Candida* create colonization, superficial infections and systemic infections in immunodeficient individuals. The presentations of the disease lead to the necessity of using various diagnostic methods and treatments.

OBJECTIVES – To differentiate among the *Candida* species, correlate them with the anatomical region involved and evaluate *in vitro* susceptibility to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B.

METHODS – An evaluation of 100 cases of immunocompetent patients with cutaneous or mucous candidiasis attended at the Santa Casa de Sao Paulo Hospital from May 1999 to July 2001. This study attempted to correlate the site of the involvement and the *Candida* species, isolated using the CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> technique. The species were evaluated using the Etest<sup>®</sup> antifungal susceptibility to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B.

RESULTS – *C. albicans* was isolated in 76% of the material, *C. krusei* in 19% and *C. tropicalis* in 1%. It was not possible to establish a significant correlation between the involved area and the species isolated. Most of the samples proved to be susceptible to the antifungals tested.

CONCLUSIONS – *C. albicans* was the most commonly observed species. The majority of samples presented susceptibility to the tested antifungals.

Key-words: *Candida albicans*; *Candida tropicalis*; *Candidiasis*, Cutaneous; Itraconazole.

Recebido em 27.01.2004. / Received on January 27, 2004.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 30.10.2004. / Approved by the Consultive Council and accepted for publication on October 30, 2004.

\* Trabalho realizado no Hospital Central da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – Projeto financiado pela Fapesp. Processo 99/06792-7 – Outubro de 1999 a setembro de 2001. Work performed at the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital - Project financed by FAPESP. No. 99/06792-7 – October 1999 to September 2001.

<sup>1</sup> Médica em especialização em Dermatologia pela Clínica de Dermatologia – Departamento de Medicina – Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / M.D., received dermatology specialization from the Dermatology Clinic, Department of Medicine, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital

<sup>2</sup> Professora assistente do Serviço de Microbiologia – Departamento de Patologia – Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / Assistant Professor, Microbiology Service, Department of Pathology, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital

<sup>3</sup> Biomédica da Clínica de Dermatologia – Departamento de Medicina – Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / M.D., Dermatology Clinic, Department of Medicine, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital

<sup>4</sup> Biomédica do Serviço de Microbiologia – Departamento de Patologia – Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / M.D., Microbiology Service, Department of Pathology, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital

<sup>5</sup> Médica assistente do setor de doenças infecciosas da Clínica de Dermatologia - Departamento de Medicina - Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / Assistant M.D., Infectious Diseases sector, Dermatology Clinic, Department of Medicine, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital.

<sup>6</sup> Médica voluntária do setor de doenças infecciosas da Clínica de Dermatologia – Departamento de Medicina – Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / Volunteer M.D., Infectious Diseases sector, Dermatology Clinic, Department of Medicine, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital.

<sup>7</sup> Professora adjunta responsável pelo setor de doenças infecciosas da Clínica de Dermatologia – Departamento de Medicina – Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / Adjunct Professor, Head of the Infectious Diseases sector of the Dermatology Clinic, Department of Medicine, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital

©2004 by Anais Brasileiros de Dermatologia

## INTRODUÇÃO

A candidíase expressa a variedade de relações que ocorrem entre hospedeiro e microbiota autóctone, isto é, do comensalismo à doença sistêmica fatal.<sup>1</sup> Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela colonização, por infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos. A variedade de apresentações da doença leva à necessidade de utilização de diferentes métodos diagnósticos e esquemas terapêuticos.

*Candida albicans* é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe, porém as espécies não *albicans* têm aumentado em número e em importância nas candidíases vaginal e sistêmica.<sup>2</sup>

A variabilidade de comportamento das diferentes espécies de *Candida* criou a necessidade de desenvolvimento de métodos rápidos e fáceis para sua identificação. O Chromagar *Candida*<sup>®</sup> mostrou-se método sensível além de específico para identificação presuntiva das espécies mais comumente isoladas de leveduras do gênero *Candida*.<sup>3,4,5</sup>

Muitas das espécies não *albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável e previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral. Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade. O esforço para a padronização desses testes culminou na elaboração da metodologia M27-A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).<sup>2,6</sup>

Etest<sup>®</sup>, utilizado para aferir *in vitro* a susceptibilidade aos antifúngicos, é método comparável ao M27-A do NCCLS, porém mais simples e de fácil incorporação à rotina laboratorial.<sup>4,7,8,9</sup>

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 100 pacientes com infecções cutâneas ou mucosas causadas por leveduras do gênero *Candida*, atendidos no Ambulatório da Clínica de Dermatologia ou internados nas Enfermarias de Medicina da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, no período de maio de 1999 a julho de 2001.

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, de qualquer raça e de todas as faixas etárias que tiveram leveduras do gênero *Candida* recuperadas de suas lesões. Não foram incluídos pacientes com qualquer tipo de imunodepressão ou com infecções mistas ao exame direto. Os pacientes incluídos no estudo foram agrupados conforme as regiões acometidas pelas lesões.

Firmou-se o diagnóstico de candidíase mediante exame direto clarificado com hidróxido de potassa a 20% em solução aquosa de DMSO, por visualização de leveduras e/ou pelo menos dois crescimentos, ou seja, duas sementeiras do mesmo material, em culturas realizadas em meio de ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol.<sup>1,10</sup>

## INTRODUCTION

*Candidiasis* expresses the variety of relations occurring between the host and autochthonous microbiota, that is, of a commensalism to fatal systemic disease.<sup>1</sup> Colonization by yeasts of the genus *Candida* are responsible for superficial fungal infections in specific immunocompetent patients, and systemic infections in immunodeficient patients. A variety of presentations of the disease leads to the necessity of using different diagnostic methods and therapeutic schemes.

*Candida albicans* is the most common pathogen among cutaneous candidiasis and of the oropharynx. However, non *albicans* species have increased in number and importance in vaginal and systemic candidiasis.<sup>2</sup>

The behavior variability of the different *Candida* species prompted the need to develop fast and easy methods for identifying them. The CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> technique proved to be a sensitive method in addition to an accurate one for presumptive identification of more commonly isolated yeast species of the genus *Candida*.<sup>3,4,5</sup>

Many of the most commonly isolated non *albicans* species are less susceptible to azolic derivatives, which makes treating these infections harder. While susceptibility of yeasts of the genus *Candida* to available antifungals is variable and predictable, a specifically determined isolated sample does not always end up following the general pattern. This is one of the reasons for the growing importance of susceptibility testing. The effort to standardize these tests has culminated in the elaboration of M27-A methodology by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).<sup>2,6</sup>

Etest<sup>®</sup> is used to gauge *in vitro* susceptibility to antifungals. It is comparable as a method to the NCCLS M27-A. However, it is simpler and easier to incorporate into the laboratory routine.<sup>4,7,8,9</sup>

## MATERIAL AND METHODS

One hundred patients with cutaneous or mucous infections caused by yeasts of the genus *Candida* were assessed and attended to at the Ambulatory Clinic of Dermatology, or hospitalized at the Medicine Infirmaries of the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital, from May 1999 to July 2001.

Patients with yeasts of the genus *Candida* traced in their lesions, from either of the sexes, and from all races and all ages, were included. Patients were not included if they were immunodeficient in any way or had mixed infections spotted in the direct examination. The patients included in the study were grouped together according to the anatomical region of lesions involved.

The diagnosis of candidiasis was confirmed by means of a direct examination clarified with potassium hydroxide (20%) in aqueous DMSO solution, either by visualizing the yeasts and/or at least two growths, that is two sowings of the same material, in cultures done in Sabouraud agar dextrose to which chloramphenicol was added.<sup>1,10</sup>

Para a identificação das espécies de levedura do gênero *Candida* isoladas utilizaram-se placas com meio cromogênico – Chromagar *Candida*<sup>®</sup>, (Probac do Brasil<sup>®</sup>, São Paulo). Após semeadura da cepa nesse meio há alteração da coloração da colônia dependendo da espécie de *Candida* isolada. Após 48 horas de incubação a 30-37°C, é possível a identificação de: *Candida albicans*, que se torna esverdeada, *Candida krusei*, rósea, *Candida tropicalis*, azul-acinzentada, e as demais espécies, róseo-esbranquiçadas (Figura 1).<sup>10</sup>

As espécies isoladas foram agrupadas, procurando-se correlacioná-las com a região acometida. Para avaliar a susceptibilidade *in vitro* das espécies isoladas foi utilizado o Etest<sup>®</sup> (AB Biodisk, Solna, Suécia<sup>®</sup>), método com gradiente predefinido de concentração para cetoconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B, determinando a concentração inibitória mínima (MIC) em µg/ml para cada antifúngico. Nesse método as colônias são semeadas em RPMI<sup>®</sup> (Probac do Brasil<sup>®</sup>, São Paulo), um meio composto por meio RPMI 1640, Mops, e 2% de ágar glicose (Figura 2).<sup>11</sup> As placas ficam incubadas em estufa de câmara úmida a 35°C por 48 horas após a semeadura, quando a leitura é realizada, avaliando o ponto de intersecção entre o halo formado e a fita do Etest<sup>®</sup>. Segundo os critérios do NCCLS,<sup>6</sup> o perfil de sensibilidade da espécie ao antifúngico deve ser classificado como sensível, intermediário e resistente, de acordo com a tabela 1.

Para a análise estatística da estimativa da frequência das diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* no grupo estudado, foi utilizado o cálculo de porcentagens com os respectivos limites de confiança. Para correlacionar as variantes clínicas/regiões acometidas com a espécie de *Candida* isolada foi utilizado o teste bimodal de Fisher.

To identify the yeast species of the isolated genus *Candida*, chromogenic media plates were used – Chromagar *Candida*<sup>®</sup>, (Probac of Brasil<sup>®</sup>, São Paulo). After sowing the strain in this medium the colony's color changed as a function of the *Candida* species isolated. After forty-eight hours of incubation at 30-37 °C, it is possible to identify: *Candida albicans*, which turns green, *Candida krusei*, turning pink, *Candida tropicalis*, blue-grey, as well as other species changing to a pink-white color (Figure 1).<sup>10</sup>

The isolated species were grouped together in an attempt to correlate them with the anatomical region involved. To evaluate *in vitro* susceptibility of the isolated species, the Etest<sup>®</sup> method (AB Biodisk, Solna, Sweden<sup>®</sup>) was used. This method has a predefined concentration gradient for ketoconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) in µg/ml for each antifungal. With this method, the colonies are grown in RPMI<sup>®</sup> (Probac do Brasil<sup>®</sup>, São Paulo), a medium consisting of the RPMI 1640, MOPS, and 2% agar glucose (Figure 2).<sup>11</sup> The plates were incubated in a humid chamber at 35°C for 48 hours, at which time a reading was carried out to evaluate the intersection point between the formed halo and the Etest<sup>®</sup> strip. According to the NCCLS criteria,<sup>6</sup> the species sensitivity profile to antifungals must be classified as sensitive, intermediate or resistant, in accordance with table 1.

For the statistical analysis of the estimated frequency of the different yeast species of genus *Candida* in the group studied, percentages were calculated with their respective trust interval. To correlate clinical variants/regions involved with the isolated *Candida* species, the Fisher bimodal test was used. A descriptive

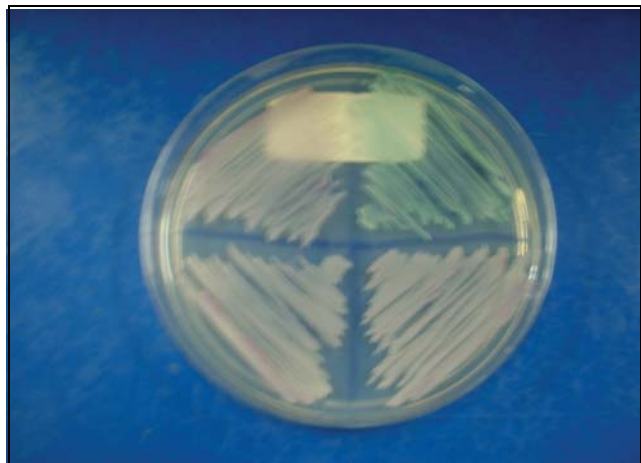


Figura 1: Identificação das espécies de levedura do gênero *Candida* por meio do Chromagar *Candida*<sup>®</sup>. Placa com crescimento de três amostras de *Candida krusei* (em rosa) e uma de *Candida albicans* (em verde) / Figure 1: Identification of the yeast species of the genus *Candida* by means of Chromagar *Candida*<sup>®</sup>. A plate with growth of three *Candida krusei* samples (in pink) and one *Candida albicans* (in green).

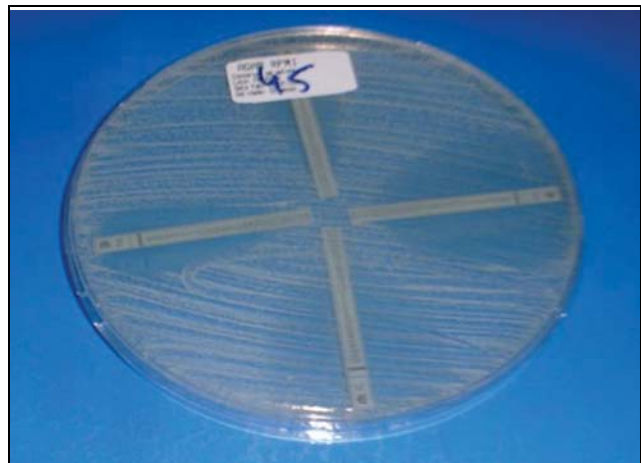


Figura 2: Susceptibilidade *in vitro* das espécies isoladas pelo Etest<sup>®</sup>. Amostra de *Candida albicans* apresentando susceptibilidade à anfotericina (AP), CIM = 0,125µg/ml; cetoconazol (KE), CIM = 0,008 µg/ml; itraconazol (IT), CIM = 0,094 µg/ml e fluconazol (FL), CIM = 0,50 µg/ml / Figure 2: In vitro susceptibility of the species isolated by Etest<sup>®</sup>. Sample of *Candida albicans* showing susceptibility to amphotericin (AP), MIC = 0.125µg/ml; ketoconazole (KE), MIC = 0.008 µg/ml; itraconazole (IT), MIC = 0.094 µg/ml and fluconazole (FL), MIC = 0.50 µg/ml.

Tabela 1: Critérios de classificação do perfil de sensibilidade com fitas de Etest®  
 Table 1: Classification criteria of the sensitivity profile with Etest® strips

Antifúngico <i>Antifungal</i>	Sensível (µg/ml) <i>Sensitive (µg/ml)</i>	Intermediário (µg/ml) <i>Intermediate (µg/ml)</i>	Resistente (µg/ml) <i>Resistant (µg/ml)</i>
Fluconazol / <i>Fluconazole</i>	CIM• 8	8<CIM<64	CIMŽ 64
Itraconazol / <i>Itraconazole</i>	CIM• 0.125	0.125<CIM<1	CIMŽ 1
Anfotericina B / <i>Amphotericin B</i>	CIM• 0.25	0.25<CIM<1	CIMŽ 1
Cetoconazol / <i>Ketoconazole</i>	CIM• 0.032	0.032<CIM<16	CIMŽ 16

CIM= Concentração inibitória mínima - Fonte: NCCLS6 / MIC= Minimum inhibitory concentration - Source: NCCLS6

Realizou-se estudo descritivo para demonstrar a susceptibilidade *in vitro* dessas espécies aos antifúngicos cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B.

O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética médica da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

## RESULTADOS

Dos 100 pacientes avaliados apenas seis estavam internados. A amostra era constituída em sua maior parte por mulheres, da raça branca e com idade entre 41 e 60 anos. As características demográficas do grupo estudado encontram-se na tabela 2.

Os resultados relativos à identificação das espécies de levedura do gênero *Candida* por meio do Chromagar *Candida*® podem ser observados na tabela 3.

Não foi possível estabelecer correlação significante entre as regiões acometidas e as espécies isoladas através do teste bimodal de Fisher. Os resultados encontrados podem ser visualizados na tabela 4.

A tabela 5 mostra o acometimento cutâneo pelas diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida*, evidenciando nítida predominância de acometimento das unhas das mãos.

A tabela 6 mostra o comportamento das espécies de *Candida albicans* isoladas das lesões dos pacientes estuda-

*study was carried out to demonstrate the in vitro susceptibility of these species to the antifungals ketoconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B.*

*The protocol was approved by the medical ethics committee of the Irmandade da Santa Casa de Misericordia de São Paulo.*

## RESULTS

*Only six of the 100 patients assessed were hospitalized. The sample was constituted for the most part by Caucasian women between the ages of 41 and 60 years. The demographic characteristics of the group studied are found in table 2.*

*Results relative to the identification of yeast species of the genus Candida by means of the Chromagar Candida® may be observed in table 3.*

*It was not possible to ascertain a significant correlation between the regions involved and the species isolated through the Fisher bimodal test. The results found may be seen in table 4.*

*Table 5 shows cutaneous involvement by different yeast species of the genus Candida, illustrating a distinct predominance of fingernail involvement.*

*Table 6 shows the behavior of Candida albicans species isolated from the lesions of patients studied.*

Tabela 2: Características dos 100 pacientes com candidíase superficial avaliados no período de maio de 1999 a julho de 2001 na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / Table 2: Characteristics of 100 patients with superficial candidiasis assessed from May 1999 to July 2001 at the Santa Casa de Misericordia de Sao Paulo

Característica / <i>Characteristic</i>	Nº de pacientes / <i>Nº of patient</i>		%
Sexo / <i>Sex</i>	feminino / <i>Female</i>	79	79
	masculino / <i>Male</i>	21	21
Idade / <i>Age</i>	0 a 20 anos / <i>0 - 20 years</i>	12	12
	21 a 40 anos / <i>21-40 years</i>	17	17
	41 a 60 anos / <i>41-60 years</i>	47	47
	61 a 80 anos / <i>61-80 years</i>	24	24
Região acometida / <i>Region involved</i>	unhas / <i>Nails</i>	59	59
	pele / <i>Skin</i>	33	33
	mucosa oral / <i>Oral mucosa</i>	6	6
	vagina / <i>Vagina</i>	1	1
	mucosa ocular / <i>Ocular mucosa</i>	1	1

Tabela 3: Leveduras do gênero *Candida* isoladas dos pacientes avaliados no período de maio de 1999 a julho de 2001 na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / *Table 3: Yeasts of the genus Candida isolated in patients assessed from May 1999 to July 2001 at the Santa Casa de Misericórdia of São Paulo*

Espécie / <i>Species</i>	Nº de pacientes / <i>Nº of patients</i>	%	CI / <i>TI</i>
<i>Candida albicans</i> / <i>Candida albicans</i>	76	76	84.4 - 67.6
<i>Candida krusei</i> / <i>Candida krusei</i>	19	19	26.7 - 11.3
<i>Candida tropicalis</i> / <i>Candida tropicalis</i>	1	1	2.9 - 0.9
Outras espécies / <i>Other species</i>	4	4	7.8 - 0.1

CI: 95% de intervalo de confiança / *TI: 95% trust interval*

dos. A maioria delas mostrou-se susceptível aos antifúngicos testados.

A tabela 7 mostra o comportamento das espécies de *Candida krusei* isoladas das lesões dos pacientes estudados. As espécies de *Candida krusei* mostraram-se mais susceptíveis (94,7%) à anfotericina B do que aos demais antifúngicos.

## DISCUSSÃO

A maioria dos pacientes avaliados foi atendida na Clínica de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. A clientela da Clínica é constituída predominantemente por mulheres. As características demográficas do grupo estudado podem estar, em parte, relacionadas com o perfil dos pacientes que freqüentam a Clínica.

Leveduras do gênero *Candida* são comumente encontradas nas unhas. *Candida albicans* é o patógeno mais comum. *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* são encontradas com menor freqüência.<sup>12</sup> As leveduras do gênero *Candida* podem comportar-se como patógeno primário, invadindo a unha normal principalmente em pacientes com candidíase mucocutânea crônica e pacientes aidéticos. Já em pacientes imunocompetentes, freqüentemente são patógenos secundários, invadindo a unha previamente alterada por trauma, hiper-hidratação ou irritação por contacto com substâncias químicas. Esses casos apresentam-se clinicamente como onicólise ou paroníquia. Podem também atuar como pató-

*Most of them proved to be susceptible to the antifungals tested.*

*Table 7 shows the behavior of Candida krusei species isolated from the lesions of the patients studied. The species of Candida krusei showed greater susceptibility (94.7%) to amphotericin B than to other antifungals.*

## DISCUSSION

*Most patients assessed were attended to at the Dermatology Clinic of the Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital. The Clinic's clientele consists predominantly of women. The demographic characteristics of the group studied may be partly related to the profile of patients frequenting the Clinic.*

*Yeasts of the genus Candida are usually found on the nails. Candida albicans is the most common pathogen. Candida tropicalis, Candida krusei, Candida parapsilosis and Candida guilliermondii are found in lower frequency.<sup>12</sup> Yeasts of the genus Candida may behave like a primary pathogen. They tend to invade the normal nail mainly in patients with chronic mucocutaneous candidiasis as well as in Aids patients. Indeed, in immunocompetent patients, they are often secondary pathogens, and invade a nail only after previously being altered by trauma, hyperhydration or irritation from contact with chemical substances. These cases clinically show as onycholysis or paronychia. They may also act as secondary pathogens in nails affected by*

Tabela 4: Isolamento de leveduras do gênero *Candida* por região acometida (pele e mucosas) dos pacientes avaliados no período de maio de 1999 a julho de 2001 na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

*Table 4: Isolation of yeasts of the genus Candida per region involved (skin and mucosas) of the patients assessed from 1999 to July 2001 at the Santa Casa de Misericórdia of São Paulo Hospital*

Região acometida <i>Region involved</i>	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		Outras espécies <i>Other species</i>		Total
	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>				
	Nº *	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Unhas / <i>Nails</i>	46	60.5	9	47.4	1	100	3	75	59
Pele / <i>Skin</i>	23	30.3	9	47.4	–	–	1	25	33
Mucosa oral / <i>Oral mucosas</i>	5	6.6	1	5.2	–	–	–	–	06
Vagina / <i>Vagina</i>	1	1.3	–	–	–	–	–	–	1
Mucosa ocular / <i>Ocular mucosas</i>	1	1.3	–	–	–	–	–	–	1
Total	76	100.0	19	100.0	1	100	4	100	100

\* n = número de casos / *n = number of cases*

Tabela 5: Isolamento de leveduras do gênero *Candida* por região acometida (pele) dos pacientes avaliados no período de maio de 1999 a julho de 2001 na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo  
 Table 5: Isolation of yeasts of the genus *Candida* per region involved (skin) of the patients assessed from May 1999 to July 2001 at the Santa Casa de Misericórdia of São Paulo Hospital

Local	<i>Candida albicans</i> Candida albicans	<i>Candida krusei</i> Candida krusei	<i>Candida tropicalis</i> Candida tropicalis	Outras espécies Other species	Total (Nº casos) (Nº cases)
Interdígito de mãos <i>Interdigits of hands</i>	7	–	–	–	7
Interdígito de pés <i>Interdigits of feet</i>	7	5	–	–	12
Região inguinal <i>Inguinal region</i>	4	2	–	1	7
Pênis <i>Penis</i>	1	–	–	–	1
Região submamária <i>Submammary region</i>	1	1	–	–	2
Sulco interglúteo <i>Intergluteal cleft</i>	1	–	–	–	1
Região axilar <i>Axillary region</i>	1	1	–	–	2
Axila, pescoço e quadril <i>Axilla, throat and hip</i>	1	–	–	–	1
Unhas das mãos <i>Fingernails</i>	38	9	1	1	49
Unhas dos pés <i>Toenails</i>	6	–	–	1	7
Unha dos pés e mãos <i>Toe- and fingernails</i>	2	–	–	1	3
Total (Nº casos / Nº cases)	69	18	1	4	92

genos secundários em unhas acometidas por psoríase e líquen plano e por outras dermatoses.<sup>12</sup>

O acometimento das unhas em 60% dos pacientes estudados é esperado tanto pelo fato de as leveduras do gênero *Candida* em unhas de pacientes imunocompetentes serem secundárias ao trauma, hiper-hidratação (exposição continuada à água) ou irritação por contacto com substâncias químicas (produtos de limpeza), que são mais comuns em mulheres, como pelo perfil do grupo estudado: predominantemente feminino.

É sabido que *Candida albicans* é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e de orofaringe.<sup>2</sup> No entanto, são raras as publicações em grupos de imunocompetentes que estudam a frequência das espécies de *Candida*, sua correlação com as regiões acometidas e a susceptibilidade dessas espécies aos antifúngicos. Em pacientes imunodeprimidos, principalmente em grupo de aidéticos, esses estudos são muito comuns.

*psoriasis and lichen planus, and by other skin diseases.*<sup>12</sup>

*That 60% of patients studied presented with nail involvement was something to be expected just as much by the fact that yeasts of the genus Candida in nails of immunocompetent patients were secondary to trauma, hyperhydratation (continued exposure to water) or irritation from contact with chemical substances (household cleaning products) – all of which are most common to women –, as by the profile of the group studied: predominantly female.*

*Candida albicans is known to be the most common pathogen in cutaneous candidiasis and oropharynx.<sup>2</sup> On the other hand, publications studying the species of Candida, its correlation with the regions involved and the susceptibility of these species to antifungals have been especially rare with respect to immunocompetent groups. As for immunodeficient patients, mainly with Aids groups, studies are quite common.*

Tabela 6: *Candida albicans* (76 pacientes avaliados no período de maio de 1999 a julho de 2001 na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo): susceptibilidade *in vitro* pelo Etest® / Table 6: *Candida albicans* (76 patients assessed from May 1999 to July 2001 at the Santa Casa de Misericórdia of São Paulo Hospital): in vitro susceptibility by Etest®

	Fluconazol (%) <i>Fluconazole</i>	Anfotericina (%) <i>Amphotericin</i>	Cetoconazol (%) <i>Ketoconazole</i>	Itraconazol (%) <i>Itraconazole</i>
Susceptível / <i>Susceptible</i>	86.9	94.7	81.6	78.9
Intermediário / <i>Intermediate</i>	1.3	5.3	7.9	6.6
Resistente / <i>Resistant</i>	11.8	–	10.5	14.5

Estudo brasileiro multicêntrico isolou *Candida albicans* em 91% das amostras de orofaringe de pacientes aids-ticos. As espécies não *albicans* isoladas em frequência decrescente foram: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.<sup>13</sup>

Para o isolamento das espécies de leveduras do gênero *Candida* optou-se pela utilização do Chromagar *Candida*® por tratar-se de método susceptível e específico. *Candida albicans* foi isolada em 76%, *Candida krusei* em 19%, e *Candida tropicalis* em 1% dos pacientes avaliados, totalizando 96% dos isolamentos. Todas as demais espécies corresponderam a apenas 4% dos isolamentos. A predominância do isolamento de *Candida albicans* é o que se observa na literatura tanto em pacientes imunocompetentes com em imunodeprimidos.<sup>2,13,14</sup> A frequência de isolamento e a prevalência das espécies não *albicans* isoladas nos diferentes estudos são variáveis.<sup>13,14</sup>

Não foi possível estabelecer correlação significativa entre as regiões acometidas e as principais espécies isoladas. Também não foram encontrados na literatura trabalhos que correlacionem as espécies isoladas e região acometida.

O *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing* desenvolveu e padronizou uma metodologia com diluição em caldo para determinação da susceptibilidade de leveduras.<sup>6</sup> Tanto a macrodiluição em caldo como o método da microdiluição foram publicados no documento do NCCLS M27-A, e atualizados em 2002 (M27-A2).

As espécies *albicans*, *tropicalis* e *parapsilosis* das leveduras do gênero *Candida* são susceptíveis aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e fluconazol pelo padrão geral de susceptibilidade (método M27-A NCCLS).<sup>2</sup> Pelo

A multicenter Brazilian study isolated *Candida albicans* in 91% of oropharynx samples taken from Aids patients. The non *albicans* species isolated in decreasing frequency were: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*.<sup>13</sup>

For the isolation of yeast species of the genus *Candida* the use of Chromagar *Candida*, was selected because it is a susceptible and specific method. *Candida albicans* was isolated in 76% of the material, *Candida krusei* in 19%, and *Candida tropicalis* in 1% of patients assessed, amounting to 96% of the isolated cases. All of the other species corresponded to only 4% of those isolated. A predominance of isolated *Candida albicans* is what can be observed in the literature in either immunocompetent or immunodeficient patients.<sup>2,13,14</sup> The frequency of isolation and prevalence of non *albicans* species isolated in different studies are variable.<sup>13,14</sup>

It was not possible to ascertain a significant correlation between the regions involved and the main species isolated. Moreover, there were no studies found in the literature which correlated the isolated species and region involved.

The *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing* developed and standardized a methodology through broth dilution in order to determine the susceptibility of yeasts.<sup>6</sup> The broth macro- and microdilution method was published in document NCCLS M27-A, and updated in 2002 (M27-A2).

The *albicans*, *tropicalis* and *parapsilosis* of yeast species of the genus *Candida* are susceptible to antifungals amphotericin B, itraconazole and fluconazole in accordance with the general pattern of susceptibility (method

Tabela 7: *Candida krusei* (19 pacientes avaliados no período de maio de 1999 a julho de 2001 na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo): susceptibilidade *in vitro* pelo Etest® / Table 7: *Candida krusei* (19 patients assessed from May 1999 to July 2001 at Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital): in vitro susceptibility by Etest®

	Fluconazol (%) <i>Fluconazole</i>	Anfotericina (%) <i>Amphotericin</i>	Cetoconazol (%) <i>Ketoconazole</i>	Itraconazol (%) <i>Itraconazole</i>
Susceptível / <i>Susceptible</i>	89.4	94.7	63.2	73.7
Intermediário / <i>Intermediate</i>	5.3	5.3	26.3	21
Resistente / <i>Resistant</i>	5.3	–	10.5	5.3

mesmo método, *Candida lusitanae* é susceptível ao itraconazol e ao fluconazol, e pode variar a susceptibilidade ou ser resistente à anfotericina B, e, ainda, muitas das espécies isoladas de *Candida krusei* e *Candida glabrata* são resistentes a esses antifúngicos.<sup>2</sup>

O método do Etest® foi avaliado e demonstrou ser uma alternativa aceitável aos métodos de referência.<sup>4,7,8,9</sup> Neste estudo, utilizando-se o Etest®, a maioria das espécies de *Candida albicans* isoladas das lesões dos pacientes estudados mostrou-se susceptível aos antifúngicos testados. Estes resultados são concordantes com os encontrados na literatura relativos à avaliação de pacientes imunocompetentes.<sup>2</sup> São relatados casos de resistência da *Candida albicans* aos derivados azólicos em pacientes infectados pelo VIH (vírus da imunodeficiência humana) e em pacientes com candidíase invasiva.<sup>2</sup>

Em relação ao comportamento das espécies de *Candida krusei* isoladas das lesões dos pacientes estudados pelo Etest®, observou-se maior susceptibilidade à anfotericina B do que aos demais antifúngicos. É conhecida a resistência intrínseca da *Candida krusei* ao fluconazol em especial e aos derivados azólicos em geral.<sup>2,15</sup>

Em estudo de candidíase de orofaringe de pacientes aidéticos, o ranking de susceptibilidade aos derivados azólicos das espécies de leveduras do gênero *Candida*, de acordo com o método de microdiluição segundo o NCCLS, foi: *Candida albicans* > *C. tropicalis* > *C. glabrata* > *C. krusei*.<sup>13</sup>

## CONCLUSÃO

Concluindo, no grupo de pacientes imunocompetentes predominantemente ambulatoriais com candidíases superficiais causadas por leveduras do gênero *Candida* estudados no período de maio de 1999 a julho de 2001 observou-se:

- 60% de acometimento nas unhas, onde a levedura se comportou provavelmente como patógeno secundário;
- isolamento de *Candida albicans* em 76%, de *Candida krusei* em 19%, e de *Candida tropicalis* em 1% das amostras;
- não foi possível estabelecer correlação entre as regiões acometidas e as espécies isoladas;
- susceptibilidade da maioria das espécies isoladas aos antifúngicos testados pelo Etest® □

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação do Amparo à Pesquisa de São Paulo – Fapesp e à Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo pelo apoio.

*M27-A NCCLS*).<sup>2</sup> By the same method, *Candida lusitanae* is susceptible to itraconazole and fluconazole, which may vary or be resistant to amphotericin B. Many isolated species of *Candida krusei* and *Candida glabrata* are resistant to these antifungals.<sup>2</sup>

The Etest® method was assessed and proved to be an acceptable alternative to the reference methods.<sup>4,7,8,9</sup> In the present study, the authors made use of Etest®. Most of the isolated species of *Candida albicans* from the lesions of patients studied showed susceptibility to tested antifungals. These results agree with the literature as far as the evaluation of immunocompetent patients is concerned.<sup>2</sup> Cases were reported of *Candida albicans* resistance to azolic derivatives in HIV-infected (human immunodeficiency virus) patients and in patients with invasive candidiasis.<sup>2</sup>

As for the behavior of isolated *Candida krusei* species from the lesions of patients studied by Etest®, greater susceptibility to amphotericin B than to other fungi was observed. *Candida krusei* is known to have intrinsic resistance particularly to fluconazole and to azolic derivatives in general.<sup>2,15</sup>

In studies of candidiasis on the oropharynx of Aids patients, the susceptibility ranking of the azolic derivatives of yeast species of the genus *Candida*, in accordance with the NCCLS-approved method of microdilution, was: *Candida albicans* > *C. tropicalis* > *C. glabrata* > *C. krusei*.<sup>13</sup>

## CONCLUSION

In conclusion, the following features were observed in the group of predominantly ambulatory immunocompetent patients with superficial candidiasis caused by yeasts of the genus *Candida*, studied from May 1999 to July 2001:

- 60% of cases involved the nails, where the yeast probably behaves like a secondary pathogen;
- isolation of *Candida albicans* in 76% of material, *Candida krusei* in 19%, and *Candida tropicalis* in 1% of samples;
- it was not possible to ascertain a correlation between the anatomical regions involved and the species isolated;
- the majority of the isolated species tested by Etest® were susceptible to antifungals. □

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors should like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP: The State of São Paulo Research Foundation) and the Medical Sciences Faculty of the Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Hospital for their support.



**REFERÊNCIAS / REFERENCES**

1. Paula CR. Candidíases. In: Zaitz C, Campbell I, Marques AS, *et al.* Compêndio de Micologia Médica. Rio de Janeiro: Medsi; 1998. p. 99-107.
2. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, *et al.* Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. *J Infect Dis.* 2000; 30: 662-678.
3. Houang ETS, Chu KC, Koehler AP, Cheng AFB. Use of Chromagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J Clin Pathol.* 1997; 50: 563-565.
4. Ambler JE, Kerawala M, Yaneza A, Drabu YJ. Evaluation of Chromagar *Candida* for rapid identification and Etest for antifungal susceptibility testing in a district general hospital laboratory. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 158-159.
5. Yocesoy M, Marol S. Performance of Chromagar *Candida* and BIGGY Agar for presumptive identification of yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 253.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A. Wayne, Pa, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995.
7. Li J, Nong H, Nong D, Cheng L. Study on susceptibility test of pathogenic fungi from otorhinolaryngology by Etest method. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2001; 15: 77-79.
8. Matar M, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, *et al.* Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 1647-1951.
9. Morace G, Amato G, Bistoni F, *et al.* Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for clinical laboratory standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2953-2958.
10. Lacaz CS, Porto E, Marins JEC, *et al.* Tratado de Micologia Médica Lacaz. São Paulo: Sarvier; 2002. p. 918-990.
11. Lacaz CS, Porto E, Marins JEC, *et al.* Tratado de Micologia Médica Lacaz. São Paulo: Sarvier; 2002. p. 998-1067.
12. Daniel CRI, Gupta AK, Daniel MP, *et al.* *Candida* infection of the nail: role of *Candida* as a primary or secondary pathogen. *Dermatology.* 1998; 37: 904-907.
13. Sant' Ana PL, Milan EP, Martinez R, *et al.* Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 253-257.
14. Dorko E, Jautová J. *Candida* species isolated in skin infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002; 16: 234.
15. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, *et al.* Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol.* 1998; 36: 156-165.

---

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: / MAILING ADDRESS:

*Elisete I. Crocco*

*Clínica de Dermatologia - Irmandade da Santa*

*Casa de Misericórdia de São Paulo*

*Rua Dr. Cesário Motta JR, 112 - Edifício Conde de*

*Lara - 5º andar - Vila Buarque*

*São Paulo SP 01221-020*

*Tel: (11) 32267240*

*E-mail: elicrocco@uol.com.br*