



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

Prevalencia de genes de resistencia al fluconazol y voriconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz – 2018

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Alberto Javier PONCE MEDINA

ASESOR

Luis Alberto INOSTROZA RUIZ

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ponce A. Prevalencia de genes de resistencia al fluconazol y voriconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz – 2018 [Tesis de posgrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Alberto Javier Ponce Medina
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41329341
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7864-5763
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Inostroza Ruiz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	18089817
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8038-0730
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	César Augusto Canales Martínez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06269670
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	José Antonio Llahuilla Quea.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09780810
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Inostroza Ruiz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	18089817
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Amadeo Collado Pacheco
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07535726

Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz País : Perú Departamento: Lima Provincia : Lima Distrito : Pueblo Libre Calle : Av. Brasil N° 2600 Latitud : -12.084954 Longitud : -77.059878
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2018 - diciembre 2018
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Micología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.0 Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

Siendo las **16:00 hrs. del 15 de febrero de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Dr. César Augusto Canales Martínez e integrado por los siguientes miembros: Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (Asesor), Dr. José Antonio Llahuilla Quea y Mg. Amadeo Collado Pacheco; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **“Prevalencia de genes de resistencia al fluconazol y voriconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz – 2018”**, presentado por la Bachiller en Ciencias Biológicas **Alberto Javier Ponce Medina**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Dieciocho (18) – Muy Bueno

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Ciencias Biológicas **Alberto Javier Ponce Medina**, el Grado Académico de Magister en **Microbiología**.

Siendo las 17:45 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 18:00 hrs. del 15 de febrero de 2022

.....
Dr. César Augusto Canales Martínez (P.P., T.C.)
Presidente

.....
Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (P. Asoc, T.P.)
Miembro - Asesor

.....
Dr. José Antonio Llahuilla Quea (P. Asoc. T.C.)
Miembro

.....
Mg. Amadeo Collado Pacheco (P. Asoc, T.P.)
Miembro

Observaciones: Ninguna

.....

DEDICATORIA

A Dios por permitirme un día más de vida, por guiarme y fortalecerme en cada obstáculo presentado y entender que sin él nada es posible

En memoria de mi querida mamá **Elena Margarita** quien me formó en valores y me alentó día a día a perseverar en mis objetivos, enseñándome a crecer con humildad; en mis oraciones madrecita querida, me haces sentir que desde el cielo seguirás guiándome y cuidándome, te extraño mucho

Con mucho amor a mi querido papá **Andrés Albino** por creer y confiar en mí en cada paso y decisión de mi vida, por ser un excelente padre y el pilar fundamental en mi formación académica

A mi hermana **María**, por ser el pilar fundamental en el desarrollo de mi profesión, sentando en mí las bases de deseo de superación y responsabilidad, pues sus virtudes y su gran corazón me hacen admirarla cada día más

A mis hijos **Andrés** y **Valentino** por ser mi razón y motivo de seguir adelante, por alentarme y darme fortaleza en mis logros académicos.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz, por haberme dado la oportunidad de ser su asesorado, otorgándome de su valioso tiempo su capacidad y conocimientos científicos, así como haberme tenido toda la paciencia y estimación del mundo guiándome durante la elaboración y desarrollo de la presente investigación

A los docentes de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi perfeccionamiento profesional y consolidar en mí el ímpetu de la investigación

Al director del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, por autorizar la realización del presente trabajo de investigación, el cual contribuirá como antecedente para elegir el mejor tratamiento en los pacientes de este nosocomio.

A la Mg. Gladys Nalvarte Palomino, jefa del Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, por brindarme el conocimiento científico durante el procedimiento en la toma de muestra de hemocultivos y manejo de equipos para el aislamiento de las cepas

A mis compañeros de estudio, por su apoyo moral en la realización de la presente investigación.

ÍNDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice	iv
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	2
1.2. Objetivos específicos	2
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos teóricos	5
2.2.1. <i>Candida albicans</i>	5
2.2.1.1. Generalidades	6
2.2.1.2. Patogenia de <i>Candida spp.</i>	6
2.2.1.3. Polimorfismo de <i>Candida spp.</i>	6
2.2.1.4. Adhesina e invasina de <i>C. albicans</i>	6
2.2.1.5. Aislamiento de <i>C. albicans</i>	7
2.2.1.6. Mecanismo de resistencia de <i>C. albicans</i>	8
2.2.1.7. Diagnóstico molecular para el mecanismo de resistencia en <i>C. albicans</i>	9
2.2.2. Fármacos antimicóticos contra <i>C. albicans</i>	10
2.2.2.1. Fluconazol	10

2.2.2.2. Voriconazol

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	11
3.1. Tipo de investigación	11
3.2. Consideraciones éticas	11
3.3. Unidad de análisis	11
3.4. Muestra	11
3.5. Tamaño de muestra	11
3.6. Técnicas o instrumentos de recolección de la información o de datos	12
3.6.1. Aislamiento e identificación de <i>C. albicans</i>	12
3.6.2. Caracterización fenotípica de <i>C. albicans</i>	13
3.6.3. Prueba de sensibilidad para <i>C. albicans</i>	14
3.6.4. Amplificación del gen <i>ERG11</i> de resistencia para <i>C. albicans</i>	15
3.6.5. Secuenciación del gen <i>ERG11</i>	15
3.7. Procesamiento de la información o de datos	16
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	17
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	22
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	24
CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	31
Anexo 1. Panel de MicroScan Rapid Yeast ID Panel	31
Anexo 2. Oficio N° 058-2018 – DIRSAPOL/CHPNP-LNS/DEPPC-AM.	32
Anexo 3. Flujo de aislamiento y genes de resistencia de <i>C. albicans</i>	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores para la amplificación del gen <i>ERG11</i>	15
Tabla 2. Cebadores para el secuenciamiento del gen <i>ERG11</i>	16
Tabla 3. Interpretación de la prueba de difusión en disco para <i>C. albicans</i>	18
Tabla 4. Interpretación de los resultados de sensibilidad para <i>C. albicans</i>	18
Tabla 5. Sensibilidad de las cepas con un tipo de resistencia a los azoles	18
Tabla 6. Resultado del secuenciamiento de las cepas resistentes a los azoles	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características fenotípicas de <i>C. albicans</i> por la prueba de tubo germinativo	17
Figura 2. Difusión en disco para <i>C. albicans</i> (cepa_Ca1)	19
Figura 3. Difusión en disco para <i>C. albicans</i> (cepa_Ca2)	19
Figura 4. Reacción de la Cadena de Polimerasa para la amplificación del gen ERG11	20

RESUMEN

En la presente investigación se aislaron las cepas de *C. albicans* aisladas a partir de hemocultivos de pacientes con fungemia. El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia de genes resistentes al fluconazol y voriconazol en cepas de *Candida albicans* aisladas de hemocultivos en pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz-2018. Se recolectaron 176 cepas de *Candida spp.* que fueron aislada de hemocultivos y para la identificación de *C. albicans*, se realizó por la prueba de tubo germinativo y se confirmó con la prueba de identificación MicroScan RAPID YEAST ID PANEL. Para la prueba de susceptibilidad se realizó el método en difusión en disco, luego se realizó un análisis por PCR para obtener el secuenciamiento con el ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) del gen *ERG11* y ser analizado por BLAST y MEGA 6.0, obteniendo como resultado que 39 (22 %) fueron *C. albicans*. Se determinó que la resistencia de fluconazol y voriconazol fue 3 (7,7 %) y 2 (5,1 %) respectivamente para *C. albicans*, de las cepas aisladas de *C. albicans* con resistencia a los azoles (fluconazol y voriconazol) fueron tres las cepas resistentes a más de un antifúngico. En las tres cepas (cepa_Ca1, cepa_Ca2 y cepa_Ca3), se determinó la presencia del gen *ERG11*. Para la caracterización genotípica del gen *ERG11*, se realizó el secuenciamiento y luego se compararon con la secuencia publicada en GenBank de *C. albicans* del gen *ERG11* cuya secuencia genómica AY856352 de 1587 pb. Por lo tanto, en las tres cepas (cepa_Ca1, cepa_Ca2 y cepa_Ca3) aisladas, se encontró más de una mutación. Concluyendo que la prevalencia de resistencia fue 3 (7,7 %) fluconazol y 2 (5.1 %) voriconazol para *C. albicans* con respecto al gen *ERG11* que fueron secuenciadas las tres cepas encontrándose una sustitución de aminoácidos de la tirosina por la histidina (Y257H), que está relacionado con la baja afinidad de los azoles.

Palabras clave: *Candida albicans*; prevalencia; fluconazol; voriconazol; gen *ERG11*, Y257H; genes de resistencia; pacientes; centro hospitalario.

ABSTRACT

Infections caused by *C. albicans* are of three types: cutaneous, mucosal, and systemic. In our investigation, it was a systemic infection in patients with fungemia who were isolated strains of *C. albicans* from blood cultures. The purpose of this research was to determine the prevalence of genes for resistance to fluconazole and voriconazole in strains of *Candida albicans* isolated from blood cultures in patients from the Luis Nicasio Sáenz-2018 Police Hospital Complex. 176 strains of *Candida spp.* that were isolated from blood cultures and for the identification of *C. albicans*, the germ tube test was performed and confirmed with the MicroScan RAPID YEAST ID PANEL identification test. For the susceptibility test, it was performed by the disk diffusion method. Then a PCR analysis is carried out and then sequencing with the ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) of the *ERG11* gene and analyzed by BLAST and MEGA 6.0 obtaining 39 (22 %) were *C. albicans*. The resistance of fluconazole and voriconazole was determined was 3 (7.7 %) and 2 (5.1 %) respectively for *C. albicans*. The isolated strains of *C. albicans* with resistance to azoles (fluconazole and voriconazole) were three strains resistant to more than one antifungal. The three strains (strain_Ca1, strain_Ca2 and strain_Ca3), the presence of the *ERG11* gene in said strains was determined. For the genotypic characterization of the *ERG11* gene, sequencing was performed and then they were compared with the sequence published in GenBank of *C. albicans* of the *ERG11* gene whose genomic sequence AY856352 of 1587 bp. Therefore the three isolates (strain_Ca1, strain_Ca2 and strain_Ca3) isolated found more than one mutation. Concluding that the prevalence of resistance was 3 (7.7%) fluconazole and 2 (5.1%) voriconazole for *C. albicans* with respect to the *ERG11* gene, the three strains were sequenced, finding a substitution of amino acids from tyrosine to histidine. (Y257H), which is related to the low affinity of azoles.

Keywords: *Candida albicans*, prevalence, fluconazole, voriconazole, *ERG11* gene, Y257H, resistance genes, patients, hospital.

I. INTRODUCCIÓN

Las micosis es causada por hongos y está asociado con el aumento de la población de pacientes con inmunodeficiencia o sometidos a terapia inmunosupresora, por lo tanto es un problema creciente en la atención médica moderna¹. La infección causada por *Candida spp.* denominada candidiasis es de tres tipos: cutáneo, mucosa y sistémica^{2,3}.

Candida albicans, es un hongo polimórfico de forma unicelular y es miembro de la flora gastrointestinal humana⁴. Los enfoques terapéuticos actuales tienen una efectividad limitada, especialmente una vez que se establece una infección sistémica, debido a la falta de una respuesta inmune efectiva. Impulsar la respuesta inmune a *C. albicans* ha sido el objetivo de la inmunoterapia, pero tiene que hacerse de forma selectiva para prevenir la hiperinflamación nociva⁵. Aunque es necesaria una respuesta inflamatoria eficiente para combatir la infección, la respuesta típica a *C. albicans* provoca daños colaterales en los tejidos, lo que agrava los efectos patológicos de la infección. En *C. albicans* y otras especies de levaduras como *Candida glabrata* se han descrito hasta diez genes diferentes que tiene afinidad con la producción de los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), llamados *CDR* (*Cerebellar degeneration-related*) conformado por *CDR1* - *CDR10*. La resistencia a los azoles se ha observado en cepas con un aumento en la expresión de los genes *CDR1* y *CDR2*. Las bombas de eflujo MFS (*Major Facilitator Superfamily*), están codificadas por los genes *MDR* (*Multidrug resistance protein*), emplean el gradiente de protones como fuente de energía, en lugar del ATP (*Adenosin Trifosfato*) y se han asociado con resistencia secundaria al fluconazol y quizá al voriconazol⁶.

En el Hospital Nacional Guillermo Almenara de EsSalud, se han reportado con una tasa de incidencia de 1,18 casos de candidemia por cada 1 000 hospitalizaciones durante el año 2012 y 2013⁷; por tal motivo es fundamental realizar estudios con fortaleza metodológica para conocer la prevalencia de resistencia a fluconazol y voriconazol con el objetivo de encontrar asociaciones que permitan inferir las cualidades o tipo de infección micótica. Además, se debe contar con estudios con poblaciones de diferentes condiciones médicas y fortalecer los programas de vigilancia micótica establecido en nuestras instituciones para permitirnos llegar a conclusiones cercanas que se asemeja a la realidad.

Por lo expuesto, el objetivo de la siguiente investigación fue determinar la resistencia al fluconazol y voriconazol en cepas de *Candida albicans*.

La Presente investigación persigue los objetivos:

1.1. Objetivo general

Determinar la prevalencia de genes de resistencia al fluconazol y voriconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz-2018.

1.2. Objetivos específicos

- (1) Identificar el perfil fenotípico de resistencia a fluconazol y voriconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, por el método difusión en disco.
- (2) Identificar los genes de resistencia a fluconazol y voriconazol existen en las cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa.
- (3) Determinar la variabilidad genotípica del gen *ERG11*, resistente al fluconazol y voriconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, por método de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del problema

Tapia et al.⁸ determinaron mediante la prueba del antifungigrama la resistencia y sensibilidad de *Candida spp* al fluconazol, reportando en muestras de secreción faríngea en pacientes con VIH/SIDA del Hospital “Carlos Andrade Marín”, en el cual fueron 109 pacientes con VIH/SIDA mostrando el 100 % de sensibilidad al fluconazol y voriconazol *in vitro*.

Montoya et al.⁹ identificaron molecularmente y evaluaron la susceptibilidad a fluconazol de *Candida spp.* colonizantes de pie en pacientes diabéticos que asisten a un programa de promoción de la salud de Turbaco, Bolívar durante agosto y diciembre del 2013, estudiaron a 172 pacientes, concluyendo que las especies patogénicas no albicans predomina como colonizantes, con mayor predominio la *C. parapsilosis*, esta identificación contribuye a conocer las especies de *Candida* que colonizan este grupo de pacientes, no hallando cepas resistentes a fluconazol.

Núñez.¹⁰ determinó la resistencia al fluconazol y nistatina de *Candida albicans* vaginal crónica en el Centro Médico de Orientación y Planificación Familiar en Latacunga-Ecuador durante 2013, las pruebas de laboratorio específicamente en el fungigrama la obtuvieron de la resistencia al fluconazol en el 72 % y a la nistatina en un 55 %. Por tanto, determino que sí existe una alta resistencia a los antifúngicos (fluconazol y nistatina) más utilizados para contrarrestar *Candida albicans* vaginal.

Lona-Reyes et al.¹¹ describieron los factores asociados a la infección por *Candida* en una unidad de cuidado intensivo neonatal (UCIN) del Hospital civil de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca” en México durante 2019 que utiliza la profilaxis

con fluconazol. El diseño de estudio fue de casos y controles pareado por edad gestacional realizado en el Hospital de Guadalajara Dr. Juan I. Menchaca en México. Se estudiaron a recién nacidos con infección de *C. glabrata* y para cada uno se seleccionó un control pareado por edad gestacional. El 66,7 % presentaron infección con sexo masculino y con edad gestacional de 31,5 semanas. Se observó mayor riesgo de infección por *C. glabrata* cuando se evidencio la prescripción de más de un esquema antimicrobiano (OR=21, IC 95 % 1,23 - 358,3; $p = 0,006$) y en pacientes con comorbilidades quirúrgicas (OR=8, IC 95 % 1,01 - 63,9; $p = 0,04$). Durante el periodo de estudio el riesgo de infección no se vio aumentado por la exposición a fluconazol. Concluyeron que presentaron mayor riesgo de infección por *C. glabrata* los neonatos con más de un esquema antimicrobiano y aquellos con comorbilidades quirúrgicas.

Sakagami et al.¹² compararon la susceptibilidad de seis antimicóticos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina y anfotericina B) con 133 cepas de *Candida* a partir de hemocultivo durante 2008-2013 en el Hospital Universitario Medico Aichi. Todas las cepas fueron identificadas por espectrometría de masas, la desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF). Luego realizaron el test de susceptibilidad antifúngica por la concentración mínima inhibitoria (MIC) para los antifúngicos ya mencionado, después la extracción de ADN para realizar la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) para los genes *fks1*, *fks2*, *cdr1*, *cdr2*, *snq2*, *erg11* y *ura3*. Luego secuenciamiento de los genes de *C. albicans* fueron el aislado más común seguido por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, y *C. tropicalis*. Los valores del MIC para voriconazol más bajo fueron para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Los valores de MIC más bajo para micafungina fue *C. glabrata*. De los 133 aislamientos, dos cepas se identificaron como resistente a los antifúngicos. Una de la cepa fue *C. glabrata*, resistente a fluconazol en la cual el gen transportador ABC estaba regulada positivamente. La otra cepa también es *C. glabrata* pero resistente a micafungina, que tenía 13 sustituciones de aminoácidos en FKS1 y FKS2 con la sustitución V1342I en

FKS1. Se concluyó que la incidencia en hemocultivo causada por *Candida spp* resistente a los antifúngicos es raro entre 2008-2013 en dicho hospital.

Goemaere et al.¹³ Exploraron la adquisición de resistencia a los antifúngicos y la posible propagación de *C. glabrata* en el Hospital Universitario Leuven (2004-2015), durante un periodo de 12 años mediante el análisis de 187 aislado de *C. glabrata* en hemocultivo. Luego realizaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) para anidulafungina (AFG), anfoterecina B (AMB), caspofungina (CAS), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), micafungina (MFG) y voriconazol (VRC). Luego realizaron la extracción de ADN, la genotipificación y secuenciamiento de FKS. Encontraron una cepa resistente a MFG debido a una mutación en el gen *FKS2*. La resistencia a FLC se mantuvo estable durante todo el periodo y se observó en 20 (10,7 %) de los aislamientos. No se encontró ningún vínculo entre el genotipo y la resistencia. Sin embargo, en un análisis de multilocus indicaron una posible propagación intrahospitalaria de algunos pacientes. Por una PCR en tiempo real mostraron que a diferencia de otras bombas de eflujo ABC, la expresión de CgCDR1 fue significativamente mayor en las cepas resistente, lo que sugiere que estaría más involucrado en la resistencia al fluconazol.

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. *Candida albicans*

2.2.1.1. Generalidades

Candida albicans se encuentra en el ambiente como reservorio natural y también es parte de la microflora normal en humanos¹¹. Sin embargo, también es un patógeno oportunista que puede causar infecciones graves y a menudo, fatales en el torrente sanguíneo¹².

El dimorfismo de *C. albicans*, permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del hospedero. En

forma de levadura se comporta como saprofito, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, *C. albicans* en forma filamentosa, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. Además, es reservorio del hombre, formando parte del microbiota de la piel, cavidad oral, tracto gastrointestinal y sistema genitourinario. Las colonias y las características morfológicas microscópicas de las especies de *Candida* tienen poco valor para la identificación definitiva. La mayoría de las especies de *Candida* producen colonias blancas y cremosas, pero algunas forman colonias más aplanadas y más secas.

La proporción de especies diferentes que causan candidemia se ha desplazado hacia especies de *Candida* no *albicans*; *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* son prominentes en Taiwán y China, respectivamente¹³, y *Candida glabrata* es prominente en los Estados Unidos¹⁴.

2.2.1.2. Patogenia

C. albicans tiene la capacidad de infectar a su hospedador por diversos mecanismos por tener una amplia gama de factores de virulencia. Además tiene varios factores, como la transición morfológica entre levaduras y formas hifales, la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, la formación de biopelículas, el cambio fenotípico y la secreción de enzimas hidrolíticas se consideran como factores de virulencia¹⁵. *C. albicans* tiene dos mecanismos diferentes para invadir las células huésped: la endocitosis inducida y la penetración activa. Para la endocitosis inducida, *C. albicans* expresa proteínas especializadas en la membrana celular (invasinas) que media la unión a los ligando del hospedador como la E-cadherina en las membrana de las células epiteliales¹⁶ y la N-cadherina en las células endoteliales¹⁷,

lo que desencadena el envolvimiento de la célula fúngica en la célula hospedadora.

2.2.1.3. Polimorfismo

La capacidad de *C. albicans* para crecer como levadura y en formas filamentosas (hifas y pseudohifas) es un mecanismo de patogenicidad¹⁸. La forma de hifas es esencial para *Candida spp.* que le permite escapar de los fagocitos en los vasos sanguíneos y también colonizan en dispositivos médicos formando biopelículas¹⁹. Por el contrario, la forma de levadura ayuda a la propagación del patógeno en los tejidos del huésped²⁰.

2.2.1.4. Adhesina e invasinas

C. albicans tiene un complejo de proteínas (adhesinas) especializadas que median la adherencia de otras células de *C. albicans*, superficies abióticas y a las células huésped²¹. Las adhesinas son generalmente GPI (*Glicosilfosfatidilinositol*), proteína modificada de la pared celular (CWP). De las ocho proteínas de Als (aglutininas), la adhesina asociada a la hifa Als3 es especialmente importante para la adhesión²².

2.2.1.5. Aislamiento

La identificación de las levaduras, habitualmente se realiza por diversos métodos comerciales que parten en la reacción de Carbohidratos como *API ID 32C*, *API CAUX* o mediante métodos automatizados como el sistema Vitek – ID YST (*BioMérieux, Marci L'Etoile, France*) y *MicroScans Rapid Yeast ID panel* (*Beckman, USA*). También en el medio de cultivo convencional basado en su característica morfológica de *Candida* como el agar harina de maíz, agar *Sabouraud* dextrosa o agar arroz, junto con los medios cromogénicos diferenciales. La desventaja de estos métodos de

identificación de carácter fenotípicos destaca su lentitud en el crecimiento del hongo y no son muy precisos en la identificación

La biología molecular es una alternativa basada en técnicas de ADN como la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) que han aumentado su rapidez de diagnóstico, mejorando la capacidad de diferenciación entre especies, debido al elevado costo y el requerimiento de personal experto para su interpretación, está en etapa de adaptación a la práctica clínica²³.

El sistema de espectrometría de masas por *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* (MALDI – TOF) es una tecnología emergente capaz de proporcionar una rápida identificación de especies microbianas a partir de colonias aisladas, capaz de diferenciar hasta nivel de subespecie²⁴.

2.2.1.6. Mecanismo y genes de resistencia en *C. albicans*

Existe diversos antifúngicos para tratar infecciones de *Candida*. Los polienos, azoles, equinocandinas, análogos de nucleósidos y alilaminas se utilizan según el tipo y el sitio de infección para las especies de *Candida*^{25,26}.

El antifúngico azole de primera línea como fluconazol, su sitio blanco es el lanosterol 14-alfa-demetilasa codificado por el gen *ERG11*²⁷. Existen diferentes tipos de mecanismo de resistencia al fluconazol por *C. albicans*. Las mutaciones que ocurren dentro de sus alelos *ERG11*, como sustituciones de aminoácidos²⁸. Otro tipo de mecanismo de la resistencia al fluconazol en *C. albicans* es el aumento de la expresión de *ERG11*, debido a la mutación del gen que codifica el regulador transcripcional Upc2p²⁹. Además, los mecanismos de resistencia a fluconazol en *C. albicans* implican la sobreexpresión de las bombas de eflujos Mdr1p y Cdr1p / Cdr2p y TAC1 (activador transcripcional de los genes *CDR*) es un factor de transcripción del grupo de zinc que

regula en los genes que codifican unión de ATP y el transportador ABC codificado por los genes *CDR1* y *CDR2*³⁰.

El voriconazol es un antifúngico de segunda generación, pertenece a la clase de triazol y tiene actividad contra *Candida spp.* Aunque el voriconazol se usa ampliamente para tratamiento de infecciones micótica, tiene efectos adversos a medida que los pacientes se someten a una terapia prolongada³¹.

2.2.1.7. Diagnóstico molecular para el mecanismo de resistencia en *C. albicans*

Un diagnóstico preciso y temprano de una infección por hongos está asociado con resultados favorables para el paciente³². Existe metodología para detección basados en ADN utilizando principalmente reacción en la cadena de polimerasa (PCR), pero también hay pruebas en la detección y amplificación basada en la secuenciación del ácidos nucleicos (NASBA)³³. Además, la PCR en tiempo real con sondas fluorescentes que permite la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), asociados con la resistencia a fármacos³⁴. La detección de mecanismos de resistencia se ha realizado mediante sonda de transcripción inversa RNAm en los principales genes de resistencia a fármacos, como *ERG11*, *MDR1*, *CDR1* y *CDR2*³⁵.

La *Next-Generation Sequencing* (NGS), esta técnica se han implementado para laboratorios clínicos con 121 amplicones para amplificar los genes conocidos de resistencia a medicamentos antifúngicos y sus mutaciones³⁶.

2.2.2. Fármacos antimicóticos contra *Candida albicans*

2.2.2.1. Fluconazol (C₁₃H₁₂F₂N₆O)

Es un antifúngico de la familia de los azoles para el tratamiento de las candidiasis superficiales y sistémicas. El mecanismo de acción inhibe el citocromo P450 fúngico de la enzima 14 α -demetilasa. Esta inhibición previene la conversión de lanosterol a ergosterol, componente esencial de la membrana citoplasmática fúngica³⁷. Además, el fluconazol es recomendado para infecciones fúngicas invasivas en el humano, una identificación rápida del patógeno es fundamental para el tratamiento terapéutico disminuyendo la morbilidad y mortalidad con método de diagnóstico más rápido como la técnica de espectrometría de masas *MALDI-TOF*³⁸.

2.2.2.2. Voriconazol (C₁₆H₁₄F₃N₅O)

Es un fármaco antifúngico del grupo de los derivados triazólicos. El mecanismo de acción del voriconazol es similar a los imidazólicos, actúa a nivel de la desmetilación del ergosterol³⁹. El voriconazol es una alternativa de tratamiento para pacientes con candidiasis con fracaso de otros antifúngicos, tiene una tasa 55 % de éxito en el tratamiento⁴⁰. Además, tiene una actividad de amplio espectro a concentraciones de ≤ 1 mg/l contra los patógenos fúngicos más comunes incluyendo cepas de *Candida* resistente a fluconazol⁴¹⁻⁴².

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Investigación no experimental, observacional de nivel descriptivo y de corte transversal.

3.2. Consideraciones éticas

Cepas de *C. albicans*, almacenadas en el laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario Luis Nicasio Saenz, no se requiere autorización de pacientes. Además, los datos se trataron en confidencialidad de acuerdo a las buenas prácticas clínicas⁴³.

3.3. Unidad de análisis

Cepas de *Candida albicans* resistente a fluconazol y voriconazol aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, Lima, Perú.

3.4. Muestra

Estuvo compuesta por cepas de *C. albicans* de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz. Lima, Perú-2018.

3.5. Tamaño de muestra

Estuvo constituido por la 176 cepas de *Candida* spp, aisladas de hemocultivos de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, Lima, Perú-2018

3.6. Técnicas o instrumentos de recolección de la información de datos

3.6.1. Aislamiento e identificación de *Candida albicans*

Las muestras de *C. albicans*, fueron aisladas a partir de frascos de hemocultivos automatizados por *BacTAlert* (*Organon*). Ver anexo 2. Se inocularon mayor de 10 mL de sangre periférica de pacientes en cada frasco de hemocultivo, se incubaron a 37 °C por 7 días. Se consideró un hemocultivo negativo cuando no hay un sistema de alerta durante los 7 días en el equipo automatizado. Un hemocultivo positivo fue sembrado en agar *Sabouraud* dextrosa (ASD) suplementado con cloranfenicol. Se sembraron por estrías en placas de ASD y con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se agregó una cantidad considerable de muestra en el medio de cultivo ASD, realizándose por duplicado. Los medios de cultivos fueron incubados en condiciones de aerobiosis a 37 °C durante 24 h y el otro, a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) durante 72 h. Posteriormente, se realizó una resiembra en el medio de cultivo ASD, con la finalidad de verificar la pureza de *C. albicans*⁴⁴.

3.6.2. Caracterización fenotípica de *C. albicans*

A partir del aislamiento de especie micótica, se procedió a evaluar las características morfológicas de las colonias: aspecto, tamaño, forma, color, elevación de la colonia, que nos orientaron hacia el grupo en estudio, *C. albicans* en ASD, con característica de colonias con crecimiento rápido, cremosas, de color blanco o ligeramente crema, convexas, lisas, de aspecto mate u opaco⁴⁵.

3.6.2.1. Observación microscópica

A partir del crecimiento en el ASD, se procedió a colocar en un portaobjetos una cantidad considerable de la cepa, posteriormente se

agregó una gota de hidróxido de potasio al 10 % y se cubrió con una laminilla facilitando la observación, debido a que esta sustancia presenta un efecto clarificador, disolviendo los distintos elementos celulares y dejando intacta la pared celular fúngica. De igual manera, se realizó el mismo procedimiento, con colorante el azul de lactofenol con la finalidad de observar al microscopio la morfología celular, como la presencia de blastoconidias redondas u ovals, con o sin gemación, pseudohifas, posiblemente *Candida spp*⁴⁵.

3.6.2.2. Prueba del tubo germinativo

Se emulsiono una porción de la colonia aislada de *Candida spp*. en 0,5 mL de suero humano. Se incubó a 35 °C durante 2 h depositando una gota de la emulsión sobre un portaobjetos y un cubreobjetos. Las pruebas positivas se visualizaron en los tubos germinales⁴⁵.

3.6.2.3. Sistema de identificación automatizado *MicroScan RAPID YEAST ID PANEL*.

Se utilizó un sistema de micro dilución para aislamientos clínicos de levaduras, empleando paneles de identificación a partir de 27 sustratos, usando reacciones enzimáticas; en un tiempo de 4 h, de fácil configuración y lectura. La interpretación automatizada se realizó a través de *LabPro Information Manager* o en línea con la herramienta de búsqueda *Biotype*. Ver anexo 1.

3.6.3. Prueba de Sensibilidad para *C. albicans*

Para la determinación de la sensibilidad antifúngica, se realizó según lo recomendado por Meiss et al⁴⁶. El procedimiento de difusión en disco se llevó a cabo de la siguiente manera: se tomaron de 3 - 5 colonias de *C. albicans*,

luego con ayuda de un hisopo estéril, se sembró por diseminación sobre la superficie de la placa de agar *Mueller Hinton* modificado (se adiciono 2 % glucosa y 0.5 mg/mL de azul de metileno), la cual se dejó secar de 3 - 5 minutos, posteriormente con ayuda de una pinza estéril, se presionó suavemente sobre la superficie del agar y se colocaron los discos de antimicóticos de elección: fluconazol (25 µg), y voriconazol (1 µg). Después, estas placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en aerobiosis, al cabo de cierto tiempo se realizó la medición de los halos de inhibición y dependiendo del tamaño se clasificaron, según las categorías establecidas por *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* del 2019, en sensible (S), intermedio (I) y resistente (R). Además, para el control de calidad del método difusión en disco y para la determinación de susceptibilidad se utilizaron cepa de *C. albicans* ATCC 90028.

3.6.4. Amplificación del gen *ERG11* de resistencia para *C. albicans*

Se realizó según lo recomendado por Wu et al.⁴⁷ las levaduras fueron sembradas en medio caldo de Peptona Dextrosa Extracto de Levadura (YEPD) a 37 °C con agitación, hasta alcanzar fase exponencial y se extrajo el ADN genómico mediante el sistema comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit® (Roche)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se amplificaron por PCR la región 405-488 del gen *ERG11* (Gene ID: 3641571). Cada reacción estuvo compuesta por tampón de RPC 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, Taq polimerasa Biolasa (Bioline®) 5 U y cebadores 0,2 µM (Tabla 1), 10 µL de ADN templado genómico y se completó el volumen a 50 µL con agua bidestilada.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la amplificación del gen *ERG11*

Gen	Nombre	5' a 3'	Secuencia	Tamaño
<i>ERG11</i>	CaERG11_1	Sentido	GAAAGGGAATTCAATCG	1745 pb
	CaERG11_2	Antisentido	TGTTAATCCAACCTAAGTAAC	

Fuente. Wu et al. 2018⁴¹

3.6.5. Secuenciación del gen *ERG11*

Los productos de la PCR se purificaron usando el sistema enzimático ExoProStar. Se mezclaron 40 µL de producto de la PCR y 16 µL de la mezcla enzimática ExoProStar y se incubaron en termociclador a 37 °C durante 15 min y luego a 80 °C durante 15 min, con el fin de inactivar algunas enzimas. Las muestras fueron secuenciadas en el equipo ABI 3730xl (*Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.*) en el Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú), se utilizaron los cebadores diseñados por el programa *Primers 3* (ver tabla 2). Una vez secuenciadas las muestras, se depuraron las secuencias usando dicho programa.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la secuenciación del gen *ERG11*

Gen	Nombre	5' a 3'	Secuencia
<i>ERG11</i>	CaERG11_1	Sentido	GAAAGGGAATTCAATCG
	CaERG11_2	Antisentido	TGTTAATCCAACCTAAGTAAC
	CaERG11_3	Sentido	CTTCATATGGTCAACAACC
	CaERG11_4	Antisentido	ATGAAACAGAATTAGCTTTG
	CaERG11_5	Sentido	GTTATGAAAACCTCAACCAG
	CaERG11_6	Antisentido	GAGGTAAAGGTAAATTAGGG
	CaERG11_7	Sentido	TCCAGGTTATGCTCATACTA
	CaERG11_8	Antisentido	TACCGAAAACCTGGAGTAGT

Fuente. Xu et al. 2008

3.7. Procesamiento de la información o de datos

Todos los datos fueron obtenidos a través de una base de datos establecido por un formato. Se evaluó, la prevalencia de genes de resistencia con el paquete estadístico STATA 12 y variabilidad genética con el programa Mega 6.0.

IV. RESULTADOS

Se aislaron un total de 176 cepas de *Candida spp.* a partir de los hemocultivos, en el laboratorio del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz durante el 2018. Luego fueron reactivadas las cepas y se procedieron a identificar para *Candida albicans*. En la figura 1 se observa *C. albicans* por la prueba de tubo germinativo. Además, fueron confirmados por el sistema de identificación automatizada por *MicroScan RAPID YEAST ID PANEL*. Se obtuvieron 39 (22,2 %) identificados como *C. albicans* y 137 (77,8 %) como *Candida* no albicans.

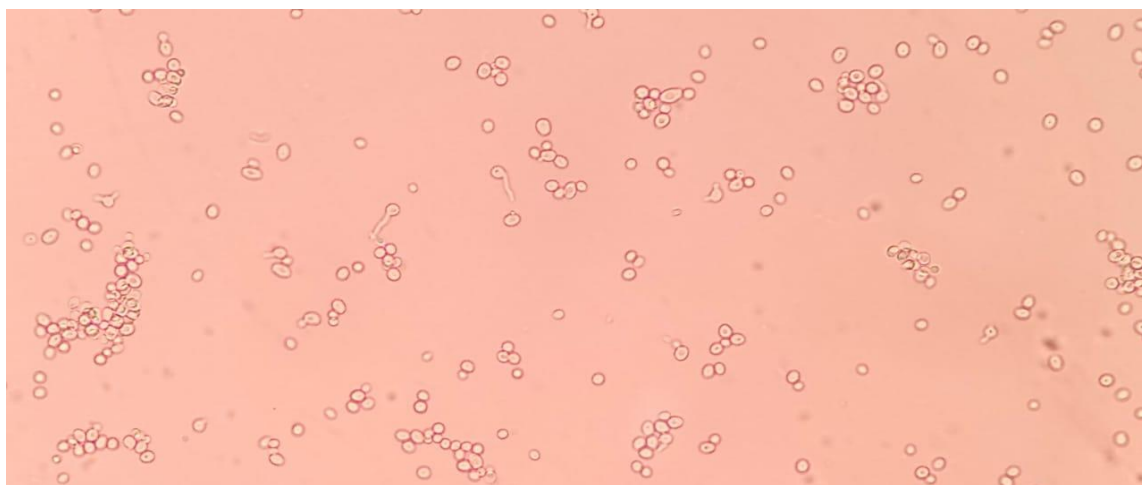


Figura 1. Característica fenotípica de *C. albicans* por la prueba de tubo germinativo
Fuente. Elaboración propia, marzo 2018

Prueba de sensibilidad para *Candida albicans*.

La prueba de sensibilidad para *C. albicans* se realizó de acuerdo al procedimiento Meis⁴⁶, y los criterios de interpretación que se observa en la tabla 3, para la prueba de difusión en disco de fluconazol y voriconazol fueron de la CLSI (42–44).

Tabla 3. Interpretación de la prueba de difusión en disco (mm) para *Candida albicans*

Antifúngico	S	SDD	R
Fluconazol	≥ 19	15-18	≤ 14
Voriconazol	≥ 17	14-16	≤ 13

S: sensible; SDD: susceptibilidad dependiente de la dosis R: resistente.
Fuente. CLSI M44-A. 2017

En la tabla 4 se obtuvieron la siguiente prueba de sensibilidad para *C. albicans*.

Tabla 4. Interpretación de los resultados de sensibilidad para *C. albicans*

Antifúngico	S		SDD		R	
	%	N	%	N	%	N
Fluconazol	92,3	36	0	0	7,7	3
Voriconazol	94,9	37	0	0	5,1	2

S: sensible; SDD: susceptibilidad dependiente de la dosis R: resistente.

Fuente: Elaboración propia, marzo 2018

En la tabla 5 se obtuvieron las cepas aisladas de *C. albicans* con resistencia a los azoles (fluconazol y voriconazol), fueron resistentes a más de un antifúngico. También se puede observar en la figura 2 y 3 los halos de inhibición para las cepas_Ca1 y cepa_Ca2 respectivamente.

Tabla 5. Sensibilidad de las cepas con un tipo de resistencia a los azoles

N° de cepas	Fluconazol	Voriconazol
cepa_Ca1	R	R
cepa_Ca2	R	S
cepa_Ca3	R	R

S: sensible; R: resistente.

Fuente. Elaboración propia, marzo 2018

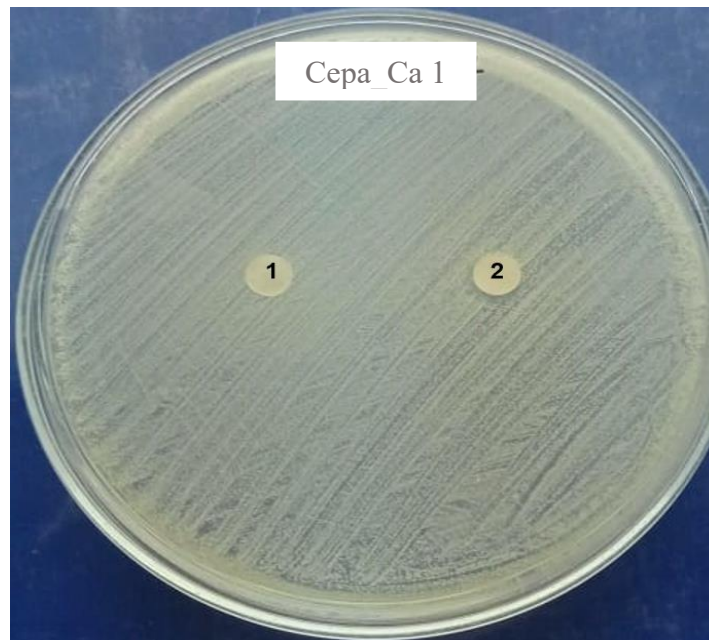


Figura 2. Difusión en disco para *C. albicans* (cepa_Ca1). 1: Fluconazol (FCA25).; 2: Voriconazol (VCZ1), se muestra resistencia en ambos.
Fuente. Elaboración propia, marzo 2018

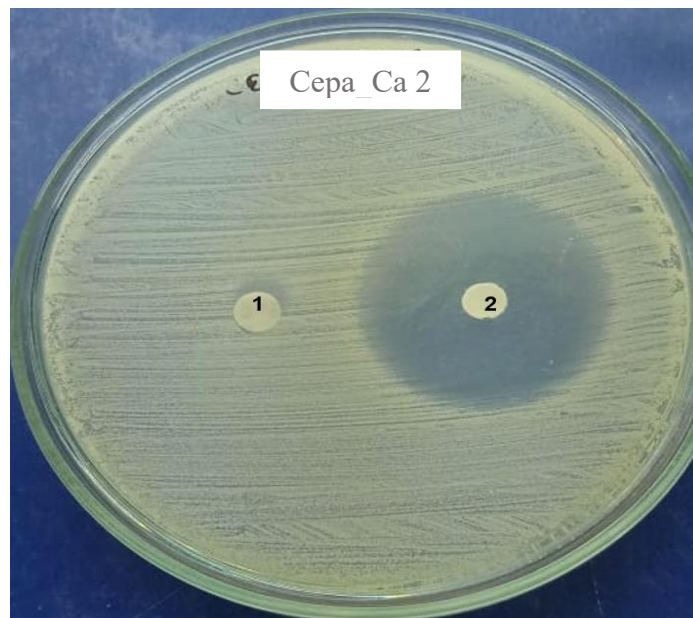


Figura 3. Difusión en disco para *C. albicans* (cepa_Ca2). 1: Fluconazol (FCA25); 2: Voriconazol (VCZ1), mostrando halo de sensibilidad a voriconazol.
Fuente. Elaboración propia, marzo 2018

Caracterización molecular del gen de resistencia a fluconazol y voriconazol.

Se observa en la figura 4, las tres cepas (cepa_Ca1, cepa_Ca2 y cepa_Ca3), se amplificaron por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), el gen *ERG11* detectándose en las tres cepas dicho gen.

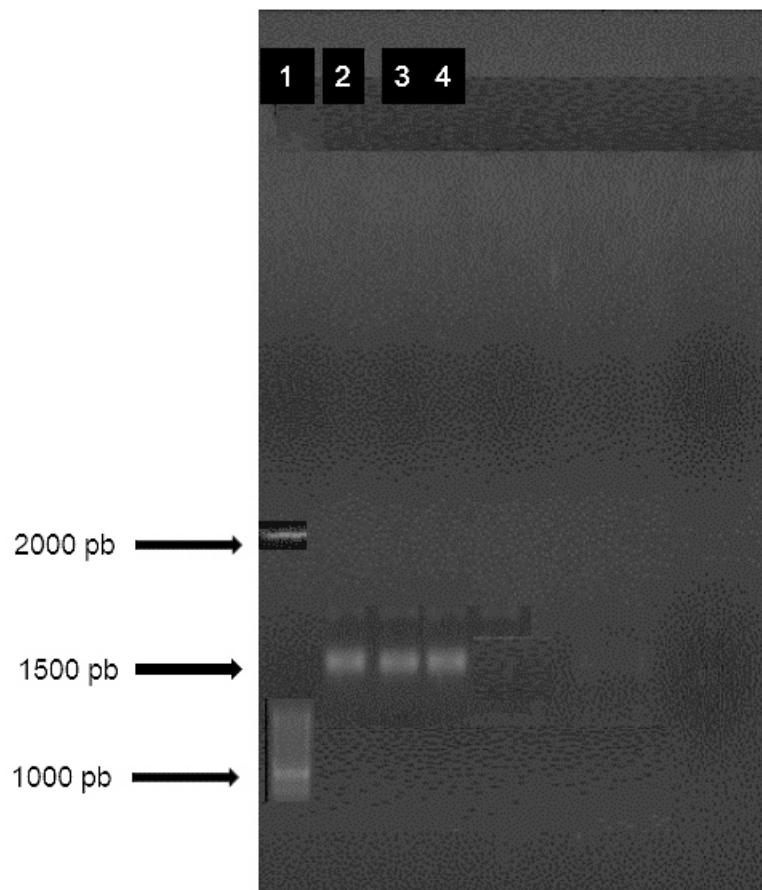


Figura 4. Reacción de la Cadena de polimerasa para la amplificación del gen *ERG11* (1587pb). Carril 1: marcador del peso molecular; Carril 2,3 y 4: marcador del gen *ERG11* en cepa_Ca1, cepa_Ca2, cepa_Ca3, respectivamente.

Fuente. Elaboración propia, marzo 2018

Secuenciamiento del gen *ERG11* con resistencia a fluconazol y voriconazol

Los resultados de la tabla 6, refieren el secuenciamiento de lo analizado por BLAST y se compararon con la secuencia publicada en GenBank de *C. albicans* del gen *ERG11* cuya secuencia genómica AY856352 de 1587 pb.

Tabla 6. Resultado del secuenciamiento de las cepas resistente a los azoles

N° de cepas	Mutación de nucleótido	Cambios en los aminoácidos
cepa_Ca1	T769C, A427C, A395T, T613G	Y257H, K143Q, Y132F, Y205E
cepa_Ca2	T769C, T613G, A779T, A395T	Y257H, Y205E, E260V, Y132F
cepa_Ca3	T769C, A427C, A395T, T613G, A395T	Y257H, K143Q, Y132F, Y205E, D116E

La secuencia de *C. albicans* fueron comparado con GenBank AY856352

Abreviatura de los aminoácidos: D, (Ácido aspártico); E, (Ácido glutámico); F, (Fenilalanina); H, (Histidina); K, (Lisina); Q, (Glutamina); V, (Valina); Y, (Tirosina). Abreviatura de los nucleótidos: A, (Adenina); T, (Timina); G, (Guanina); C, (Citosina).

Fuente. Elaboración propia, marzo 2021

V. DISCUSIÓN

La fungemia, es la presencia de un hongo en la sangre por lo tanto *Candida albicans* es la más prevalente en un hemocultivo. Los tratamientos para una fungemia son por lo general fluconazol y voriconazol, aunque *C. albicans* ya presenta varios mecanismos de resistencias a los azoles.

En la presente investigación, se evaluaron las cepas de *Candida spp* aisladas a partir de hemocultivo, de las cuales 39 (22 %) fueron *C. albicans*. En la tabla 4, se observa los resultados del antibiograma por difusión en disco para los azoles (fluconazol y voriconazol) y en la tabla 5 las cepas resistentes 3 (7,7 %) y 2 (5,1 %) para fluconazol y voriconazol respectivamente. En un reporte de candidemia realizado en un hospital nacional en el Perú, durante 2004-2006, el 39 % por *C. albicans* fue reportado en unidad de cuidados intensivo (UCI)⁵⁰ y otro estudio realizado también en el Perú durante 2013-2015, a partir de hemocultivo se aisló el 27,8 % de *C. albicans*⁵¹, por lo tanto, en nuestro nosocomio la frecuencia de aislamiento por *C. albicans* está en relación con otros estudios realizados en otros hospitales del Perú y no habiendo diferencia significativa en el aislamiento de *C. albicans* a partir de hemocultivos. Con respecto a la resistencia a fluconazol, en un estudio realizado por Rodríguez et al, solo 1 (1,1 %) presentó resistencia al fluconazol, no reportando resistencia al voriconazol para *C. albicans* a partir de hemocultivos. Mientras la resistencia a fluconazol es 1 (0,5 %) para América latina⁵² y 1 (2,2 %) en Perú⁵³, podemos decir que en nuestro estudio han aumentado los números de casos que tiene resistencia a fluconazol con respecto a *C. albicans* ya sea por un mecanismo de resistencia a los azoles. En un estudio realizado respecto a la resistencia a voriconazol fue 1 (0,3 %) para Brasil⁵⁵ y 3 (5.0 %) en Perú⁵⁴. A comparación con nuestro estudio la resistencia a voriconazol no tiene diferencia significativa con los casos que se dieron en Brasil y Perú.

A pesar que la resistencia a fluconazol y voriconazol en nuestro estudio es bajo, el mecanismo de resistencia a los azoles está relacionado con la mutación del gen *ERG11*⁵⁶. El gen *ERG11* produce la enzima 14- α -esterol desmetilasa (CYP51A1), que participa en la biosíntesis del ergosterol y es el sitio activo de los azoles^{57,58}. Por tal motivo en nuestro

estudio en la figura 4 se tomó interés en dicho gen *ERG11* para una PCR encontrándose que en las tres cepas (cepa_Ca1, cepa_Ca2 y cepa_Ca3), tuvieron resistencia a los azoles.

El gen *ERG11* está compuesto por 1587 pb, de los cuales, los primeros 1560 pb están relacionado con la resistencia a los azoles, cuando ocurre una sobreexpresión o mutación⁵⁹. En nuestro estudio de las cepas de *C. albicans* aisladas a partir de hemocultivos, buscamos mediante secuenciamiento del gen *ERG11* alguna mutación relacionada con la resistencia a los azoles. En la tabla 3 de nuestro estudio mostramos las 3 cepas (cepa_Ca1, cepa_Ca2 y cepa_Ca3) aisladas, se encontraron mutaciones en el T769C y está relacionado en el cambio de aminoácidos Y257H. En estudios anteriores el Y257H está relacionado con una susceptibilidad reducida para los azoles en *C. albicans*.^{60,61} En la cepa_Ca1 y cepa_Ca3 se encontraron las mismas mutaciones Y257H, K143Q, Y132F y 205F. Aunque en la cepa_Ca3 tiene una mutación más D116E. Por lo tanto, la D116E, se podría decir que no está relacionado con la resistencia a los azoles. La cepa_Ca2 se ha encontrado cuatro mutaciones Y257H, Y205E, E260V y Y132F, aunque esta cepa solo se encontró resistencia a fluconazol y no a voriconazol. La Y132F está relacionado en un aumento en la resistencia a fluconazol y voriconazol⁶², pero en nuestro estudio solo se observó resistencia a fluconazol.

Existen varios estudios que han identificado mutaciones puntuales para el gen *ERG11* en *C. albicans* resistente a los azoles, por lo tanto, ocurren sustituciones de aminoácidos y cambio estructural de la enzima CYP51A1 y altera su afinidad. Existen más de 160 sustituciones distintas de aminoácidos que han ocurrido en el gen *ERG11*⁶³⁻⁶⁴.

VI. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de cepas de *C. albicans* 39 (22 %) a partir de muestras de hemocultivos de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, de los cuales el 3 (7,7 %) y 2 (5,1 %) fue resistentes a fluconazol y voriconazol respectivamente.
2. De las cepas aisladas con resistencia a los azoles fenotípicamente fueron dos cepas (cepa_Ca1 y cepa_Ca3) fueron resistentes a fluconazol y voriconazol. La cepa_Ca2 solo fue resistente a fluconazol, pero no a voriconazol.
3. Se identificaron el gen *ERG11* en las tres cepas (cepa_Ca1, cepa_Ca2 y cepa_Ca3) con resistencia a los azoles que está relacionado con la resistencia a fluconazol y voriconazol.
4. Mediante el secuenciamiento del gen *ERG11* de las tres cepas, se encontraron una sustitución de aminoácidos la tirosina por la histidina (Y257H), que está relacionado con la baja afinidad de los azoles.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tsai P-W, Chen Y-T, Hsu P-C, Lan C-Y. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *BioMedicine*. marzo de 2013;3(1):51-64.
2. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 12 de diciembre de 2011;10(2):112-22.
3. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PloS Pathog*. 2012;9(9)
4. Wilson D. *Candida albicans*. *Trends Microbiol* [Internet].2018; Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X18302336>.
5. De Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJO, de Sousa Cartágenes M do S, Filho AKDB, do Nascimento FRF, et al. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Front Microbiol*. 2018;9:1351
6. Morschhäuser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* FG B. febrero 2010;47 (2):94-106.
7. Rodríguez L, Illescas LR, Ramírez R, Bustamante B, Diaz A, Hidalgo J. Nosocomial bloodstream infections Due to *Candida spp.* at a tertiary care center in Lima, Perú: Species Distribution and Clinical Features. *Open Forum Infect Dis*. 2014;1(suppl_1):S381-2
8. Tapia, M. Determinación de la resistencia y sensibilidad de *Candida* al fluconazol en muestra de secreción faríngea en pacientes VIH/SIDA en el hospital "Carlos Andrade Marín" durante el periodo de Enero a Junio de 2015. [Riobamba, Ecuador]: Universidad de Cartagena; 2014.
9. Montoya RIM, Álvarez PS. Identificación molecular y evaluación de la susceptibilidad a fluconazol en *Candida spp.* colonizante en pie de pacientes diabéticos de un grupo de promoción de la salud del municipio de Turbaco- Bolívar. [Cartagena]: Universidad de Cartagena; 2014.
10. Núñez, W. "Determinación de la resistencia al fluconazol y nistatina mediante el fungigrama en vaginosis crónica causada por *Candida albicans* en mujeres de 18-35 años que acuden a CEMOPLAF (Centro Médico de Orientación). [Ambato, Ecuador]: Universidad Técnica de Ambato; 2014.
11. Lona-Reyes JC, Gómez-Ruiz LM, Cordero-Zamora A, Chávez-Rodríguez M, Gallegos-Marín JA, Jiménez-Hernández DS. Infección del torrente sanguíneo por *Candida*

- glabrata* en una unidad de cuidados intensivos neonatales con prescripción de profilaxis con fluconazol. Rev Iberoam Micol. 2020;37(3):100-3.
12. Sakagami T, Kawano T, Yamashita K, Yamada E, Fujino N, Kaeriyama M, et al. Antifungal susceptibility trend and analysis of resistance mechanism for *Candida* species isolated from bloodstream at a Japanese university hospital. J Infect Chemother. 2019;25(1):34-40.
 13. Goemaere B, Lagrou K, Spriet I, Hendrickx M, Becker P. Clonal Spread of *Candida glabrata* Bloodstream Isolates and Fluconazole Resistance Affected by Prolonged Exposure: a 12-Year Single-Center Study in Belgium. Antimicrob Agents Chemother. 2018. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00591-18>
 14. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. Nat Rev Microbiol. 2018;16(1):19-31.
 15. Yang Z-T, Wu L, Liu X-Y, Zhou M, Li J, Wu J-Y, et al. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida spp.* bloodstream infection in Shanghai. BMC Infect Dis. 2014;14:241.
 16. Cleveland AA, Harrison LH, Farley MM, Hollick R, Stein B, Chiller TM, et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. PLoS One. 2015;10(3):2-12.
 17. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-28.
 18. Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. PLoS Biol. Marzo de 2007;5(3):10455-462.
 19. Phan QT, Fratti RA, Prasadarao NV, Edwards JE, Filler SG. N-cadherin mediates endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. J Biol Chem. 2005; 280(11):10455-61.
 20. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev Anti Infect Ther. Enero de 2012; 10(1):85-93.
 21. Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. Function of *Candida albicans* Adhesin Hwp1 in Biofilm Formation. Eukaryot Cell. 2006;5(10):1604-10.
 22. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. Julio de 2004;12(7):317-24.

23. Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB, Alsteens D, Dufrêne YF, Lipke PN. A Role for Amyloid in Cell Aggregation and Biofilm Formation. PLOS ONE. 2011;6(3):e17632
24. Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Tobouti P, Islam A, Hoyer LL, et al. Evaluation of the Role of *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Proteins in Human Oral Epithelial Cell Interactions. PLOS ONE. 2012;7(3):e33362.
25. Uno K, Sugiura S, Konishi M, Yasuda Y, Mikasa K, Kita E. Evaluation of diagnostic methods for *Candida albicans* translocation in a mouse model: seminested polymerase chain reaction, blood culture, and serological assays. J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother. Agosto de 2007;13(4):196-203.
26. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J Clin Microbiol. 2009;47(9):2912-7.
27. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2016;62(4):10-50.
28. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. J Clin Microbiol. 2013;51(8):2571-81.
29. Song JL, Harry JB, Eastman RT, Oliver BG, White TC. The *Candida albicans* lanosterol 14-alpha-demethylase (ERG11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(4):1136-44.
30. Flowers SA, Colón B, Whaley SG, Schuler MA, Rogers PD. Contribution of Clinically Derived Mutations in ERG11 to Azole Resistance in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(1):450-60.
31. MacPherson S, Akache B, Weber S, De Deken X, Raymond M, Turcotte B. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(5):1745-52.
32. Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux M-E, d'Enfert C, et al. Genotypic Evolution of Azole Resistance Mechanisms in Sequential *Candida albicans* Isolates. Eukaryot Cell. 2007;6(10):1889-1904.

33. Lo Re V, Carbonari DM, Lewis JD, Forde KA, Goldberg DS, Reddy KR, et al. Oral Azole Antifungal Medications and Risk of Acute Liver Injury, Overall and by Chronic Liver Disease Status. *Am J Med.* 2016;129(3):283-91.
34. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida bloodstream* infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3640-45.
35. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and Nonmolecular Diagnostic Methods for Invasive Fungal Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27 (3):490-526.
36. Bougnoux M-E, Tavanti A, Bouchier C et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5265–6.
37. Park S, Perlin DS. Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb. Drug Resist.* 2005;11(3): 232-38.
38. Giordano ALPL, Lyra L, Pontes L, Beraquet CA, Schreiber AZ. Avaliação da suscetibilidade de espécies de *Candida* a fluconazol por matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF). *Braz J Infect Dis.* 2021;25:101418.
39. Swinne D, Watelle M, Nolard N. Actividad in vitro del voriconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B contra levaduras no *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22(1):24-8.
40. Donnelly JP, De Pauw BE. Voriconazole a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:107-17.
41. Garnaud C, Botterel F, Sertour N, Bougnoux M-E, Dannaoui E, Larrat S, et al. Next-generation sequencing offers new insights into the resistance of *Candida spp.* to echinocandins and azoles. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(9):2556-65.
42. Sagarika A, Sowmya B, Bhatnagar A, Kameswari D. Fluconazole and Voriconazole: a review. 2016;5:1004-8.
43. Mazzanti Di Ruggiero MD los Á. Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos. *Rev Colomb Bioét.* 2015;6(1):125-44.
44. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos y Técnicas de Laboratorio para la Identificación de Principales Hongos Causante de Micosis Humanas. Lima; 2007. 104 p.
45. Mendoza M. Importancia de la identificación de levaduras. *Rev Soc Microbiol Venezuela.* 2005;25(1):103-17.

46. Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;36(4):215-23.
47. Wu Y, Wu M, Wang Y, Chen Y, Gao J, Ying C. ERG11 couples oxidative stress adaptation, hyphal elongation and virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2018;18(7). doi: 10.1093/femsyr/foy057.
48. Wayne PA. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. *CLSI M44-A*. 2004;23(6).
49. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):819-26.
50. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1735-45.
51. Paz Rojas EL, De León Pandolfi DP, Ramírez Ponce R. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, ESSalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta Médica Perú*. 2008;25(3):140-7.
52. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Perú: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLOS ONE*. 2017;12(4):e0175172.
53. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2011;43(3):176-85.
54. Bustamante B, Martins MA, Bonfietti LX, Szeszs MW, Jacobs J, Garcia C, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. *J Med Microbiol*. 2014;63(6):855-60.
55. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical center. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816-23.

56. Xiang M-J, Liu J-Y, Ni P-H, 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):383-93.
57. Ji H, Zhang W, Zhou Y, Zhang M, Zhu J, Song Y, et al. A Three-Dimensional Model of Lanosterol 14 α -Demethylase of *Candida albicans* and Its Interaction with Azole Antifungals. J Med Chem. 2000;43(13):2493-505.
58. Podust LM, Poulos TL, Waterman MR. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from Mycobacterium tuberculosis in complex with azole inhibitors. Proc Natl Acad Sci. 2001;98(6):3068-73.
59. Xu Y, Chen L, Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. J Antimicrob Chemother. 2008;61(4):798-804.
60. 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.
61. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M, et al. Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(10):2676-84.
62. Feng L, Wan Z, Wang X, Li R, Liu W. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene. Chin Med J (Engl). 2010;123(5):544-8.
63. 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. 2010;66(4):373-84.
64. Manastır 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.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Panel de *MicroScan Rapid Yeast ID Panel*

1. HPR	2. ILE	3. PRO	4. TYR	5. GLY	6. GGLY	7. GLAR	8. GLPR	9. AARG
10. LYAL	11. ALA	12. STY	13. URE	14. IDX	15. HIS	16. SUC1	17. SUC2	18. TRE
19. AGL1	20. AGL2	21. BGL	22. BGAL	23. BDF	24. AGAL	25. NAG	26. CELL	27. NGAL

HPR, hydroxyproline; *ILE*, isoleucine; *PRO*, proline; *TYR*, tyrosine; *GLY*, glycine; *GGLY*, glycylglycine; *GLAR*, glycylarginine; *GLPR*, glycylproline; *AARG*, arginylarginine; *LYAL*, lysylalanine; *STY*, seryltyrosine; *IDX*, indoxyl phosphate; *HIS*, histidine; *SUC1* and *SUC2*, sucrose; *BGL*, glucopyranoside; *BDF*, fucopyranoside; *CELL*, cellobiose; *NGAL*, galactosaminide; *NAG*, glucosamine.

Fuente. *American Society for Microbiology*.

ANEXO 2. OFICIO N° 058-2018 – DIRSAPOL/CHPNP-LNS/DEPPC-AM



“Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional”

Lima, 10 de enero del 2018.

OFICIO N° 058 – 2018 – DIRSAPOL/ CHPNP – LNS/DEPPC -AM.

Señor : Biólogo
Alberto Javier PONCE MEDINA
Tesista de Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Asunto : Conformidad para la realización de trabajo de investigación
- Tesis.- **REMITE.**

Ref. : Solicitud para realizar el Desarrollo de Tesis en el
Laboratorio de Microbiología (15NOV17)

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para saludarlo cordialmente y en comunicarle que en relación su Solicitud para el desarrollo de la investigación de “Prevalencia de genes de resistencia al fluconazol y voriconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz – 2018”, se ha dado visto de conformidad para realizarlos en los ambientes del laboratorio de Microbiología de este nosocomio durante el periodo 2018, a su vez, deberá presentar al término de su ejecución Un (01) ejemplar de la tesis en físico y la base de datos en digital en Excel en la Oficina de Investigación, asimismo, deberá apersonarse a la Oficina de Administración de Personal (OFAD) para registrar sus datos correspondientes.

Es propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi especial consideración y deferente estima personal.

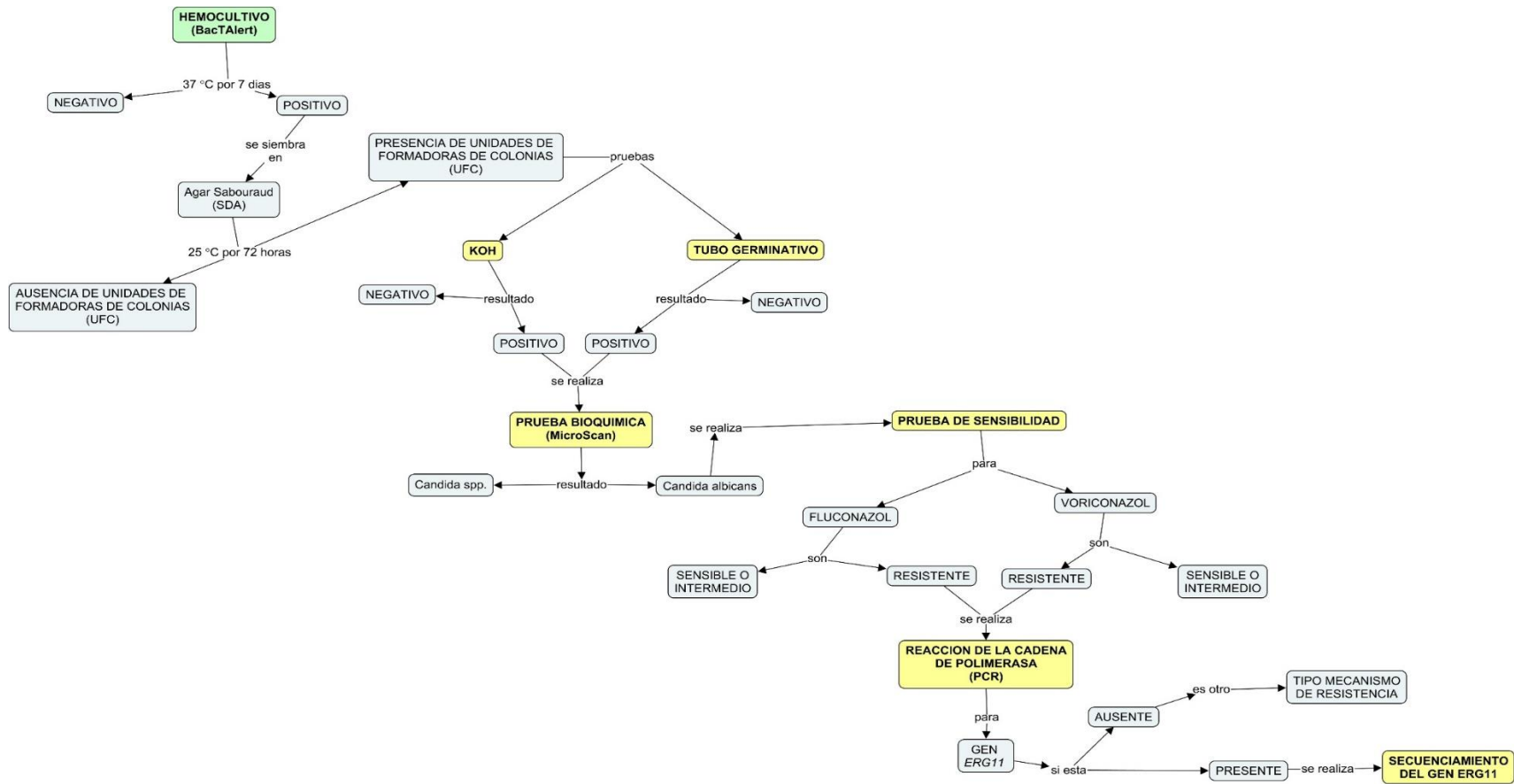
Dios guarde a Ud.

DFVR/GNP




03-217293
Gladys NALVARTE PALOMINO
Coronel SPNP
Jefe de Laboratorio de Microbiología
Complejo Hospitalario PNP Luis N. Sáenz

ANEXO 3. Flujograma para aislamiento y genes de resistencia de *C. albicans*



Fuente. Elaboración propia, marzo 2018