



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
CAJAMARCA**



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

**FRECUENCIA DE MUTACIONES DEL GEN *ERG11* EN *Candida albicans*
RESISTENTES AL FLUCONAZOL, PROCEDENTES DEL HOSPITAL II
ESSALUD DE CAJAMARCA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. MANUEL ORLANDO CARBONELL VIGO

ASESOR:

Dr. Blgo. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CAJAMARCA – PERÚ

2022

COPYRIGHT©
MANUEL ORLANDO CARBONELL VIGO
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Carbonell, M. 2022. **Frecuencia de mutaciones del gen ERG11 en *Candida albicans* resistentes al fluconazol, procedentes del Hospital II EsSalud de Cajamarca**/Manuel Orlando Carbonell Vigo.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –
UNC 2023

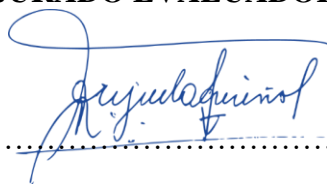
**FRECUENCIA DE MUTACIONES DEL GEN ERG11 EN *Candida albicans*
RESISTENTES AL FLUCONAZOL, PROCEDENTES DEL HOSPITAL II
ESSALUD DE CAJAMARCA**

AUTOR: Bach. Manuel Orlando Carbonell Vigo

ASESOR: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

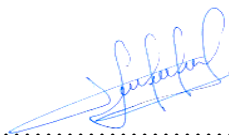
Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR

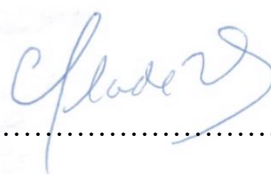


.....
Presidente

Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos



.....
Secretario
Luis Felipe Valdez Nuñez



.....
Vocal
Consuelo Belania Plasencia Alvarado

Cajamarca, 2023 - Perú



MODALIDAD "A"

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

En Cajamarca, siendo las 05:02 pm del 15 de febrero del año 2023, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 1D-106 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Frecuencia de mutaciones del gen ERG11 en *Candida albicans* resistentes al fluconazol, procedentes del Hospital II EsSalud de Cajamarca", del Bachiller en: Ciencias Biológicas Manuel Orlando Carbonell Vigo.

Siendo las 06:00 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: **APROBADO – MUY BUENO**, con el calificativo de **18**, con lo cual el Bachiller en Ciencia Biológicas se encuentra **APTO** para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Jurado Evaluador:

Presidente: M.Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos

Secretario: M.Cs. Luis Felipe Valdez Nuñez

Vocal: Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

.....
Presidente

Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos

.....
Asesor

Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

.....
Secretario

Luis Felipe Valdez Nuñez

.....
Tesisista

Manuel Orlando Carbonell Vigo

.....
Vocal

Consuelo Belania Plasencia Alvarado

Agradecimiento

En primer lugar, a Dios, a mis padres y hermanos, que son siempre el motor que impulsan mis sueños y esperanzas, quienes han sido mis mejores guías de vida, hoy les dedico este logro por su apoyo incondicional, amistad y consejos que me brindaron durante todo este importante trayecto, el cual se convierte en una meta más conquistada.

Al Dr. Marco Rivera, sin usted y sus virtudes, este trabajo no lo hubiese logrado tan fácil. Sus consejos y sus enseñanzas fueron siempre útiles en el momento que las ideas no salían de mi pensamiento para escribir lo que hoy he logrado. Gracias por sus orientaciones y aportes profesionales.

Al Dr. Víctor Llontop, por brindarme los aislamientos necesarios para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Mblgo. Jorge Bazán y al Mblgo. Daniel Cornejo, por brindarme un ambiente en su laboratorio en un momento de difícil acceso a la universidad.

A mis compañeros y amigos de trabajo Lic. Elisa Segura y Lic. Fernando Villareal por su apoyo y sus consejos en un momento en el que la duda se hacía presente.

A Yanela Mantilla, quien me apoyó, motivó y presionó a poder avanzar.

A todos ellos, y a varios más que no he podido mencionar, muchas gracias.

Tabla de contenido

Título.....	ix
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Antecedentes de la investigación	3
2.2 Bases teóricas (Marco Teórico y Conceptual)	5
2.2.1 Características de <i>Candida</i>	5
2.2.2 Antifúngicos para el tratamiento de <i>C. albicans</i>	6
2.2.3 Fluconazol.....	10
2.2.4 Resistencia a los antimicóticos en <i>C. albicans</i>	11
2.2.5 Mecanismos de resistencia a Fluconazol.....	12
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	15
3.1. Nivel de Investigación	15
3.2. Tipo y diseño de estudio	15
3.3. Material de estudio	15
3.4. Unidad de estudio.....	15
3.5. Colección de muestras	15
3.6. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	16
3.6.1. Descripción clínica del aislamiento	16
3.6.2. Caracterización microbiológica de los aislamientos.....	16
3.6.3. Prueba de sensibilidad frente al fluconazol	16

3.6.4. Secuenciación de los genes 18S ARNr y <i>ERG11</i> y análisis bioinformático	17
3.7. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 Resultados	20
4.1.1 Características clínicas de los aislamientos de <i>Candida albicans</i>	20
4.1.2 Determinación de susceptibilidad frente a fluconazol.....	22
4.1.3 Identificación molecular y análisis filogenético de los aislamientos	23
4.1.4 Análisis de las mutaciones en el gen <i>ERG11</i>	26
4.2 Discusión.....	31
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	36
LISTA DE REFERENCIAS	37
APÉNDICES	45

Glosario

Mutación silenciosa

Es aquel cambio que se da de manera permanente en la secuencia de ADN en la que se produce una sustitución de un nucleótido por otro pero que no altera directamente a la secuencia de aminoácidos ya que se traduce a un mismo aminoácido dentro del código genético (1).

Código genético

El código genético es una serie de instrucciones que se encuentra codificada en el material genético e indican a las células como producir ciertas proteínas y la secuencia de aminoácidos a utilizar. El código genético está compuesto por un codón que es una secuencia de tres nucleótidos de ADN o ARN que codifican un aminoácido específico (2).

**FRECUENCIA DE MUTACIONES DEL GEN *ERG11* EN *Candida albicans*
RESISTENTES AL FLUCONAZOL, PROCEDENTES DEL HOSPITAL II
ESSALUD DE CAJAMARCA**

Resumen

En este estudio se determinó la frecuencia de mutaciones en el gen *ERG11* en aislamientos clínicos de *C. albicans* resistentes a fluconazol, provenientes de pacientes de diferentes servicios del Hospital II EsSalud de Cajamarca. En un periodo de 8 meses se colectó 98 aislamientos preliminarmente nombrados como *Candida* spp. por el Laboratorio de Microbiología del Hospital II EsSalud, además se obtuvo los datos clínicos de los pacientes en una ficha de datos. 62 de los aislamientos fueron identificados como *C. albicans* en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca empleando la prueba del tubo germinativo a los cuales se evaluó su sensibilidad al disco de fluconazol (25 µg) siguiendo procedimientos estándar; los aislamientos resistentes al antifúngico fueron identificados mediante el análisis de las secuencias del gen 18S ARNr. Para el análisis de las mutaciones causantes de la resistencia a fluconazol también se secuenció el gen *ERG11* empleando primers específicos. Los resultados demuestran que el 19 % de los aislamientos de *C. albicans* presentaron resistencia, siendo las muestras de secreción vaginal de donde se obtuvieron el mayor número de aislamientos resistentes (59 %) seguidas de las muestras de aspirado bronquial (33 %) y muestras de esputo (8 %). El análisis de las secuencias nucleotídicas y de las traducidas del gen *ERG11* de los 12 aislamientos reveló 73 mutaciones, y sólo 3 (25 %) de los aislamientos resistentes presentaron mutaciones antes reportadas y asociadas a la resistencia a fluconazol.

Palabras claves: *Candida albicans*, *ERG11*, resistencia a fluconazol, mutación.

Abstract

In this study, the frequency of mutations in the *ERG11* gene in clinical isolates of *C. albicans* from patients from different services of Hospital II EsSalud in Cajamarca was determined. In a period of 8 months collected 98 isolates preliminarily named as *Candida* spp. by the Microbiology Laboratory of Hospital II EsSalud were collected, in addition the clinical data of the patients were obtained in a date sheet. 62 of the isolates were identified as *C. albicans* in the Microbiology Laboratory of the National University of Cajamarca using the germinative tube test to which were evaluated their sensitivity to the fluconazole disc (25 µg) was evaluated following standard procedures; antifungal-resistant isolates were identified by analyzing the sequences of the 18S rRNA gene. For the analysis of mutations causing resistance to fluconazole, the *ERG11* gene was also sequenced using specific primers. The results show that 19 % of the isolates of *C. albicans* presented resistance, with the vaginal secretion samples from which the greatest number of resistant isolates were obtained (59 %) followed by bronchial aspirate samples (33 %) and sputum samples (8 %). Analysis of nucleotide sequences and of the translated sequences of the *ERG11* gene from the 12 isolates revealed 73 mutations, and only 3 (25 %) of the resistant isolates had mutations previously reported and associated with resistance to fluconazole.

Key words: *Candida albicans*, *ERG11*, fluconazole resistance, mutation.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Candida albicans es un microorganismo comensal que puede habitar en el tracto gastrointestinal, el sistema genitourinario, la piel y las mucosas respiratorias, bajo ciertas condiciones, esta levadura puede causar diversas infecciones, clasificadas como infecciones oportunistas. Cuando el sistema inmunitario humano se debilita, las levaduras se multiplican más rápidamente y adquieren un comportamiento patógeno, capaz de provocar enfermedades en cualquiera de los órganos y tejidos, causando enfermedades superficiales, invasivas y sistémicas con alta morbilidad y mortalidad (3).

Los tratamientos para combatir la candidiasis son tópicos o sistémicos, según el tipo de infección, y los fármacos antifúngicos más utilizados son los derivados imidazólicos (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, etc.), pese a que se ha constatado la disminución de la eficacia de estos fármacos (4). El fenómeno de la resistencia a estos fármacos se debe principalmente a la prescripción irracional de fármacos antifúngicos como profilaxis, al uso prolongado de los mismos y al aumento de las dosis terapéuticas (5–7).

Se han dilucidado varios mecanismos moleculares por los cuales *C. albicans* desarrolla resistencia a los medicamentos antimicóticos. Los medicamentos azólicos, incluido el fluconazol, se dirigen a la lanosterol 14a-desmetilasa, el producto del gen *ERG11*. La resistencia a los fármacos antimicóticos se ha asociado con mutaciones puntuales y la sobreexpresión del gen *ERG11* (6,8).

La resistencia representa un problema de salud pública esto debido a que incrementa los costos ya que los pacientes deberán prolongar de su estadía hospitalaria, los médicos optan por el incremento del uso de antimicóticos y con ello incrementan los microorganismos resistentes, y consecuencia de todo ello aumenta el índice de mortalidad.

En este sentido lo que se buscó en el presente trabajo fue determinar la frecuencia con la que los aislamientos de *C. albicans* resistentes a fluconazol presentan mutaciones en el gen *ERG11*, evidenciado en el análisis molecular y bioinformático de las secuencias, que desencadenan cambios estructurales en la proteína produciendo la resistencia antifúngica de los aislamientos provenientes de muestras clínicas de pacientes del Hospital II EsSalud-Cajamarca.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

White T. y cols. (2002), buscaron identificar los mecanismos moleculares de resistencia a antifúngicos de la clase azoles en 38 aislamientos clínicos de *C. albicans* de 12 hospitales en California (USA, Estados Unidos de Norteamérica); las pruebas de susceptibilidad se realizaron mediante el método de macrodilución en caldo, el análisis de las secuencias génicas provenientes de una PCR indicaron y enfatizaron la diversidad de mecanismos que pueden dar como resultado un fenotipo de resistencia a los azoles como las mutaciones puntuales en el gen *ERG11* (8).

Gutiérrez C. y cols. (2007), buscaron determinar la sensibilidad al fluconazol y al voriconazol en *Candida* spp. aislados de 54 pacientes en Colombia, la determinación de la sensibilidad se realizó mediante la técnica de difusión en agar, los resultados evidenciaron que el 72.9 % de aislamientos de *Candida* spp. mostraron sensibilidad al fluconazol, el 6.3 % fue sensible dependiente de la dosis y el 20.8 % mostró resistencia; para el voriconazol, el 89.6 % fue sensible, el 8.3 % mostró sensibilidad dependiente de la dosis y el 2.1 % presentó resistencia (9).

Fuentes M. y cols. (2014), buscaron caracterizar los mecanismos de resistencia involucrados en la resistencia a azoles en aislamientos clínicos de *C. albicans*; entre ellos, ocho aislamientos resistentes, nueve susceptibles dependientes de la dosis y 10 sensibles, que se aislaron de flujo vaginal y orina; la presencia de mutaciones del gen *ERG11* se evaluó por secuenciación, y la expresión relativa del gen *ERG11* y de los genes de bombas de eflujo *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* fue evaluada por PCR cuantitativa.

No se encontró mutaciones en el gen *ERG11* y la sobreexpresión de este solo se presentó en el 12,5 % de las aislamientos resistentes, el mecanismos de mayor prevalencia fue la sobreexpresión de bombas de eflujo encontrándose en 62,5 % de las aislamientos resistentes(10).

Rodríguez L. y cols. (2017), buscaron describir la incidencia, microbiología y presentación clínica de las infecciones del torrente sanguíneo causadas por especies de *Candida* en tres hospitales de Lima-Callao, también se realizaron pruebas de sensibilidad para la anfotericina B, fluconazol, posaconazol, voriconazol y anidulafungina mediante el método de microdilución en caldo, obteniendo como resultado que solo cuatro (2.5 %) aislamientos fueron resistentes al fluconazol, 86.7 % (n = 137) fueron susceptibles y 17 (10.8 %) fueron susceptibles dosis dependientes. También se observó una disminución de la susceptibilidad al posaconazol en tres aislamientos, y uno al voriconazol. Todos los aislamientos fueron susceptibles a anidulafungina y anfotericina B (11).

Villanueva F. y cols. (2020), buscaron determinar las características de los aislamientos de origen fúngico aisladas de sangre y medula ósea en pacientes oncológicos hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas en un periodo de 5 años, en donde encontraron que *C. albicans* fue el segundo microorganismos causante de fungemias con el 22.5 % de todos los aislamientos, precedido por *C. tropicalis* (47.0 %), esto determinó que las fungemias son causadas principalmente por *C. tropicalis* en pacientes con neoplasias hematológicas con neutropenia, mientras que las fungemias causadas por *C. albicans* se desarrollaban principalmente en pacientes con tumor solido sin neutropenia, el cuál aumentaba conforme se incrementaba la edad del paciente (12).

Zurita S. (2018), describe en su revisión que el 80 % de infecciones oportunistas son producidas por especies del género *Candida*, siendo *C. albicans* la especie más importante colonizando las mucosas del tracto intestinal (50-70 %), la boca (30-50 %), los genitales femeninos (5-30 %) y la piel (4-7 %); en Perú se ha reportado que el 39 % de las candidemia es producida por *C. albicans*, la cual alcanza hasta el 3 % de aislamiento resistentes, esto debido al uso de masivo de antifúngicos tanto de forma preventiva como terapéutica (13).

2.2 Bases teóricas (Marco Teórico y Conceptual)

2.2.1 Características de *Candida*

Candida spp. es un grupo heterogéneo de microorganismos fúngicos que poseen una morfología de levadura unicelular de 3 a 5 μm y están relacionados ecológicamente con organismos de sangre caliente con una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. Este hongo puede tener dos formas diferentes: una forma de levadura llamada conidios de esporas, o una forma filamentosa llamada pseudohifas e hifas. La forma esporangial se ha descrito como la forma comensal de *Candida*, mientras que la forma filamentosa se asocia con procesos patogénicos (14).

C. albicans es una levadura diploide con una fase haploide y el cual se reproduce de manera asexual. Su genoma consta de 8 pares de cromosomas, nombrados del 1 al 7, y R, que miden 32 Mb y contienen un total de 12405 ORF's (open reading frames) (15).

En general, se ha encontrado que *C. albicans* coloniza simbióticamente entre el 30 y el 60 % de los humanos, y puede encontrarse en el tracto gastrointestinal (50 a 70 %), la mucosa oral (30 a 50 %), la mucosa vaginal (5 a 30 %) y/o la

piel de muchas personas sanas (4-7 %); sin embargo, bajo ciertas condiciones, como cambios de temperatura, pH y/o inmunidad del huésped, puede causar infección (14, 16).

2.2.2 Antifúngicos para el tratamiento de *C. albicans*

Los agentes antifúngicos o agentes antimicóticos son compuestos naturales o sintéticos que pueden inducir cambios en la estructura básica de las células fúngicas, inhibir su desarrollo y alterar su viabilidad. Para *Candida*, los agentes antimicóticos tienen una variedad de efectos secundarios, por lo que se necesita una terapia antimicótica adecuada que cubra de manera efectiva las especies de *Candida* identificadas y que considere un perfil de seguridad apropiado para el tipo de paciente que se está tratando (14).

Varias familias de fármacos antifúngicos están actualmente en el mercado, pero difieren en su estructura química y mecanismo de acción.

Los principales grupos de antifúngicos y sus mecanismos de acción se describen a continuación, según su blanco de acción:

Sobre la membrana celular del hongo

El ergosterol es el componente principal de la membrana de la célula fúngica el cual desempeña un papel biorregulador otorgándole a la membrana fluidez, asimetría e integridad (17).

Polienos

Los medicamentos que se encuentran en este grupo son fungicidas los cuales se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana y permite la pérdida de

proteínas, azúcares y cationes monovalentes y divalentes, causando la muerte celular. Este grupo incluye a la Anfotericina B y Nistatina (6, 18).

Azoles

Los azoles son compuestos heterocíclicos con propiedades antifúngicas los cuales se dividen ampliamente en dos grupos, los imidazoles y los triazoles. Los imidazoles contienen dos átomos de nitrógeno en el anillo de azol e incluyen los agentes antifúngicos clotrimazol, econazol, ketoconazol, miconazol y tioconazol. Los triazoles contienen tres átomos de nitrógeno en el anillo de azol e incluyen fluconazol, itraconazol, voriconazol, isavuconazol y posaconazol. El fluconazol es el azol más utilizado durante la terapia. Los triazoles de segunda generación, como el voriconazol, el posaconazol y el isavuconazol, son más efectivos contra los patógenos resistentes (6).

Los azoles son los fármacos antimicóticos más usados para el tratamiento y la prevención de infecciones por *Candida* spp. los cuales bloquean la síntesis de ergosterol uniéndose a la enzima 14 α -desmetilasa (*ERG11p*), del citocromo P-450, una enzima importante en la biosíntesis de ergosterol. La inhibición del *ERG11p* permite que otras enzimas presentes en la vía (Erg6p, Erg25p, Erg26p, Erg27p y Erg3p) empiecen a sintetizar esteroides tóxicos fungistático (14 α -metilergosta-8-24-dienol), esto además, de elevar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo (6, 18, 19).

Alilaminas

Trabajan de forma similar a los azoles, teóricamente inhiben la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del

ergosterol. Las alilaminas que se une a la enzima escualeno epoxidasa (Erg1p), que junto a la enzima escualeno ciclasa convierte el escualeno en ergosterol, y al inhibirse disminuye la concentración de ergosterol y aumenta los niveles de escualeno, incrementando la permeabilidad de la membrana celular e interrumpiendo la organización celular disminuyendo el crecimiento del hongo. Dentro de este grupo tenemos los antimicóticos: terbinafina flunarizina y naftifina (6, 17, 18).

Morfolinas

Esta clase de fármacos incluyen fenpropimorf, tridemorf y amorolfina. Se dirigen a la enzima biosintética ergosterol C-14 esterol reductasa (Erg24p) que agota el ergosterol y causa que el ignosterol se acumule en la membrana citoplasmática de los hongos. La amorolfina se usa ampliamente en la agricultura y es altamente tóxica para los humanos. Para tratar las infecciones por dermatofitos de las uñas, solo se usa esmalte de uñas que contiene clorhidrato de amorolfina al 5 % (6).

Sobre la pared celular

Equinocandinas

Las equinocandinas son lipopéptidos hidrosolubles que fueron descubiertos en 1974, correspondientes a lipopéptidos hexapeptidos N-acetilados que poseen una longitud variable de ácidos grasos, los cuales actúan mediante la inhibición no competitiva de la UDP-glucosa β -(1,3)-D-glucano- β -(3)-D-glucosiltransferasa (conocida como 1,3- β -D glucano sintasa), una enzima necesaria para la síntesis de 1,3- β -D glucano, que es un componente esencial de la pared celular de varias

especies de hongos, dirigiéndose específicamente al gen *FKS*, el cual codifica componentes de la glucano sintasa (20–22).

La inhibición de esta enzima ocasiona la disminución de la síntesis de glucano haciendo que la célula entre en fase de inestabilidad osmótica y posteriormente conlleve a su muerte. La importancia de este grupo de fármacos radica en la especificidad que presenta pues no interactúa con las células de los mamíferos porque no poseen pared celular. Dentro de este grupo podemos encontrar a la anidulafangina, la caspofungina y la micafungina (20).

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

Flucitocina

Es un antifúngico que es transportado al citoplasma de la célula por la citocina permeasa e interfiere con el metabolismo de las pirimidinas, del ARN/ADN y con la síntesis de proteínas. La flucitosina es convertida en 5-fluorouracilo por la citosina desaminasa, y posteriormente, por la UMP pirofosforilasa es convertida en ácido 5-fluorouridílico, que se fosforila y se incorpora en el ARN, lo que da como resultado la interrupción de la síntesis de proteínas. Adicionalmente, el 5-fluorouracilo también es convertido en 5-fluorodeoxiuridina monofosfato el cual es un potente inhibidor de la timidilato sintasa que es una enzima que está involucrada en la síntesis de ADN y en el proceso de la división nuclear (17, 18).

Inhibidores de la síntesis de proteínas

Sordarinas

El grupo de las sordarinas fueron aisladas en 1971, las cuales son antifúngicos que inhiben la síntesis de proteínas que actúan bloqueando la función de traducción fúngica (17, 23).

Inhibidores de la síntesis de microtúbulos

Griseofulvinas

Estos antifúngicos inhiben la mitosis al interrumpir el huso mitótico al interferir con la producción de microtúbulos intracelulares necesarios para la mitosis celular (17, 18).

2.2.3 Fluconazol

Es un antifúngico que pertenece al grupo de los azoles, concretamente a la clase de los triazoles, posee 2 anillos que contienen 3 átomos de nitrógeno y un anillo bencénico con 2 átomos de flúor. Su peso molecular es relativamente bajo, 306.3 Da. Es una molécula polar y simétrica lo que favorece su hidrosolubilidad. Su aspecto es de polvo blanco y cristalino, es una base extraordinariamente débil (pKa 3,7) y no ionizable a pH fisiológico (18).

El fluconazol inhibe la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa del citocromo P450, el cual es codificado por el gen *ERG11* en la vía de síntesis del ergosterol, en donde el átomo de nitrógeno que se encuentra libre en el anillo del azol se une al átomo de hierro del grupo Hemo de la enzima, lo que provoca que no se dé la activación del oxígeno y la desmetilación del lanosterol, inhibiendo así la biosíntesis del ergosterol, un componente importante de las membranas celulares

de las levaduras; esta inhibición se vuelve tóxica ya que los esteroides metilados se acumulan en la membrana celular de las levaduras y se detiene el crecimiento celular (24).

Debido a su excelente solubilidad en agua, es adecuado para administración intravenosa y tiene una excelente permeabilidad a los fluidos corporales. El fármaco puede asociarse con el sitio activo de la enzima a través de un enlace de hidrógeno entre el grupo C=O de la enzima y el grupo OH del fármaco (una interacción con una fuerza de aproximadamente 5 kcal/mol) (18).

El efecto del fluconazol contra los hongos es fungistático. Su rango de actividad incluye *C. albicans* y otras especies de *Candida* excepto *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. ciferri* y *C. inconspicua*. El 50% de los aislamientos de *C. glabrata*, casi el 50% de los aislamientos de *C. famata* y el 10% de los aislamientos de *C. tropicalis* son parcial o completamente resistentes. También es eficaz contra *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, dermatofitos y *Malassezia farfur*. El metabolismo tiene lugar en el hígado y la excreción en los riñones (24, 25).

2.2.4 Resistencia a los antimicóticos en *C. albicans*

La resistencia a los antifúngicos se define como el crecimiento del hongo a dosis normales de agentes antifúngicos, pero se inhibe con concentraciones más altas. Esto conduce a la resistencia clínica, definida como el crecimiento microbiano a pesar del uso de antifúngicos, que se asocia con una alta probabilidad de fracaso del tratamiento. En otras palabras, los patógenos no se pueden suprimir en dosis normales, pero se pueden suprimir en concentraciones altas que son peligrosas para los pacientes (5).

Todo esto llevó a clasificar la resistencia a los antifúngicos en tres tipos:

Resistencia primaria que se desarrolla en microorganismos que nunca han estado expuestos al fármaco en cuestión. Resistencia secundaria o resistencia adquirida que se desarrolla solo después de la exposición a un fármaco. Resistencia intrínseca en donde todos o casi todos los aislamientos son resistentes a fármacos específicos, por ejemplo, resistencia de *Candida krusei* al fluconazol (26).

El uso a largo plazo de fungistáticos azólicos, como el fluconazol, puede hacer que la levadura patógena desarrolle resistencia, lo que hace que los medicamentos sean menos efectivos. El fluconazol es el azol más utilizado para la prevención y el tratamiento de infecciones por *Candida*, sin embargo, algunas especies de *Candida* han desarrollado resistencia a los azoles, un problema emergente que conduce al fracaso del tratamiento. Por ejemplo, la resistencia de *C. albicans* se convirtió en un problema grave en la década de 1990, cuando el 90 % de los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) tenían candidiasis oral, muchos se sometieron a una terapia prolongada con azoles y ciertas poblaciones de pacientes desarrollaron resistencia (6).

2.2.5 Mecanismos de resistencia a fluconazol

Varios mecanismos diferentes pueden estar involucrados en el desarrollo de resistencia a fluconazol en *C. albicans*, estos incluyen alteraciones en la vía biosintética de esteroides, sobreexpresión del gen *ERG11*, que codifica la enzima objetivo del fármaco 14 α -lanosterol desmetilasa (14DM), mutaciones puntuales en el gen *ERG11* dan como resultado una menor afinidad de la enzima 14DM por el fluconazol, y la reducción de la acumulación intracelular del fármaco que

se correlaciona con la sobreexpresión de proteínas de transporte de membrana (27).

Alteraciones en la vía de biosíntesis de esteroides.

La inhibición de 14DM por fluconazol conduce no solo al agotamiento del ergosterol, sino también a la acumulación del esteroil metilado 14 α -metil-diolergosta-8,24-dieno-3 β ,6 α -diol, que inhibe la proliferación celular. Las alteraciones en la vía biosintética de esteroides que impiden la acumulación de este esteroil inhibidor del crecimiento en presencia de fluconazol podrían causar resistencia a fluconazol. La inactivación de esteroil C-5,6-esteroil desaturasa (ERG3), una enzima que actúa en el paso previo a 14DM de la vía biosintética del ergosterol, presumiblemente permite el incremento de 14 α -metilfecosterol, en lugar del ergosterol lo que permite el crecimiento de la célula fúngica en presencia de azoles (5, 27, 28).

Mutaciones en el gen *ERG11* que codifica la enzima diana del fármaco, 14DM

Una causa común de la resistencia a los medicamentos son las mutaciones que conducen a cambios en los aminoácidos y, por lo tanto, en la estructura de la enzima diana (14 α -lanosterol demetilasa), lo que reduce la unión del fármaco sin alterar su función (27). Para identificar alteraciones en la 14DM que pueden causar resistencia al fluconazol, varios investigadores compararon las secuencias del gen *ERG11* de aislamientos de *C. albicans* resistentes al fluconazol con las de los aislamientos sensibles a fluconazol y las secuencias publicadas del gen *ERG11*. En comparación con la secuencia *ERG11* publicada, en un estudio, se encontraron sustituciones de aminoácidos en F105L, E266D, K287R, G448E, G450E, G464S y V488I solo en aislados resistentes a fluconazol, pero no en

aislados susceptibles (29). Actualmente se han reportado más de 160 sustituciones de aminoácidos en aislamientos fúngicos resistentes que dan lugar a la resistencia (30).

Sobreexpresión del gen *ERG11*

En presencia de fluconazol, *C. albicans* aumenta la expresión del gen *ERG11*, probablemente como un mecanismo de retroalimentación para compensar la deficiencia de ergosterol, el cual activa la sobreexpresión de los genes *ERG3* y *ERG11* por los factores de transcripción UPC2p y Ecm22p. Esta sobreexpresión constitutiva de *ERG11* contribuye a la resistencia a fluconazol, aunque en menor medida que las mutaciones, ya que el aumento de la producción de ergosterol diluye la actividad del fluconazol dando como resultado la resistencia (24, 27, 31).

Sobreexpresión de genes que codifican bombas de salida

Un mecanismo clave de la resistencia al fluconazol es la disminución de la acumulación intracelular del fármaco mediante la salida de este a través de proteínas de transporte. Existe dos tipos de proteínas de transporte: la superfamilia de facilitadores principales (por sus siglas en inglés: MFS) y la familia de casetes de unión a ATP (por sus siglas en inglés: ABC) (24).

Los genes *CDR1* y *CDR2* altamente homólogos codifican proteínas transportadoras de tipo ABC que utilizan adenosina trifosfato (ATP) como fuente de energía, y los genes *MDR1* y *MDR2* (resistencia a múltiples fármacos) y *FLU1* (resistencia a fluconazol) codifican un facilitador importante el cual utiliza el gradiente de protones a través de la membrana y la sobreexpresión de estos genes da un impulso para el transporte de fluconazol fuera de las células (27, 31).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación

Descriptivo

3.2. Tipo y diseño de estudio

Diseño descriptivo, observacional y de una sola casilla.

3.3. Material de estudio

98 aislamientos de *Candida* spp., provenientes del Hospital II EsSalud de Cajamarca obtenidos durante los años 2019 y 2021.

3.4. Unidad de estudio

Cada uno de los aislamientos de *Candida* spp. colectados del Hospital II EsSalud de Cajamarca

3.5. Colección de muestras

Los aislamientos de *Candida* spp. fueron recolectados de muestras de pacientes que se atendieron en el Hospital II EsSalud de Cajamarca a través del Laboratorio de Microbiología y se transportaron en cadena de frío al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.6. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.6.1. Descripción clínica del aislamiento

Para caracterizar los aislamientos se elaboró una ficha de recolección de datos con la cual se obtuvo la siguiente información: código, fecha de cultivo, origen (hospitalario o ambulatorio), servicio hospitalario, tipo de muestra clínica (p.ej. orina, sangre, hisopados, etc.), sexo y edad de la persona (Apéndice 1).

3.6.2. Caracterización microbiológica de los aislamientos

- **Siembra en Agar Saboraud Dextrosa (16)**

Las muestras recolectadas se sembraron por agotamiento en ASD y se incubó a 37°C por 24 h, se comprobó la pureza de las colonias al observar crecimiento aislado y se observó en preparados en fresco con ayuda del microscopio bajo objetivo de 40x.

- **Prueba de tubo germinativo (18)**

Una porción de una colonia se emulsionó en 0,5 ml de suero humano y se incubó a 35°C durante 2 horas. Luego se depositó una gota de la emulsión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, se colocó un cubreobjetos y se observó en microscopio de luz bajo objetivo de 40x buscando evidenciar la presencia del tubo germinativo que caracteriza a la especie de *C. albicans*.

3.6.3. Prueba de sensibilidad frente al fluconazol (19)

Esta prueba se aplicó a todos los aislamientos que fueron positivos a la prueba de tubo germinativo, por tanto, preliminarmente identificados como *C. albicans*.

A partir de un cultivo de 24 horas a 35 °C en ASD se realizaron suspensiones de cada uno de los cultivos que mostraron desarrollo de tubo germinativo en

solución fisiológica estéril, la cual se ajustó por comparación con el patrón 0.5 de los estándares de turbidez de McFarland equivalente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL.

Utilizando un hisopo estéril se inoculó la suspensión en la superficie de una placa con agar Müller Hinton tratando de cubrir por completo la superficie del agar de manera uniforme. Se colocaron los discos de fluconazol (25µg) y se incubó a 35 °C durante 20-24 horas. En los casos de escaso crecimiento a las 24 horas se continuó la incubación hasta las 48 horas (Apéndice 2).

Se midió el halo de inhibición y se interpretaron los resultados utilizando los puntos de corte descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Puntos de corte en mm para la prueba de sensibilidad a fluconazol en *C. albicans*.

Antifúngico	Carga del disco	Diámetro (mm)		
		R	S-DD	S
Fluconazol	25 µg	≤14	15-18	≥19

S, sensible. S-DD, sensible dependiendo de la dosis. R, resistente.

Modificado de Khan, M. y cols. (33)

3.6.4. Secuenciación de los genes 18S ARNr y *ERG11* y análisis bioinformático

Todos los aislamientos resistentes a fluconazol, a partir de cultivos de 24 horas a 35 °C en ASD se suspendieron en caldo BHI con glicerol al 20 % y fueron enviados a Macrogen (Corea del Sur) para la extracción de material genético y secuenciamiento bidireccional mediante el método de Sanger, de los genes 18S ARNr y *ERG11* (34).

Las secuencias del gen 18S ARNr fueron utilizadas para la identificación molecular de cada uno de los cultivos resistentes, utilizando el programa BLASTn del NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*) y mediante comparación de las secuencias con la base de datos *Nucleotide* del *GenBank*. Del resultado del BLASTn se seleccionaron secuencias FASTA con los mayores porcentajes de identidad para cada una de las secuencias de este estudio, se alinearon y editaron en el programa AliView 1.27 y se construyó un árbol filogenético con el programa MEGA XI, utilizando el método *Neighbor Joining* y un soporte estadístico de 1000 bootstrap.

Además, del mismo material genético, también se secuenció el gen *ERG11* utilizando *primers* específicos (14). Las secuencias del gen *ERG11* entregadas por Macrogen fueron sometidas a un proceso de edición en los programas Chromas y Aliview 1.27 (35) antes de su alineamiento con la secuencia del mismo gen de una cepa de *C. albicans* de tipo salvaje (Código de acceso: XM_711668.2) depositada en bases de datos públicas y de acceso libre del NCBI (36,37).

Utilizando el programa AliView 1.27 también se hizo la identificación de mutaciones en cada una de las secuencias de nucleótidos. Por último, se utilizó la herramienta *ORF finder* para la traducción de cada una de las secuencias, se eligió el marco de lectura (ORF) óptimo y luego se alineó con el ORF de la secuencia de la cepa salvaje de *C. albicans* utilizando también el programa AliView 1.27 para la identificación de mutaciones en las secuencias de aminoácidos correspondientes al gen *ERG11*.

3.7. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

La asociación de la frecuencia de los aislamientos resistentes con las variables categóricas, establecidas como grupos, fue determinada por análisis estadístico mediante la prueba de χ^2 , con un nivel de confianza de 95% y un $p < 0,05$ como significativo, empleando el paquete estadístico SPSS v. 23.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Características clínicas de los aislamientos de *Candida albicans*

Se recolectaron un total de 98 aislamientos clínicos provenientes de pacientes con diversas infecciones e identificados hasta el nivel de género como *Candida* spp en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II EsSalud de Cajamarca. De este total, 62 aislamientos fueron identificados preliminarmente como *C. albicans* mediante la prueba del tubo germinativo (Figura 1), en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, e incorporados a este estudio. Las principales características clínicas de estos aislamientos se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características clínicas de los aislamientos identificados como *C. albicans* obtenidas del Hospital II EsSalud-Cajamarca para este estudio

Característica	Frecuencia de aislamientos	Porcentaje por característica clínica
Sexo		
<i>Mujer</i>	48	77,4
<i>Hombre</i>	14	22,6
Tipo de atención		
<i>Ambulatoria</i>	39	62,9
<i>Hospitalaria</i>	23	37,1
Servicio Hospitalario		
<i>Ginecología</i>	27	43,5
<i>UCI</i>	23	37,1
<i>Medicina General</i>	9	14,5
<i>Pediatría</i>	3	4,8

Continuación de la tabla 2.

Tipo de muestra		
<i>Secreción vaginal</i>	30	48,4
<i>Aspirado bronquial</i>	10	16,1
<i>Secreción bronquial</i>	13	21
<i>Secreción faríngea</i>	4	6,5
<i>Espujo</i>	3	4,8
<i>Orina</i>	2	3,2

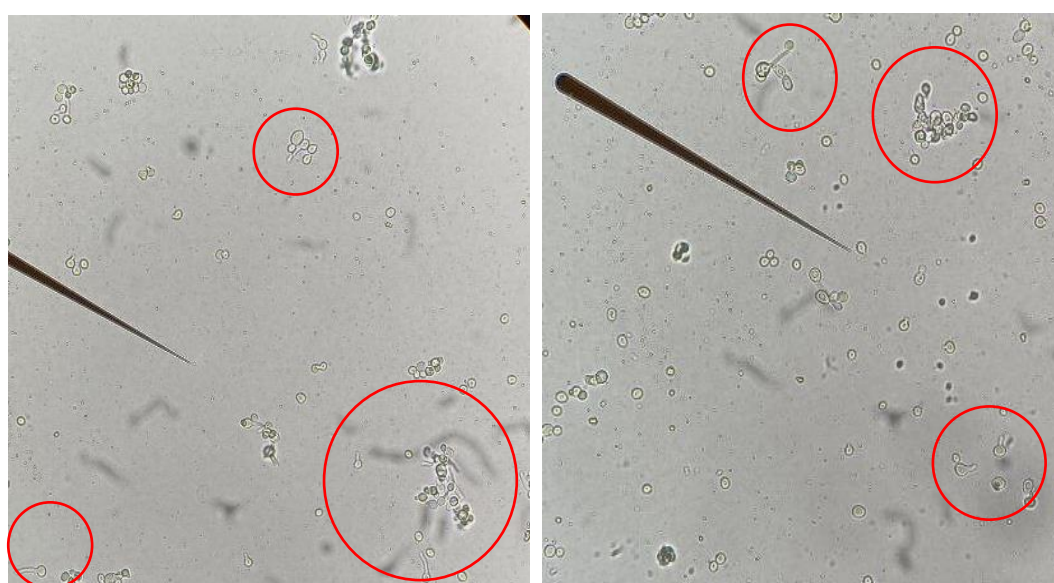


Figura 1. Identificación presuntiva de *C. albicans* mediante la presencia de tubo germinativo en preparados en fresco con suero. En los círculos en rojo se logra apreciar la presencia de tubo germinativo.

La distribución de frecuencias de *C. albicans* por género fue de: 77.4 % en mujeres y 22.6 % en varones; según el tipo de atención, el 62.9 % de aislamientos provinieron de pacientes atendidos a nivel ambulatorio mientras que el 37.1 % fue de origen hospitalario, siendo el servicio de ginecología de donde se obtuvieron la mayoría los aislamientos (43.5 %). La principal fuente de levaduras fueron las muestras de secreción vaginal con el 48.4 % de los aislamientos. Ninguna de las variables de agrupación (características clínicas) mostró asociación estadística con la resistencia al fluconazol, siendo en todos los casos el valor de $p > 0.05$.

4.1.2 Determinación de susceptibilidad frente a fluconazol

De los 62 aislamientos identificados como *C. albicans* y sometidos a la prueba de susceptibilidad frente a fluconazol sólo 12 aislamientos (19 %) presentaron resistencia a fluconazol y los 50 aislamientos (81 %) restantes fueron susceptibles (Figura 2) (Apéndice 3, Tabla 13).

Del mismo modo se identificó que el 59 % (7/12) de los aislamientos resistentes provinieron de muestras clínicas tipo secreción vaginal, el 33 % (4/12) de aspirado bronquial y sólo el 8 % (1/12) pertenecía a muestras de esputo (Gráfico 1), procedentes de Ginecología, UCI y Medicina general, respectivamente.

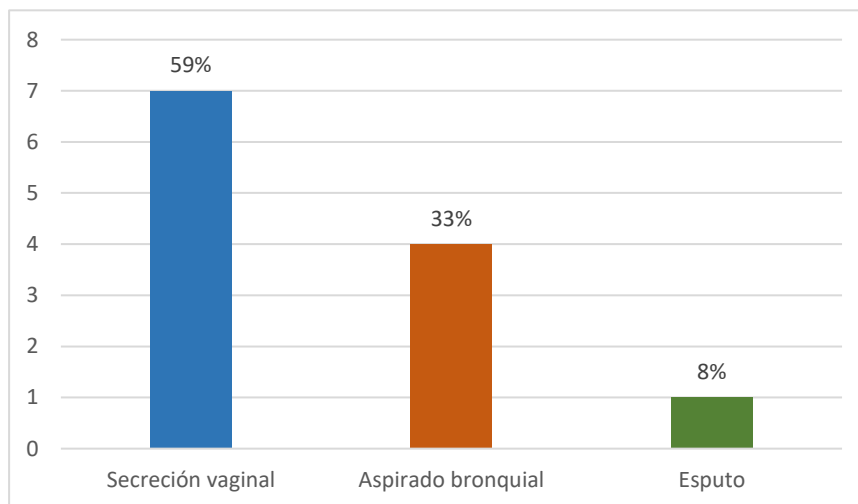


Gráfico 1. Distribución de frecuencias por tipo de muestra clínica de *C. albicans* resistente a fluconazol.

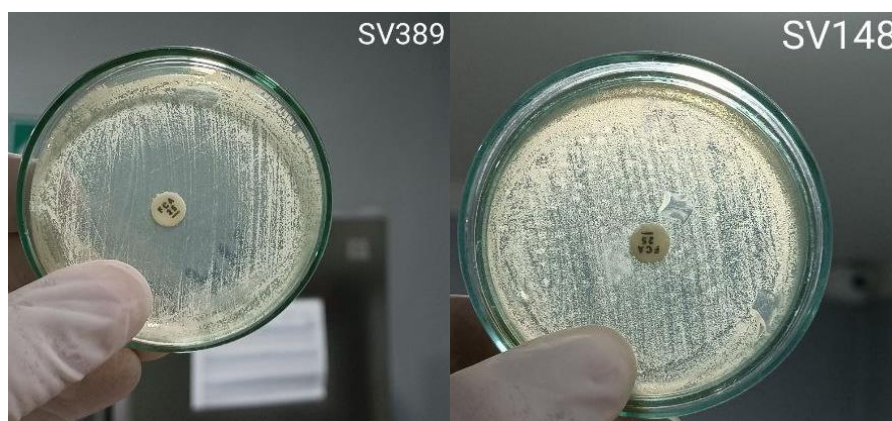


Figura 2. Evaluación de sensibilidad a fluconazol con disco (25 µg). El aislamiento (SV389) fue susceptible, en el lado izquierdo se observa la presencia del halo de inhibición. El aislamiento (SV148) fue resistente, como se observa a la derecha, no hay presencia del halo de inhibición.

4.1.3 Identificación molecular y análisis filogenético de los aislamientos

La tabla 3 muestra los porcentajes de identidad de los aislamientos de *C. albicans* resistentes a fluconazol obtenidos en este estudio, luego del análisis de las secuencias del gen 18S ARNr. Todos los aislamientos mostraron valores iguales o mayores al 99 % al comparar las secuencias 18S con la base de datos *Nucleotide* del *GenBank*. Los números de acceso de las levaduras homologas también se muestran en la misma tabla.

Tabla 3. Identificación molecular mediante el análisis del gen 18S ARNr de los aislamientos de *C. albicans* resistentes a fluconazol comparados con secuencias del *GenBank*.

Aislamiento	Especie identificada	Coincidencias/total	Identidad (%)	Homólogo en GenBank	Número de acceso
SV05	<i>Candida albicans</i>	1657/1658	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
SV1976	<i>Candida albicans</i>	1651/1653	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
SV182	<i>Candida albicans</i>	1655/1657	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
AB250	<i>Candida albicans</i>	1661/1663	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
SV1661	<i>Candida albicans</i>	1650/1652	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
Continuación de Tabla 3.					
SV1400	<i>Candida albicans</i>	1647/1647	100	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
ESP399	<i>Candida albicans</i>	1659/1660	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
SV375	<i>Candida albicans</i>	1653/1653	100	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
AB502	<i>Candida albicans</i>	1652/1654	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
AB202	<i>Candida albicans</i>	1647/1648	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
SV148	<i>Candida albicans</i>	1659/1662	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1
AB52	<i>Candida albicans</i>	1662/1664	99	<i>Candida albicans</i>	CP025165.1

En la Figura 3 se muestran las relaciones filogenéticas de todos los aislamientos de *C. albicans* resistentes a fluconazol con aislamientos cuyas secuencias se encuentran

depositadas en el *GenBank*. La mayoría de los aislamientos de este estudio se agruparon en dos clusters distintos (líneas puntadas en la Figura 3) y filogenéticamente cercanos. La presencia marcada de los dos clusters está determinada por el tipo de muestra de donde se obtuvo cada uno de los aislamientos, así como de las obtenidas del *GenBank*.

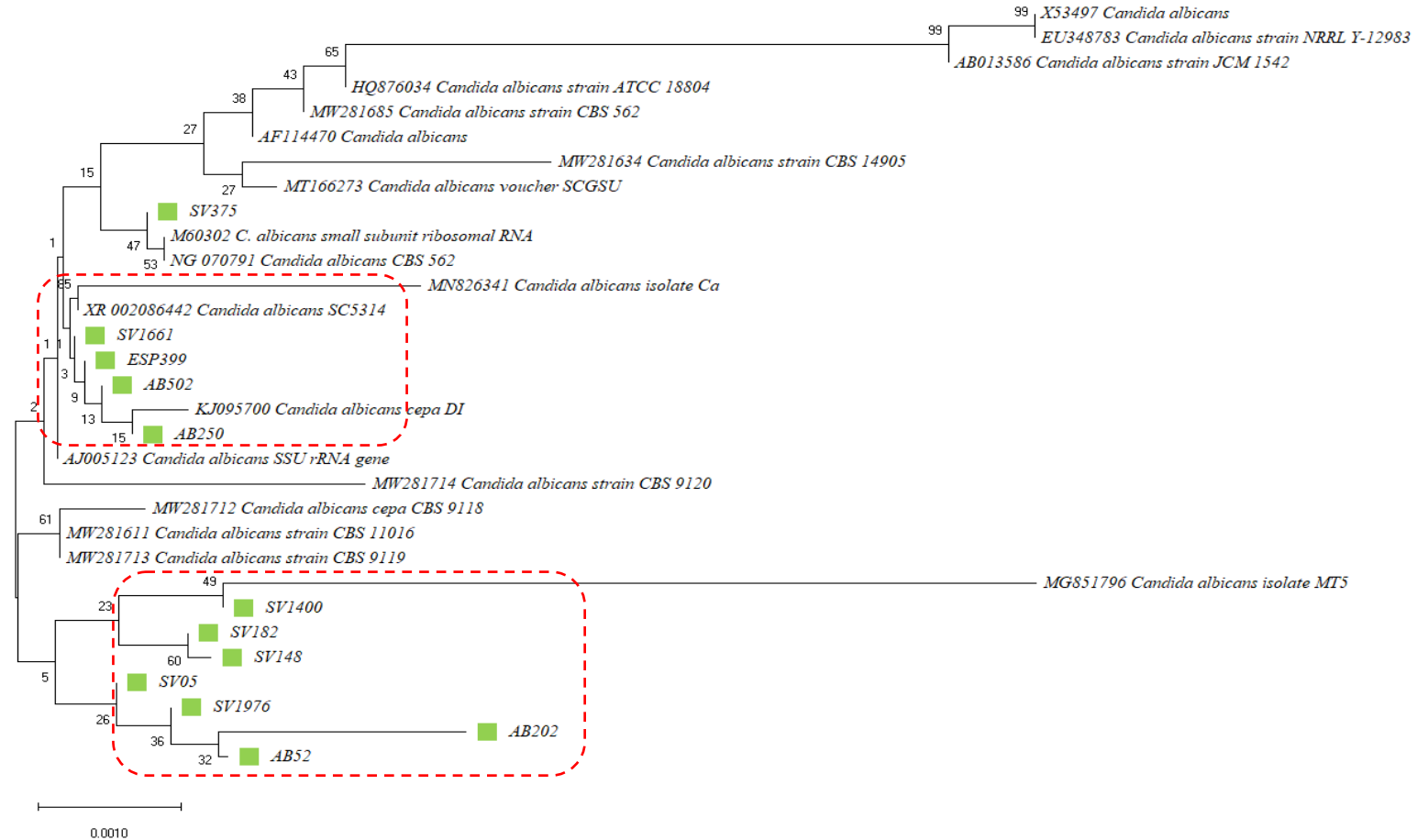


Figura 3. Árbol filogenético inferido a partir de la comparación de las secuencias 18S ARNr consenso de los aislados resistentes de *C. albicans* resistentes a fluconazol (viñeta verde) con las secuencias homólogas obtenidas del *GenBank* (número de acceso descritos en el árbol), mediante el método NJ y bootstrap = 1000. Las líneas punteadas muestran los dos clusters más importantes.

4.1.4 Análisis de las mutaciones en el gen *ERG11*

Este análisis se hizo para identificar las posibles mutaciones puntuales en el gen *ERG11* que den lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína 14- α -desmetilasa del lanosterol asociadas a la resistencia a fluconazol, de los 12 aislamientos de *C. albicans* resistentes en la prueba de susceptibilidad con disco de este estudio.

El producto secuenciado obtenido fue de 1600 pb aproximadamente para cada aislamiento (Tabla 4) y la calidad de las secuencias fue observada en el programa Chromas siendo calificada como buena (Figura 4).

Tabla 4. Producto obtenido de la secuenciación del gen *ERG11* para los aislamientos de este estudio.

Aislamiento	Producto (pb)
SV05	1637 pb
SV1976	1630 pb
SV182	1633 pb
AB250	1641 pb
SV1661	1637 pb
SV1400	1641 pb
ESP399	1639 pb
SV375	1593 pb
AB502	1636 pb
AB202	1683 pb
SV148	1635 pb
AB52	1605 pb

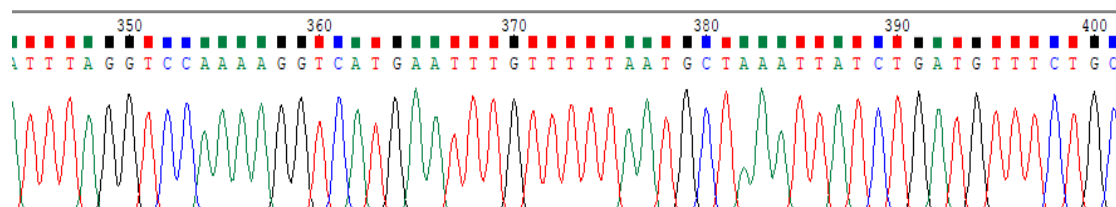


Figura 4. Cromatograma de una de las secuencias del gen *ERG11*, visualizada en el programa Chromas.

El análisis de las secuencias nucleotídicas y de las traducidas del gen *ERG11* de los 12 aislamientos reveló 73 mutaciones, incluidas 50 mutaciones silenciosas y 23 mutaciones que originaron cambios en la estructura de la proteína al modificarse los aminoácidos; estas mutaciones se dieron en el 92 % (n=11) de los aislamientos resistentes, aunque solo el 83 % (n=10) reveló cambios en la secuencia de aminoácidos y sólo el 25 % (n=3) presentó mutaciones reportadas y asociadas a la resistencia a fluconazol (Figura 5; Tabla 5).

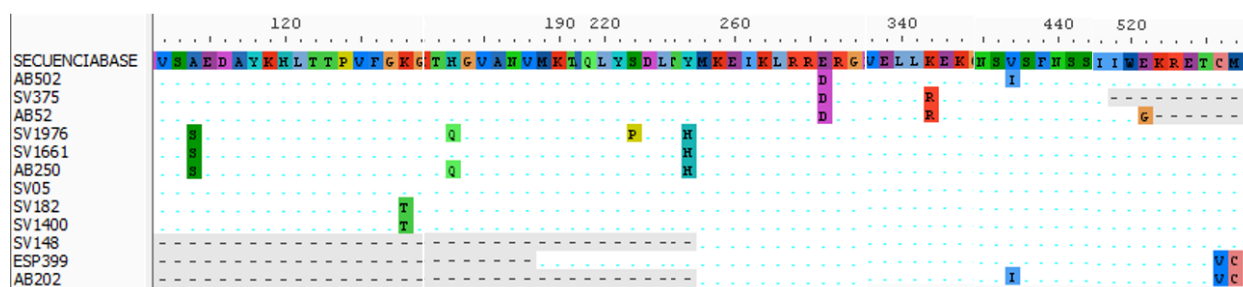


Figura 5. Alineación de las secuencias de aminoácidos del *ERG11* de los aislamientos resistentes de *C. albicans* en donde se observa las variaciones en aminoácidos. Las líneas punteadas son fragmentos de lectura no traducidos.

Tabla 5. Mutaciones encontradas en el gen *ERG11* de los aislamientos de *C. albicans* resistentes.

Aislamiento	Mutaciones nucleotídicas	Cambio(s) de aminoácidos en <i>ERG11</i>	Reportadas anteriormente y relacionadas con la resistencia a Fluconazol
SV05	NO	NO	No aplica
SV1976	G340T	A114S	Descrita como una mutación única en aislados resistentes a fluconazol
	T549G	H183Q	NO
	T664C	S222P	NO
	T769C	Y257H	Sólo descrito en aislados resistentes a azoles. Combinación con G464S aumenta significativamente CMI a FLZ
SV182	T315C	K128T	No asociado con la resistencia. Descrito en aislamientos sensibles y resistentes a los azoles
	A383C	Mutación silenciosa	No aplica
	C411T	Mutación silenciosa	No aplica
	C658T	Mutación silenciosa	No aplica
	A1440G	Mutación silenciosa	No aplica

AB250	G340T	A114S	Descrita como una mutación única en aislados resistentes a fluconazol
	T456G	Mutación silenciosa	No aplica
	T549G	H183Q	NO
	T769C	Y257H	Sólo descrito en aislados resistentes a azoles. Combinación con G464S aumenta significativamente CMI a FLZ
SV1661	G340T	A114S	Descrita como una mutación única en aislados resistentes a fluconazol
	T769C	Y257H	Sólo descrito en aislados resistentes a azoles. Combinación con G464S aumenta significativamente CMI a FLZ
SV1400	T315C	Mutación silenciosa	
	A383C	K128T	No asociado con la resistencia. Descrito en aislamientos sensibles y resistentes a los azoles
	C411T	Mutación silenciosa	No aplica
	C658T	Mutación silenciosa	No aplica
	A1440G	Mutación silenciosa	No aplica
ESP399	T549G	Mutación silenciosa	No aplica
	T996C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1575-	C526V	NO
	T1575-	M527C	NO
SV375	T315C	Mutación silenciosa	No aplica
	C411T	Mutación silenciosa	No aplica
	C658T	Mutación silenciosa	No aplica
	A798C	E266D	No asociado con la resistencia. Descrito en aislamientos sensibles y resistentes a los azoles
	T996C	Mutación silenciosa	No aplica
	A1025G	K342R	NO
	C1110T	Mutación silenciosa	No aplica
	T1140C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1203C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1233C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1302C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1470C	Mutación silenciosa	No aplica

AB502	T549C	Mutación silenciosa	No aplica
	C658T	Mutación silenciosa	No aplica
	A798C	E266D	No asociado con la resistencia. Descrito en aislamientos sensibles y resistentes a los azoles
	T996C	Mutación silenciosa	No aplica
	A1026G	Mutación silenciosa	No aplica
	C1110T	Mutación silenciosa	No aplica
	T1203C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1257C	Mutación silenciosa	No aplica
	G1309A	V437I	No asociado con la resistencia. Descrito en aislamientos sensibles y resistentes a los azoles
AB202	C716T	Mutación silenciosa	No aplica
	T996C	Mutación silenciosa	No aplica
	C1110T	Mutación silenciosa	No aplica
	T1140C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1203C	Mutación silenciosa	No aplica
	G1309A	V437I	No asociado con la resistencia. Descrito en aislamientos sensibles y resistentes a los azoles
	A1440G	Mutación silenciosa	No aplica
	T1575-	C526V	NO
	T1575-	M527C	NO
SV148	T996C	Mutación silenciosa	No aplica
	A1083G	Mutación silenciosa	No aplica
	C1110T	Mutación silenciosa	No aplica
	T1203C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1284C	Mutación silenciosa	No aplica
	A1440G	Mutación silenciosa	No aplica
	T1470C	Mutación silenciosa	No aplica

AB52	T315C	Mutación silenciosa	No aplica
	C411T	Mutación silenciosa	No aplica
	C658T	Mutación silenciosa	No aplica
	A798C	E266D	No asociado con la resistencia. Descrito en aislamientos sensibles y resistentes a los azoles
	T996C	Mutación silenciosa	No aplica
	A1025G	K342R	Descrito en un aislado sensible a azoles
	C1110T	Mutación silenciosa	No aplica
	T1140C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1203C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1233C	Mutación silenciosa	No aplica
	T1302C	Mutación silenciosa	No aplica
	A1562G	E521G	NO

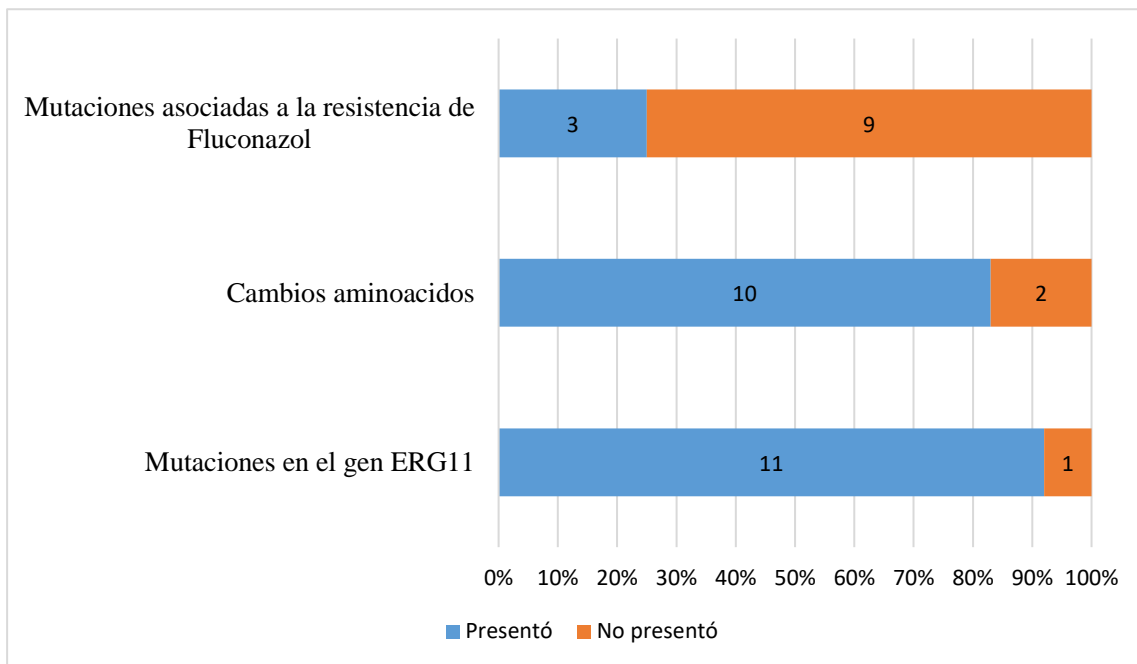


Gráfico 2. Distribución de frecuencias de las mutaciones en el gen *ERG11* en *C. albicans* resistentes a fluconazol.

4.2 Discusión

El objetivo principal de esta investigación fue determinar la frecuencia con la que aparecen mutaciones en el gen *ERG11* de aislamientos clínicos de *C. albicans* resistentes a fluconazol procedentes de distintos servicios del Hospital II EsSalud de Cajamarca. Aunque esta levadura puede formar parte de la microbiota de personas sanas al colonizar las mucosas de la boca, el tracto gastrointestinal y el sistema genitourinario (37, 38), en individuos inmunocomprometidos es un patógeno oportunista capaz de causar infecciones en las mucosas e infecciones sistémicas (39, 40). *C. albicans* es un microorganismo que de manera regular se reproduce por gemación, sin embargo, algunos factores ambientales pueden influir de manera importante en su desarrollo patogénico, tal es el caso del pH que cuando es superior a 7 permite el cambio de la forma levaduriforme a hifa, estructura responsable de la invasión de tejidos y por tanto de la patogenicidad de la levadura (42).

El 63.3 % de los aislamientos clínicos obtenidos en este estudio fueron identificados como *C. albicans* a través de la presencia de tubo germinativo propio de la especie (Figura 1), estos resultados se asemejan al estudio hecho por Magalhães y su equipo en el 2015, identificando el 41.7 % de sus aislamientos como *C. albicans* siendo la especie de mayor prevalencia en su estudio (43). Así mismo, algo similar fue reportado por Khadka y colaboradores quienes identificaron, en el año 2017, que el 56 % de los aislamientos de sus muestras clínicas eran *C. albicans* (44). Estudios en el Perú acerca de la presencia intrahospitalaria de *Candida* spp. entre los años 2011-2014 describen que el 46.48 % de los aislamientos pertenecen a *C. albicans*, esto refleja el aumento de casos clínicos con infección por *C. albicans* (45), siendo las muestras de secreción vaginal las que presentaron la mayor cantidad de aislamientos de *C. albicans* con el 48.4 % (Tabla 2, gráfico 1). La

técnica de identificación, por tubo germinativo resulta muy efectiva de determinar y/o discriminar a los aislamientos como *C. albicans*.

Un segundo objetivo fue determinar la frecuencia de la resistencia de los aislamientos identificados como *C. albicans* sometiéndolos a una prueba de sensibilidad frente a fluconazol (Figura 2, Apéndice 4), una de las principales opciones para el tratamiento de candidiasis, desde la introducción de los azoles debido a su seguridad y eficiencia, el cual por su uso generalizado y descontrolado desencadenó el desarrollo de *C. albicans* resistentes aumentando su virulencia y su patogenicidad (45, 46).

Realizada la prueba de sensibilidad a fluconazol se encontró que el 19 % (n=12) de los aislamientos presentaban resistencia y el 81% fue sensible a la concentración de 25 µg de fluconazol, siendo las muestras de secreción vaginal las cuales presentaron la mayoría de aislamientos resistentes con el 58 %, seguido de los aspirados bronquiales (33 %) y las muestras de esputo (8 %) (Gráfico 1). Estos resultados se asemejan a lo encontrado por Badiee y Alborzi quienes aislaron distintas especies del género *Candida* a partir de muestras clínicas, las cuales identificaron y sometieron a pruebas de susceptibilidad a diferentes agentes antifúngicos, encontrando que el 10.5 % de los aislamientos de *C. albicans* fueron resistentes a fluconazol (48) en donde se puede observar el incremento en el porcentaje de aislamientos resistentes.

La determinación de la susceptibilidad a los fármacos en *C. albicans* es fundamental para el establecimiento del tratamiento adecuado, porque existen aislamientos que son intrínsecamente resistentes a alguno de los antifúngicos, como pueden ser los azoles; por ello, el conocimiento de la sensibilidad a cada grupo de fármacos antifúngicos puede

repercutir en la toma de decisiones con respecto al tratamiento y pronóstico. Al respecto, un estudio de vigilancia antifúngica menciona que en 10 especies la resistencia al fluconazol se incrementó de manera notable: *C. albicans* pasó de 0.8 a 1.5 %, *C. tropicalis* de 3 a 6.6 %, *C. parapsilosis* de 2 a 4.2 %, *C. lusitaniae* de 1.6 a 6.6 % y *C. kefyr* de 0 a 5.7 % (5).

El análisis estadístico determinó que la resistencia no se encuentra asociada con las características clínicas determinadas (p valor > 0.05), lo que significa que la resistencia es independiente del género del paciente, del tipo de atención, del servicio hospitalario y del tipo de muestra de donde se aisló la levadura (Apéndice 3).

Existen muchos mecanismos por la cual *C. albicans* puede adquirir resistencia a fluconazol, tales como el incremento de la permeabilidad celular que impide el ingreso de antimicóticos al interior de la célula, el incremento en la degradación del antimicótico, la sobreexpresión de la bomba de flujo que contrarresta la entrada del antimicótico, la formación de biopelículas, la presencia de vacuolas que restringen las moléculas de fluconazol y las mutaciones puntuales en el gen que codifica a la enzima diana 14DM (5, 46, 48).

Un tercer objetivo fue identificar las mutaciones en el gen *ERG11* que estuvieran asociadas a la resistencia de *C. albicans*, dicho gen que codifica para la enzima 14- α -lanosterol desmetilasa, una enzima importante en la síntesis del ergosterol, componente principal de la estructura de la membrana de las levaduras (50). Recientemente, se han descrito mutaciones en el gen *ERG11* que dan como resultado el cambio aproximado de 160 aminoácidos (51), y la consecuente expresión de resistencia al fluconazol; en esta investigación se describen tres aislamientos resistentes (SV05, AB250, SV1661) que

presentaron mutaciones en dicho gen con los cambios correspondientes en sus aminoácidos, tales como G340T (A114S), T769C (Y257H) (Figura 5, Tabla 5). Estas variaciones han sido descritas como mutaciones asociadas a la resistencia a fluconazol (49), y los aislamientos con presencia de estas mutaciones asociadas a la resistencia representaron el 25 % (n=3) de los aislamientos resistentes a fluconazol identificados en este estudio (Gráfico 2); resultados que se asemejan a los encontrados por Dovo y sus colaboradores, en el año 2022, en donde muestran la presencia de estas mutaciones en el 9.79 % (n=15) de sus aislamientos clínicos de *C. albicans* (52), la presencia de estas mutaciones en el gen *ERG11* producen cambios estructurales en la enzima 14- α -lanosterol desmetilasa, que disminuye su afinidad al fluconazol desencadenando así la resistencia (50).

La mutación A114S, cambio de una Alanina por una Serina en el aminoácido 114, ha sido identificada en aislamientos resistentes SV05, AB250, SV1661 siendo descrita como una mutación que se encuentra cerca del canal del sustrato y es una mutación asociada a la resistencia que disminuye la afinidad de unión entre la molécula del fluconazol y el objetivo (30, 48, 52), así mismo, la mutación Y257H, cambio de una Tirosina por una Histidina en el aminoácido 257, ha sido identificada en los mismos tres aislamientos siendo descrita en otras investigaciones como una mutación que se encuentra ubicado en la hélice G, lejos del centro activo de la proteína, así que el efecto de una mutación en esta posición no es inmediata (30, 48, 53, 54). Las mutaciones K128T, E266D, V437I que fueron identificadas en seis aislamientos resistentes a fluconazol (SV182, SV1400, SV375, AB502, AB202, AB52) ya han sido descritas como mutaciones que no se asocian con la resistencia a fluconazol (56–61). De las mutaciones H183Q, S222P, Y257P, C526V,

K342R M527C, E521G identificadas en 6 aislamientos resistentes no se tiene un registro aun de que exista asociación con la resistencia a fluconazol (Figura 5, Tabla 5).

El aislamiento SV05 no presentó mutaciones en el gen *ERG11* (Figura 5, Tabla 5), sin embargo, presenta resistencia a fluconazol por lo que su resistencia debe estar asociada a otros mecanismos como la sobreexpresión del gen *ERG11* que promueve el incremento de la enzima diana del fluconazol o la sobreexpresión de genes que incrementa las proteínas de transporte que permiten una mayor salida del fluconazol hacia el exterior de la célula disminuyendo la sensibilidad al antimicótico (62).

Esta investigación advierte sobre la circulación de aislamientos de *C. albicans* que presentan mutaciones en su secuencia genómica, relacionados a la resistencia frente a la principal droga empleada para el tratamiento de la candidiasis, que es el fluconazol. Este estudio, además, deja en evidencia la existencia de otros mecanismos que pueden ocasionar la resistencia en aislamientos de nuestra comunidad por lo que es necesario el desarrollo de investigaciones que aborden el análisis de esos otros mecanismos de resistencia a fluconazol diferentes a la mutación en el gen *ERG11*, hecho que es una de las limitaciones en este estudio, ya que, por ejemplo, nos habría ayudado a dilucidar la resistencia en el aislamiento SV05.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

En este estudio se logró identificar 62 aislamientos de *C. albicans* de origen clínico, de las cuales el 19 % presentó resistencia a fluconazol. El análisis molecular reveló que el 93 % de los aislamientos resistentes presentaron mutaciones en la secuencia del gen *ERG11*, sin embargo, solo el 83 % presentó mutaciones que cambiaban estructuralmente la proteína objetivo lanosterol 14 α -desmetilasa, y solo las mutaciones A114S y Y257H en el 25 % de los aislamientos resistentes, han sido reportadas antes como mutaciones relacionadas a la resistencia al fluconazol.

RECOMENDACIONES

Con sustento en los resultados de esta investigación se recomienda seguir realizando estudios que permitan proponer medidas para prevenir la diseminación de los microorganismos resistentes en nuestra comunidad.

También se recomienda el estudio, búsqueda y análisis de nuevas mutaciones asociadas o relacionadas con la resistencia al fluconazol y otros antifúngicos en *C. albicans* y en otras especies de esta levadura.

Se recomienda hacer uso de la investigación para buscar nuevas opciones de tratamiento que permitan combatir este tipo de levaduras resistentes.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Antonarakis SE, Cooper DN. Human Gene Mutation in Inherited Disease: Molecular Mechanisms and Clinical Consequences [Internet]. Sixth Edit. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Elsevier; 2013. 1–48 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00007-0>
2. Cavalcanti ARO, Landweber LF. Genetic code. *Curr Biol* [Internet]. 2004 Feb;14(4):R147. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982204000715>
3. Herreras Gomez L, Cárdenas López V. Perfil de resistencia antifúngica en el tratamiento de candidiasis vaginal: Un diagnóstico de agentes etiológicos. *Rev haban cienc méd* [Internet]. 21(2):[aprox. 0 p.].
4. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* Species. *Front Microbiol*. 2017;7(JAN):1–12.
5. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. *Rev Biomed*. 2016;27(3):127–36.
6. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*. 2020;9(6):1–19.
7. Resistencia antifúngica en *Candida* | Enfermedades fúngicas | Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [Internet]. [cited 2022 Nov 3]. Available from: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/antifungal-resistant.html>
8. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1704–13.

9. Gutiérrez C, De Bedout C, Tobón AM, Cano LE, Arango M, Tabares AM, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de aislamientos de *Candida* spp ., obtenidos de mucosa oral de pacientes con sida. *Rev Infect.* 2007;11(4):183–9.
10. Fuentes M, Hermosilla G, Alburquenque C, Falconer MA, Amaro J, Tapia C. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en cepas clínicas chilenas de *Candida albicans*. *Rev Chil infectología.* 2014;31(5):511–7.
11. Rodríguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramírez R, et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao , Peru : Species distribution , antifungal resistance and clinical outcomes. 2017;1–12.
12. Villanueva F, Veliz J, Canasa K, Bellido E, Martell S, Ortega S, et al. Characteristics of fungemias in a peruvian referral center: 5-year retrospective analysis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2020;37(2):276–81.
13. Zurita Macalupú S. Situación de la Resistencia Antifúngica de Especies del Género *Candida* en Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Publica.* 2018;35(1):126–31.
14. Fuentes Sánchez MA. Estudio de susceptibilidad y mecanismos de resistencia a antifúngicos en *Candida albicans* de aislados clínicos chilenos. Universidad de Chile; 2014.
15. Cruz Quintana S, Díaz Sjöstrom P, Mazón Baldeón G, Arias Socarrás D, Calderón Paz M, HerreraMolina. A. Genoma de *Candida albicans* y resistencia a las drogas. *Salud Uninorte.* 2017;33(3):438–50.
16. Panizo MM, Reviákina V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas . Vol. 21, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología . scielon ;* 2001. p. 38–45.
17. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, et al. The biology and chemistry of antifungal agents : A review. *Bioorg Med Chem [Internet].* 2012;20(19):5678–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045>

18. Valdés G, Susana B. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cuba Farm.* 2005;39(2).
19. Chandrika KVSM, Sharma S. Promising antifungal agents : A minireview. 2020;28(February).
20. Sole Borrell Nuria. Nuevos antifungicos: Equinocandinas. 2016;7. Available from: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/caspofun.pdf>
21. THOMPSON M. L. Antifúngicos . Vol. 19, *Revista chilena de infectología . scielocl ;* 2002. p. S22–5.
22. Sucher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: The newest class of antifungals. *Ann Pharmacother.* 2009;43(10):1647–57.
23. Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifúngicos para uso sistémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet].* 2009 Jun;27(6):353–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X09002924>
24. Berkow EL, Lockhart SR. Infection and Drug Resistance Dovepress Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist [Internet].* 2017;10(1):237–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S118892>
25. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Fluconazol. *Pediamécum.* 2015;7.
26. Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis.* 2003;36(1):31–41.
27. Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2002;1587(2–3):240–8.
28. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(7):1–22.
29. Löffler J, Kelly SL, Hebart H, Schumacher U, Lass-Flörl C, Einsele H. Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol*

- Lett. 1997;151(2):263–8.
30. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2010;66(4):373–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006>
 31. Rodríguez MO. Molecular mechanisms associated with azole resistance in *Candida* species [Internet]. 2020. p. 1–5. Available from: https://www.scipedia.com/public/Orjuela_2019a
 32. Rodríguez MO. Molecular mechanisms associated with azole resistance in *Candida* species. 2020. p. 1–5.
 33. Khan M, Ahmed J, Gul A, Ikram A, Lalani FK. Antifungal susceptibility testing of vulvovaginal *Candida* species among women attending antenatal clinic in tertiary care hospitals of Peshawar. *Infect Drug Resist*. 2018;11:447–56.
 34. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977;74(12).
 35. Larsson A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*. 2014;30(22):3276–8.
 36. Altschup SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol*. 1990;403–10.
 37. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(17):3389–402.
 38. Del Palacio A, Villar J, Alhambra AI. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2009;26(1):1–7. Available

from: <https://rieoei.org/historico/deloslectores/2652EspinosaV2.pdf>

39. Cowen LE, Anderson JB, Kohn LM. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56(August):139–65.
40. Perea S. Resistencia de *Candida albicans* a los azoles. *Rev Española Quimioter* [Internet]. 2000 [cited 2022 Oct 27];13(3). Available from: https://seq.es/seq/html/revista_seq/0300/short1.html
41. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 Oct [cited 2022 Oct 27];9(10). Available from: [/pmc/articles/PMC3798555/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24411111/)
42. Cruz Quintana S, Diaz Sjöstrom P, Mazón Baldeón G, Arias Socarras D, Calderón Paz M, Herrera Molina A. Genoma de *Candida albicans* y resistencia a las drogas. 2017;2–18. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Sandra_Cruz_Quintana/publication/316062735_Genoma_de_Candida_albicans_y_resistencia_a_las_drogas/links/58ee869faca2724f0a28ad85/Genoma-de-Candida-albicans-y-resistencia-a-las-drogas.pdf
43. Magalhães YC, Bomfim MRQ, Melônio LC, Ribeiro PCS, Cosme LM, Rhoden CR, et al. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. *Brazilian J Microbiol*. 2015;46(1):117–23.
44. Khadka S, Sherchand JB, Pokhrel BM, Parajuli K, Mishra SK, Sharma S, et al. Isolation, speciation and antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from various clinical specimens at a tertiary care hospital, Nepal. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):1–5.
45. Moreno-Loaiza M, Moreno-Loaiza O. Características clínicas y epidemiológicas de la candidemia en pacientes de un hospital de tercer nivel del sur del Perú, 2011-2014. *Acta Medica Peru*. 2018;34(4):289–93.
46. Baddley JW, Patel M, Bhavnani SM, Moser SA, Andes DR. Association of Fluconazole

- Pharmacodynamics with Mortality in Patients with Candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(9):3022–8.
47. Gómez Quintero CH. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Rev Infect.* 2010;14(2):172–80.
 48. Badiie P, Alborzi A. Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A five year study. *Iran J Microbiol.* 2011;3(4):183–8.
 49. Xu Y, Sheng F, Zhao J, Chen L, Li C. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Arch Microbiol.* 2015;197(9):1087–93.
 50. Alizadeh F, Khodavandi A, Zalakian S. Quantitation of ergosterol content and gene expression profile of ERG11 gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Curr Med Mycol.* 2017;3(1):13–9.
 51. Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, Wang S, Shi C, Wei B, et al. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2013;13(4):386–93.
 52. Dovo EE, Zohoncon TM, Tovo SF, Soubeiga ST, Kiendrebeogo IT, Yonli AT, et al. First detection of mutated ERG11 gene in vulvovaginal *Candida albicans* isolates at Ouagadougou/Burkina Faso. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2022;22(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07619-5>
 53. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AGS, et al. A Clinical Isolate of *Candida albicans* with Mutations in ERG11 (Encoding Sterol 14-Demethylase) and ERG5 (Encoding C22 Desaturase) Is Cross Resistant to Azoles and Amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3578–83.
 54. Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting

- reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2124–31.
55. Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM. Three-Dimensional Models of Wild-Type and Mutated Forms of Cytochrome P450 14 α -Sterol Demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Provide Insights into Posaconazole Binding. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(2):568–74.
 56. Benedetti VP, Savi DC, Aluizio R, Adamoski D, Kava V, Galli-Terasawa LV, et al. ERG11 gene polymorphisms and susceptibility to fluconazole in *Candida* isolates from diabetic and kidney transplant patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019;52:1–6.
 57. Khademi P, Ranji N, Rahnamay Roodposhti F. Mutations in Hotspot Regions of ERG11 Gene in Fluconazole Resistant Isolates of *Candida albicans* in Guilan Province, Northern Iran. *Mol Genet Microbiol Virol.* 2017;32(4):241–5.
 58. Sawadogo P, Zida A, Sangaré I, Guiguemdé T, Sanfo A, Idani M, et al. Genetic Mutations Conferring Resistance to *Candida albicans* to Antifungal drugs: A Global Perspective and Regional Implications. *J Infect.* 2019;2(4):6–12.
 59. Manastir L, Ergon MC, Yücesoy M. Investigation of mutations in Erg11 gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses.* 2011;54(2):99–104.
 60. Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α - demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(2):241–53.
 61. Ying Y, Zhao Y, Hu X, Cai Z, Liu X, Jin G, et al. In vitro fluconazole susceptibility of 1,903 clinical isolates of *Candida albicans* and the identification of ERG11 mutations. *Microb Drug Resist.* 2013;19(4):266–73.
 62. Flowers SA, Colón B, Whaley SG, Schuler MA, David Rogers P. Contribution of

clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*.

Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(1):450–60.

APÉNDICES

Apéndice 1. Ficha para la descripción clínica de los aislamientos

Ficha de descripción clínica de aislamientos

Código de aislamiento: Fecha de cultivo:/...../.....

Género:

Edad:

M	F
---	---

Origen:

Ambulatorio	Hospitalario
-------------	--------------

Servicio Hospitalario:

Tipo de muestra clínica:

Apéndice 2. Prueba de sensibilidad de *C. albicans* frente a fluconazol



Figura 6 Colocación del disco de fluconazol (25µg) en una placa con cultivo de *C. albicans* para la realización de la prueba de sensibilidad.

Apéndice 3. Análisis estadísticos

Tabla 6. Prueba de chi-cuadrado para variables resistencia y sexo del paciente ($p > 0.05$)

		SEXO DEL PACIENTE		Total
		Mujer	Varón	
RESISTENCIA	Sensible	39	11	50
	Resistente	9	3	12
Total		48	14	62

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación Asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,050 ^a	1	,823		
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,049	1	,825		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,546
Asociación lineal por lineal	,049	1	,825		
N de casos válidos	62				

a. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,71.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Tabla 7. Prueba de chi-cuadrado para variables resistencia y tipo de atención ($p > 0.05$)

		TIPO DE ATENCIÓN		Total
		Ambulatorio	Hospitalario	
RESISTENCIA	Sensible	31	19	50
	Resistente	8	4	12
Total		39	23	62

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,090 ^a	1	,764		
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,091	1	,762		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,520
Asociación lineal por lineal	,089	1	,766		
N de casos válidos	62				

a. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 4,45.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Tabla 8. Prueba de chi-cuadrado para variables resistencia y servicio hospitalario ($p > 0.05$)

		SERVICIO HOSPITALARIO				Total
		Ginecología	UCI	Medicina General	Pediatría	
RESISTENCIA	Sensible	21	19	8	2	50
	Resistente	6	4	1	1	12
Total		27	23	9	3	62

Pruebas de chi

-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,966 ^a	3	,809
Razón de verosimilitud	,969	3	,809
Asociación lineal por lineal	,063	1	,801

N de casos válidos	62		
--------------------	----	--	--

a. 4 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,58.

Tabla 9. Prueba de chi-cuadrado para variables resistencia y tipo de muestra clínica (p>0.05)

T I		PO DE MUESTRA CLÍNICA			
		Secreción vaginal	Aspirado bronquia 1	Secreción bronquia 1	Secreción faríngea
RESISTENCIA	Sensible	23	6	13	4
	Resistente	7	4	0	0
Total		30	10	13	4

		TIPO DE MUESTRA CLÍNICA		Total
		Espujo	Orina	
RESISTENCIA	Sensible	2	2	50
	Resistente	1	0	12
Total		3	2	62

Pruebas de chi-cuadrado

Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	
Chi-cuadrado de Pearson	7,970 ^a	5	,158
Razón de verosimilitud	11,049	5	,050
Asociación lineal por lineal	1,659	1	,198
N de casos válidos	62		

a. 8 casillas (66,7%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,39.

Tabla 10. Prueba de chi-cuadrado para variables resistencia y edad del paciente (p>0.05)

		EDAD			Total
		Menor de edad	Adulto	Adulto mayor	
RESISTENCIA	Sensible	3	29	18	50
	Resistente	1	6	5	12

Total	4	35	23	62
-------	---	----	----	----

Pruebas de chi-cuadrado

Valor		df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,275 ^a	2	,871
Razón de verosimilitud	,271	2	,873
Asociación lineal por lineal	,031	1	,860
N de casos válidos	62		

a. 3 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,77.

Tabla 11. Prueba de chi-cuadrado para variables resistencia y los servicios hospitalarios ($p > 0.05$)

		SERVICIOS			Total
		Ginecología	UCI	Otros Servicios	
RESISTENCIA	Sensible	21	19	10	50
	Resistente	6	4	2	12
Total		27	23	12	62

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,255 ^a	2	,880
Razón de verosimilitud	,253	2	,881
Asociación lineal por lineal	,214	1	,643
N de casos válidos	62		

a. 2 casillas (33,3%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,32.

Tabla 12. Prueba de chi-cuadrado para variables resistencia y origen de la muestra(p>0.05)

		MUESTRA		Total
		Tracto genitourinario	Tracto respiratorio	
RESISTENCIA	Sensible	25	25	50
	Resistente	7	5	12
Total		32	30	62

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,269 ^a	1	,604		
Corrección de continuidad ^b	,039	1	,844		
Razón de verosimilitud	,270	1	,603		
Prueba exacta de Fisher				,751	,423
Asociación lineal por lineal	,265	1	,607		
N de casos válidos	62				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 5,81.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Apéndice 4. Análisis del perfil de sensibilidad de *C. albicans* frente a Fluconazol

Tabla 13. Perfil de sensibilidad de aislamientos de *C. albicans* frente a Fluconazol

Aislamiento	Perfil de sensibilidad	Diámetro (mm) de halo de inhibición de Fluconazol
SV134	Sensible	23.0
AB250	Resistente	10.9
AB565	Sensible	27.1
SV1096	Sensible	36.7
SV1400	Resistente	11.3
SV1637	Sensible	28.4
AB1660	Sensible	33.8
ESP1661	Sensible	17.9
SV2465	Sensible	20.2
SV05	Resistente	13.4
SV182	Resistente	6.4
SV318	Sensible	33.1
SV781	Sensible	24.6
SV3249	Sensible	35.4
SV208	Sensible	29.8
SV1010	Sensible	23.6
SV1031	Sensible	18.7
SV1113	Sensible	29.8
SV1135	Sensible	28.1
SV1661	Resistente	13.6
SV1676	Sensible	22.7
SV1976	Resistente	11.2
SV2585	Sensible	29.8
AB116	Sensible	26.5
URO123	Sensible	22.4
SV167	Sensible	28.9
SV174	Sensible	28.9
AB202	Resistente	10.7
URO255	Sensible	26.5
AB215	Sensible	25.1
ESP399	Resistente	6.1
SB397	Sensible	22.5
AB473	Sensible	25.4
SB521	Sensible	23.7
SB43	Sensible	28.1
SF49	Sensible	30.7

SB75	Sensible	26.3
SB89	Sensible	24.2
SV123	Sensible	17.7
SV184	Sensible	28.0
SF266	Sensible	25.2
SB313	Sensible	21.5
SF336	Sensible	22.7
SV373	Sensible	19.4
SV375	Resistente	6.5
SB471	Sensible	23.3
AB501	Sensible	39.9
SB504	Sensible	20.4
AB502	Resistente	7.5
SV531	Sensible	19.9
AB52	Resistente	7.2
SV148	Resistente	6.1
SV389	Sensible	26.5
SB434	Sensible	31.2
SB561	Sensible	30.4
ESP608	Sensible	24.4
SB06	Sensible	28.6
SB19	Sensible	31.2
SB36	Sensible	27.1
SF11	Sensible	29.4
SV90	Sensible	24.7
SV133	Sensible	34.3