

Distribución de especies y susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp. causantes de micosis superficiales. Coro, estado Falcón, Venezuela.

Yotsabeth Saúl-García, Leyla Humbría-García y Rosaura Hernández-Valles.

Laboratorio de Micología, Departamento de Estudios Morfofuncionales, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, estado Falcón, Venezuela.

Palabras clave: Micosis superficiales; *Candida* spp.; fluconazol; voriconazol.

Resumen. Las especies de *Candida* distintas a *C. albicans* se describen con frecuencia como agentes causales de micosis superficial y presentan una mayor resistencia al tratamiento con los azoles. Con la finalidad de determinar la distribución de especies y la susceptibilidad antifúngica in vitro de *Candida* spp., se realizó un estudio ambispectivo donde se analizaron 18 aislados de levaduras obtenidas de muestras de pacientes con diagnóstico de micosis superficial. La identificación taxonómica se realizó mediante la visualización de las características macroscópicas de crecimiento en agar cromogénico y por métodos convencionales. La susceptibilidad a fluconazol y voriconazol se evaluó por el método de difusión en disco. El 88,8% de los aislados provenía de muestras de uñas. *C. parapsilosis* fue la especie más frecuente, seguida de *C. tropicalis*, *C. albicans* y *C. krusei*, lo cual confirmó el predominio de especies no albicans como causa de micosis superficial. El patrón de susceptibilidad a fluconazol y voriconazol fue similar: todos los aislados de *C. parapsilosis* y *C. albicans* resultaron sensibles, mientras que el 83,3% de *C. tropicalis* mostró sensibilidad a ambos antifúngicos. *C. krusei*, especie resistente a fluconazol, presentó sensibilidad intermedia al voriconazol. El uso de agar cromogénico permitió detectar infecciones mixtas en muestras de uñas, involucrando en uno de los casos a *Candida* spp. y *C. tropicalis*, esta última con resistencia tanto a fluconazol como a voriconazol. Los resultados obtenidos demuestran la importancia de la identificación de especies y la realización de pruebas de susceptibilidad con el fin de evitar fracasos terapéuticos en micosis superficiales.

Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. causing superficial mycosis. Coro, Falcon state, Venezuela.*Invest Clin* 2015; 56(3): 276 - 283**Keywords:** Superficial mycosis; *Candida* spp.; fluconazole; voriconazole.

Abstract. *Candida* species other than *C. albicans* are often described as causative agents of superficial mycosis and are more resistant to treatment with azoles. In order to determine the distribution of species and in vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp., one ambispective study, which analyzed 18 yeast isolates obtained from samples from patients diagnosed with superficial mycosis, was performed. Taxonomic identification was performed by macroscopic visualization of the growth characteristics in chromogenic agar and by conventional methods. The susceptibility to fluconazole and voriconazole was evaluated by the disc diffusion method. Most of the isolates (88.8%), came from nail samples. *C. parapsilosis* was the most common species, followed by *C. tropicalis*, *C. albicans* and *C. krusei*, which confirmed the prevalence of non-albicans species as a cause of superficial mycoses. The pattern of susceptibility to fluconazole and voriconazole was similar: all isolates of *C. parapsilosis* and *C. albicans* were susceptible, while 83.3% of *C. tropicalis* showed sensitivity to both antifungals. *C. krusei*, fluconazole-resistant species showed intermediate susceptibility to voriconazole. The use of chromogenic agar allowed to detect mixed infections in nail samples, involving *Candida* spp. and *C. tropicalis* in one case, the latter with resistance to both fluconazole and voriconazole. The results demonstrate the importance of species identification and susceptibility testing to avoid therapeutic failures in superficial mycoses.

Recibido: 06-10-2014 Aceptado: 26-03-2015

INTRODUCCIÓN

Las micosis superficiales son las infecciones fúngicas más comunes de piel y mucosa (oral-vaginal), generadas por contacto directo con el hongo o con una persona o animal infectado, siendo motivo frecuente de consulta en los servicios de Dermatología o Micología. Sus agentes causales pueden ser hongos filamentosos o levaduriformes (1, 2).

Entre las levaduras, *Candida albicans* era la especie predominante, sin embargo, se están documentando cada vez más infecciones causadas por otras especies, que presentan mayor resistencia al tratamiento con los azoles (3-5). En estudios realizados en Buenos Aires, Argentina (1999-2001), con aislados provenientes de diferentes muestras clínicas, señalan que en las secreciones mucosas *C. albicans* fue la especie preponderante (60% - 80%

de los casos) no así en muestras de uñas, donde *C. parapsilosis* desplazó a *C. albicans* (37,7% vs. 22,0%, respectivamente) (6). En otro estudio realizado en ese país, durante el período 2007 a 2011, se analizaron en forma prospectiva 414 pacientes con lesiones ungueales, y se detectó el predominio de especies *no albicans* (91%) en onicomycosis tanto de mano como de pie (7). En Venezuela, la frecuencia de especies de *Candida* causantes de micosis superficial varía según el área geográfica: *Candida albicans* es la más frecuente, especialmente en el estado Sucre, seguida de *C. tropicalis* con mayor número de casos en Caracas, *C. guilliermondii* y *C. sake*, aisladas sólo en Caracas y el estado Falcón, respectivamente (8). En este último estado, se ha descrito el predominio de especies *no albicans* causantes de micosis superficial: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. sake* (8).

Los estudios, cada vez más frecuentes, acerca del aislamiento de especies de *Candida* resistentes a diversos antifúngicos, enfatiza la importancia de su identificación para poder instaurar el tratamiento antimicótico adecuado (9). Es por ello que las pruebas de susceptibilidad *in vitro* han adquirido importancia, dada la necesidad de establecer el patrón de susceptibilidad de las cepas a los nuevos antimicóticos, así como también, reconocer y detectar el surgimiento de aislados resistentes en diferentes regiones (10).

Debido a los cambios observados en la distribución de especies de *Candida* causantes de micosis superficiales y a la variabilidad descrita en su patrón de susceptibilidad antifúngica, se realizó un estudio ambispectivo con la finalidad de confirmar la existencia de modificaciones en la frecuencia de especies y evaluar su perfil de susceptibilidad a fluconazol y voriconazol, para así aportar información que permita adecuar la terapia antifúngica en los pacientes afectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, de tipo ambispectivo donde se analizaron 18 aislados de levaduras obtenidas de muestras de pacientes con diagnóstico de micosis superficial, que fueron enviadas al Laboratorio de Micología, Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", Coro-Falcón, Venezuela, durante un lapso de 18 meses (enero 2012 a julio 2013). Los aislados fueron identificados mediante sus características macroscópicas

de crecimiento en agar cromogénico (Oxoid brillante™ *Candida* agar) y por métodos convencionales: hidrólisis de la urea, producción de clamidoconidias y asimilación de carbohidratos (11).

Estudio de susceptibilidad *in vitro* a fluconazol y voriconazol

Se realizó mediante el método de difusión en disco, descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) en su documento M44-A, utilizando placas de 90 mm de diámetro que contenían agar Müeller-Hinton (MHA) (BBL, Cockeysville, EE.UU) suplementado con 2% de glucosa y 0,5 µg/mL de azul de metileno, con una profundidad de 4,0 mm (12). La superficie del agar fue inoculada por diseminación con hisopo estéril, humedecido en una suspensión de la levadura a evaluar, previamente ajustada a la turbidez del estándar N° 0,5 McFarland, equivalente a una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL; posteriormente se colocaron los discos de fluconazol (25µg) y voriconazol (1µg) (Bioanalyse ®) sobre la superficie y las placas fueron incubadas en aerobiosis a 37°C. Los resultados se evaluaron entre las 18 y 24 horas después del ensayo y la lectura se realizó visualmente midiendo el diámetro (en milímetros) del área donde se produjo una reducción del 80% del crecimiento fúngico.

Los aislados se clasificaron como Sensible (S), Intermedio (I), Sensible Dosis Dependiente (SDD) o resistentes (R). Los puntos de corte de referencia, se presentan en la Tabla I (13,14).

TABLA I
PUNTOS DE CORTE DE REFERENCIA (milímetros) PARA FLUCONAZOL Y VORICONAZOL EN *Candida* spp. (13, 14).

ESPECIE	FLUCONAZOL			VORICONAZOL		
	S	S-DD	R	S	I	R
<i>C. albicans</i>	≥17	14-16	≤13	≥17	14-16	≤13
<i>C. parapsilosis</i>	≥17	14-16	≤13	≥17	14-16	≤13
<i>C. tropicalis</i>	≥17	14-16	≤13	≥17	14-16	≤13
<i>C. glabrata</i>	-	≥15	≤14	≥16	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	≥15	13-14	≤12
<i>Candida</i> spp.	≥19	15-18	≤14	≥17	14-16	≤13

S: Sensible, S-DD: Sensible Dosis Dependiente, R: Resistente, I: Intermedio

Control de calidad del estudio de susceptibilidad

Con el fin de evaluar la calidad y el rendimiento de los reactivos, el agar MHA, la metodología utilizada y la interpretación correcta de los resultados se incluyeron cepas de control de calidad (*C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258), suministradas por el Departamento de Micología, del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, Caracas, Venezuela. Los diámetros de los halos de inhibición de referencia fueron: fluconazol 22 a 23 mm para *C. parapsilosis* ATCC 22019 (en *C. krusei* ATCC 6258 no se han establecido debido a la variabilidad encontrada), mientras que para voriconazol fue de 28 a 37 mm para *C. parapsilosis* ATCC 22019 y 16 a 25 mm para *C. krusei* ATCC 6258 (15, 16).

Análisis de datos

Se calculó la frecuencia absoluta y porcentual de los aislados obtenidos por especie de *Candida*, tipo de muestra y los porcentajes de sensibilidad a los antifúngicos, de forma global y por especie aislada.

RESULTADOS

Los 18 aislados analizados se obtuvieron de muestras de uñas (mano y pie) y región inguinal:

14 (77,8%) de uñas de manos, 2 de uñas de pie y 2 de región inguinal (Tabla II). Las especies más frecuentes en uñas de mano fueron *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (ambas con 42,9%), seguidas de *C. krusei* y *Candida* spp. (7,1%). En uñas de pie y región inguinal sólo se aislaron *C. parapsilosis* y *C. albicans*, respectivamente (Tabla II). Los resultados presentados evidencian el predominio de especies *no albicans* como agentes causales de micosis superficiales no dermatofíticas.

El uso del agar cromogénico permitió detectar infecciones mixtas por *Candida* en muestras de uñas de mano, provenientes de tres pacientes con diagnóstico presuntivo de onicomicosis.

El patrón de susceptibilidad de los aislados mostró que el 88,9% (n=16) resultó sensible tanto a fluconazol como voriconazol; mientras que 11,1% (n=2) fue resistente a fluconazol y 5,6% (n=1) a voriconazol (Tabla III). Sólo una especie mostró susceptibilidad intermedia al voriconazol (5,6%). -

Según la especie evaluada, se evidenció el mismo patrón de susceptibilidad para ambos antifúngicos: todos los aislados de *C. parapsilosis*, *C. albicans* y *Candida* spp. resultaron sensibles, mientras que esto sólo se observó en el 83,3% de *C. tropicalis* (uno de los aislados involucrados en infecciones mixtas fue resistente a fluconazol y voriconazol). *C. krusei*, presentó susceptibilidad intermedia a voriconazol.

TABLA II
LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LAS ESPECIES DE *Candida* AISLADAS

ESPECIE	MUESTRA CLINICA			TOTAL
	UM	UP	RI	
<i>C. parapsilosis</i>	6 (42,9%)	2 (100%)	-	8 (44,4%)
<i>C. tropicalis</i>	6 (42,9%)	-	-	6 (33,3%)
<i>C. albicans</i>	-	-	2 (100%)	2 (11,1%)
<i>C. krusei</i>	1 (7,1%)	-	-	1 (5,6%)
<i>Candida</i> spp.	1 (7,1%)	-	-	1 (5,6%)
TOTAL	14	2	2	18 (100%)

UM: uña mano; UP: uña pie; RI: región inguinal

TABLA III
SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* A FLUCONAZOL Y VORICONAZOL DE LAS ESPECIES DE
***Candida* CAUSANTES DE MICOSIS SUPERFICIAL.**

Especie	Fluconazol (%)				Voriconazol (%)			
	S	S-DD	R	Total	S	I	R	Total
<i>C. parapsilosis</i>	8 (100)	-	-	8	8 (100)	-	-	8
<i>C. tropicalis</i>	5 (83,3)	-	1 (16,7)	6	5 (83,3)	-	1 (16,7)	6
<i>C. albicans</i>	2 (100)	-	-	2	2 (100)	-	-	2
<i>C. krusei</i>	-	-	1 (100)	1	--	1 (100)	-	1
<i>Candida spp.</i>	1 (100)	-	-	1	1 (100)	-	-	1
Total	16	-	2	18	16	1	1	18

S: Sensible; **S-DD**: Sensible Dosis Dependiente; **I**: Intermedio; **R**: Resistente.

DISCUSIÓN

Las micosis superficiales están limitadas a piel, pelos, uñas, mucosas oral y vaginal. Constituyen, por su alta prevalencia, un importante problema de salud pública. Sus agentes etiológicos varían con el clima, las características culturales y socioeconómicas de la población (17, 18). Los principales agentes etiológicos son los dermatofitos seguidos por las levaduras del género *Candida*, responsables del 5% -17% de los casos (19,20).

En este estudio la frecuencia de micosis superficial causada por especies de *Candida* fue del 12,8%, la región anatómica más afectada fueron las uñas, especialmente las de manos, prevaleciendo el sexo femenino. Este hallazgo pudiera explicarse por una mayor exposición a la humedad o por el hecho de que, generalmente, son las mujeres las que presentan mayor preocupación por el aspecto de las uñas, motivo por el cual asisten a la consulta dermatológica (21-25).

La onicomicosis tiene mayor prevalencia en pacientes adultos y se estima que el riesgo se eleva con la edad (22, 26, 27); cuando es producida por especies de *Candida* afecta con mayor frecuencia las uñas de las manos y el pliegue ungueal sin predominio sobre alguno de los dedos (28). Algunos estudios epidemiológicos han señalado múltiples factores que podrían

influir en la gran variedad de especies de levaduras aisladas en muestras de uñas como lo son: la temperatura, grado de humedad del ambiente y la latitud tropical, e incluso se han identificado hongos endémicos en ciertas regiones (21, 29, 30). Mientras que otros han señalado que son los criterios utilizados desde el punto de vista microbiológico para determinar que un agente está asociado con la onicomicosis. Se ha demostrado que diferentes especies de *Candida* y *Fusarium* presentan enzimas de tipo proteasas que pueden tener actividad de queratinasas y que, por lo tanto, pueden jugar un papel como factor de patogenicidad en la invasión de la placa ungueal (31, 32).

Candida albicans se consideraba la especie predominante, pero actualmente se están describiendo infecciones causadas por otras especies, debido quizás al uso indiscriminado de la terapia con fluconazol, que favorece la aparición de especies con resistencia, tales como *C. krusei* y *C. glabrata* (13, 20). De los aislados identificados, *C. parapsilosis* (44,4%) fue la más frecuente en muestras de uñas de mano y pie, similar a lo demostrado en un estudio realizado en Buenos Aires, Argentina, donde se encontró que *C. albicans* (22%) fue desplazada por *C. parapsilosis* (37,7%), en este lugar anatómico (6). Otros autores han señalado que la etiología de la onicomicosis en pie es más frecuente por

los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes* y, *Fusarium* spp. como hongo no dermatofítico; mientras que la especie de levadura predominante es *C. parapsilosis* (33).

Recientemente se ha considerado a *C. parapsilosis* como un importante patógeno emergente, asociado de manera creciente a un amplio espectro clínico de infecciones que van desde micosis superficiales, que afectan principalmente el lecho ungueal tanto de uñas de manos como de pies, la piel, incluso del oído medio, hasta infecciones sistémicas que pueden llegar a comprometer la vida del paciente. Eventualmente, se han reportado casos esporádicos de peritonitis, endoftalmitis y trastornos articulares, entre otros (34). Este microorganismo forma parte de la flora normal de la piel y las uñas y se ha aislado frecuentemente de estos sitios anatómicos en profesionales del área de salud (35). También ha sido aislado de dispositivos médicos tales como, catéteres intravasculares y líneas de nutrición parenteral, lo cual explicaría los casos de candidiasis invasiva en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (34, 36).

C. tropicalis fue la segunda especie aislada en muestras de uñas de manos. Se ha señalado que tiene su hábitat natural en el medio ambiente (suelo, agua, cereales, entre otros) (35), lo cual podría explicar que la frecuencia de onixis causada por *C. tropicalis*, esté asociada a la mayor exposición de las uñas de la mano a la humedad.

La evaluación del patrón de susceptibilidad permitió detectar una sensibilidad aceptable al fluconazol, el cual es considerado el tratamiento de elección en la onixis por levaduras (37), siempre y cuando la especie causal no sea *C. krusei*, por presentar resistencia intrínseca o *C. glabrata* ya que puede mostrar resistencia sin previa exposición, o con mayor frecuencia luego de su exposición al fluconazol (13, 38, 39).

El patrón de susceptibilidad para el voriconazol fue similar al observado con el fluconazol. A pesar de que este triazol es más activo que el fluconazol y el itraconazol sobre las principales levaduras de importancia clínica, especialmente en especies de

Candida con resistencia adquirida (*C. albicans*, *C. glabrata*) o natural a fluconazol (*C. krusei*) y otras levaduras como *C. neoformans*, *Trichosporon beigelii* y *Saccharomyces cerevisiae* (40), no está indicado para el tratamiento de la onicomycosis (41-46).

Es importante señalar que el agar cromogénico permitió detectar infecciones mixtas en muestras de tres pacientes con onixis en uñas de la mano; uno de los casos presentó la combinación *C. tropicalis* - *Candida* spp., evidenciándose en el estudio de susceptibilidad que *C. tropicalis* fue resistente tanto a fluconazol como a voriconazol. En otro caso se aisló la combinación *C. parapsilosis* - *C. krusei*, ésta última especie resistente a fluconazol. Según la literatura revisada la frecuencia de infecciones mixtas es baja (4,5%) (33), sin embargo, en este estudio se observó en 21,42% de los casos. El hallazgo de infecciones mixtas y las implicaciones que pudieran tener en la evolución terapéutica de los pacientes apoyan la importancia de una identificación correcta de los aislados y la realización de pruebas de susceptibilidad, que permitan al clínico adecuar la terapia que lleve a la resolución del proceso infeccioso, evitando así la práctica habitual de tratamiento empírico, en especial, para aquellas especies que no responden a la terapia convencional, como es el caso de *C. krusei*. (47) y en las que muestran un patrón de susceptibilidad variable, como el observado en *C. tropicalis*.

REFERENCIAS

1. **Callisaya J, Conde D, Choque H.** Frecuencia de Gérmenes causantes de Micosis superficiales. BIOFARBO 2007; 15: 21-28.
2. **Arenas R.** Generalidades. Micología médica ilustrada. 4º edición. Mexico, DF: McGraw-Hill Interamericana editores, S.A; 2011, p 9-16.
3. **Hazeb K.** New and emerging yeast pathogens. Clin Microb Rev 1995; 8: 462-478.
4. **Pérez J, Cárdenas C, Hoyos A.** Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de la onicomycosis en un laboratorio de referencia, Manizales (Caldas), 2009. Infectio 2011; 15: 168-176.

5. **García-Martos P, García-Agudo R, Hernández-Molina J, Marín P, Tallero E y Mira J.** Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 131-135.
6. **Mujica MT, Finkelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA.** Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida* no *albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999 – 2001. Rev Arg Microbiol 2004; 36: 107-112.
7. **Nazar J, Gerosa P, Díaz O.** Onicomicosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. Rev Arg Microbiol 2012; 44: 21-25.
8. **Martínez D, Hernández R, Primavera A, Mireya M.** Las micosis en Venezuela: casuística de los Grupos de Trabajo en Micología (1984-2010). Rev Iberoam Micol 2013; 30: 39-46.
9. **Mendoza M.** Importancia de la identificación de levaduras. Rev Soc Ven Microbiol 2005; 25: 13-21.
10. **Hernández-Dueñas A, Vázquez-Larios M, Soto-Nieto G, Rivera-Martínez E.** Susceptibilidad de levaduras aisladas de hemocultivos en pacientes del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Rev Invest Clin 2009; 61: 294-299.
11. **Bonifaz A.** Micología Médica Básica. 4º edición. Mexico, DF: McGraw-Hill Interamericana editores, S.A; 2012, p 333-347.
12. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast. Approved guideline M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 19087-1998. 2004; 24:1-23.
13. **Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D.** Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Drug Resist Updat 2010; 13:180-195.
14. **Pfaller MA, Andes D, Maiken C, Arendrup M, Diekema D, Espinel-Ingroff A, Alexander B, Brown S, Chaturvedi V, Fowler C, Ghannoum M, Johnson E, Knapp C, Moty M, Ostrosky-Zeichner L, Walsh T.** Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70: 330-343.
15. **Barry A, Bille J, Brown S, Ellis D, Meis J, Pfaller M, Rennie R, Rinaldi M, Rogers T, Traczewski M.** Quality control limits for fluconazole disk susceptibility test son Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. J Clin Microbiol 2003; 41: 3410-3412.
16. **Pfaller M, Barry A, Bille J, Brown S, Ellis D, Meis J, Rennie R, Rinaldi M, Rogers T, Traczewski M.** Quality control limits for voriconazol disk susceptibility test son Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. J Clin Microbiol 2004; 42: 1716-1718.
17. **Da Silva Pontes ZBV, De Oliveira Lima E, Cavalcante Oliveira NM, Pereira Dos Santos J, Lira Ramos A.** Onicomicosis in Joao Pessoa city, Brazil. Rev Argent Microbiol 2002; 34: 95-99.
18. **Davel G, Perrota D, canteros C, Cordoba S, Rodero L, Brundy M.** Estudio multicéntrico de micosis superficiales en Argentina. Rev Arg Microbiol 1999; 31: 173-181.
19. **Elewski DE.** Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 415-429.
20. **Nardin ME, Pelegri DG, Manias VG, Méndez E.** Agentes etiológicos de micosis superficiales aislados en un Hospital de Santa Fe, Argentina. Rev Arg Microbiol 2006; 38: 25-27.
21. **Mügge C, Hausteil U-F, Nenoff P.** Causative agents of onychomycosis a retrospective study. J Dtsch Dermatol Ges 2006; 4: 218-228.
22. **Álvarez M I, Caicedo LD.** Medically important fungi found in hallux nails of university students from Cali, Colombia. Mycopathologia 2007; 163: 321-325.
23. **Hashemi SH, Gerami M, Zibafar E, Daei M, Moazeni M, Nasrollahi A.** Onychomycosis in Tehran: Mycological study of 504 patients. Mycoses 2009; 53: 251-255.
24. **Souza LKH, Fernandez OFL, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Silva MRR.** Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil. Mycoses 2009; 53: 68-71.
25. **Sanclemente G, Mahecha M, Guzmán C.** Enfermedades de la piel más frecuentes en la consulta externa dermatológica del Hospital San Vicente de Paúl y del Hospital Infantil, Medellín 1999. Act Med Colomb 2001; 26: 240-244.

26. Gupta A, Jain H, Lynde C, Watteel G, Summerbell R. Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patients visiting dermatologists' offices in Ontario, Canada –a multicenter survey of 2001 patients. *Int J Dermatol* 1997; 36: 783-787.
27. Schlefman BS. Onychomycosis: A compendium of facts and a clinical experience. *J Foot Ankle Surg* 1999; 38:290-302.
28. Roberts MM, Rogers TR, Warnock DW, Warren RE. Fortnightly Review: Fungal nail disease: a guide to good practice (report of a working group of the British Society for Medical Mycology) *BMJ* 1995; 311:1277-1281.
29. Álvarez MI, González LA, Castro LA. Onychomycosis in Cali, Colombia. *Mycopathologia* 2004; 158: 181-186.
30. Ray TI, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 1990; 58: 508-514.
31. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 479-504.
32. Rugeles J, Vásquez JL, Jaramillo E, Orozco B, Estrada S, Ospina S. Etiología y características clínicas de la onicomycosis en un grupo de pacientes inmunosuprimidos. *Infectio* 2001; 5: 7-13.
33. Zuluaga A, De Bedout C, Tabares A, Cano LE, Restrepo A, Arango M. Comportamiento de los agentes etiológicos de las onicomycosis en un laboratorio de micología de referencia (Medellín 1994-2003). *Med Cutan Iber Lat Am* 2005; 33: 251-256.
34. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 606-625.
35. Enache-Angoulvant A. Reglas de interpretación de las infecciones por *Candida*. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41: 587-593.
36. Van Asbeck E, Clemons K, Stevens D. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 2009; 35: 283-309.
37. Carrillo-Muñoz A, Tur-Tur C, Hernández-Molina J, Santos P, Cárdenes D y Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Rev IberoamMicol* 2010; 27: 49-56.
38. Korting HC, Ollert M, Georgi A and Froschl M. In vitro susceptibility and biotypes of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1998; 26: 2626-2631.
39. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 80-96.
40. Johnson LB, Kaufmann CA. Voriconazole: A new triazole agent. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 630-637.
41. FICA A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev Chil Infect* 2004; 21: 26-38.
42. Carrillo-Muñoz A, Guarro G, Quindós G, Guardia O. In vitro activity of voriconazole against dermatophytes, *Scopulariopsis brevicaulis* and other opportunistic fungias agents of onychomycosis. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 157-161.
43. Carrillo-Munóz A, Pemán J, Gobernado M. Nuevos antifungicos. *Rev Esp Quimioter* 1999; 12: 181-204.
44. Johnson E, Szekely A, Warnock D. In vitro activity of Syn-2869, a novel triazole agent, against emerging and less common mould pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1260-3126.
45. Scheinfeld N. A review of the new antifungals: Posaconazole, micafungin, and anidulafungin. *J Drugs Dermatol* 2007; 6: 1249-1251.
46. Wildfeuer A, Seidl HP, Paule I, Habereiter A. In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseo-fulvin. *Mycoses* 1998; 41: 309-319.
47. Relloso S, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Walker L, Agorio I, Reyes S, Giusiano G, Rojas F, Flores V, Capece P, Posse G, Nicola F, Tutzer S, Bianchi M. Onicomycosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. *Rev Iberoam Micol* 2012; 29:157-163.