

Artículo Original

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

Prevalence of fluconazole and voriconazole resistance genes from *Candida albicans* strains isolated from patients at the Luis Nicasio Sáenz Police Hospital Complex - 2018

Alberto Javier Ponce-Medina ^{1,a}, Luis Alberto Inostroza-Ruiz ^{1,b}

Recibido: 05/10/2021 Aceptado: 27/12/2021 Publicado: 31/12/2021

Resumen

En la presente investigación se trata de una infección sistémica en pacientes con fungemia donde fueron aisladas cepas de *C. albicans* a partir de hemocultivos. El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia de genes resistentes a 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 aisladas de hemocultivos y para la identificación de *C. albicans*, se realizó 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 de difusión en disco, luego se realizó un análisis por PCR para obtener el secuenciamiento con el ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) 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 a 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. La mutación en el T769C está relacionada en el cambio de aminoácidos Y257H que se encontraron en las tres cepas, concluyendo que el Y257H está relacionado con una susceptibilidad reducida para 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

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.

a Autor para correspondencia: alberto.ponce@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-5763>

b E-mail: linostrozar@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8038-0730>

Citar como:

Ponce-Medina, A. y Inostroza-Ruiz, L. (2021). Prevalencia de genes de resistencia a fluconazol y voriconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz – 2018. *Ciencia e Investigación* 2021 24(1):39-45. doi: <https://doi.org/10.15381/ci.v24i1.22237>

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. The mutation in the T769C is related to the change of amino acids Y257H that were found in the three strains. It is concluded that Y257H is related to a reduced susceptibility to azoles.

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

INTRODUCCIÓN

Las micosis es causadas por hongos y está asociadas 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 *C. glabrata* se han descrito hasta diez genes diferentes relacionados con la producción de los transportadores ABC, llamados *CDR1 - CDR10*. La resistencia a azoles se ha observado en cepas con aumento en la expresión de los genes *CDR1* y *CDR2*. Las bombas de eflujo MFS, codificadas por los genes *MDR*, emplean el gradiente de protones como fuente de energía, en lugar del ATP y se han asociado con resistencia secundaria al fluconazol y quizá al voriconazol⁶.

En el Hospital Nacional Guillermo Almenara de EsSalud, se ha reportado una incidencia de 1,18 casos de candidemia por cada 1 000 hospitalizaciones durante el año 2012 y 2013⁷; por tal motivo es necesario plantear estudios con mayor 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, que se debe contar con estudios que involucren poblaciones con diferentes condiciones médicas y fortalecer los programas de vigilancia micótica en nuestras instituciones para permitirnos llegar a conclusiones cercanas a la realidad.

Por lo expuesto, el objetivo de la siguiente investigación fue determinar la prevalencia de genes resistente a fluconazol y voriconazol en cepas de *Candida albicans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio. Es un estudio de tipo observacional, descriptivo de corte transversal.

Población y muestra

Población: Estuvo constituida por la totalidad de cepas positivas a *Candida spp* procedentes de hemocultivos de pacientes del Complejo Hospitalario Policial Luis Nicasio Sáenz, durante el año 2018.

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

METODOLOGÍA

Aislamiento e identificación de *Candida albicans*

Las muestras de *C. albicans*, fueron aisladas a partir de frascos de hemocultivos automatizados por BacTAlert (Organon). Se inocularon más 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 hubo 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 y con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se colocó una cantidad considerable de muestra en el medio de cultivo ASD, realizándose por duplicado. Los medios de cultivo uno fue incubado a 37 °C durante 24 h y el otro, a temperatura ambiente (18°C - 25°C) durante 72 h. Posteriormente, se realizó un repique en el medio de cultivo ASD, con la finalidad de verificar la pureza de las mismas⁷.

Caracterización fenotípica de *C. albicans*

A partir del aislamiento de las especies fúngicas, se procedió a verificar las características morfológicas de las colonias: tamaño, aspecto, forma, color, elevación de la colonia, que orientaron hacia el grupo en estudio. *Candida albicans* en ASD, desarrollo colonias de crecimiento

rápido, cremosas, de color blanco o ligeramente crema, lisas, convexas, de aspecto mate u opaco⁴⁹. También se realizó la prueba de tubo germinativo y se confirmó con sistema de identificación automatizada MicroScan RAPID YEAST ID PANEL.

Prueba de Susceptibilidad para *C. albicans*

Para la determinación de la sensibilidad antifúngica, se realizó según lo recomendado por Meiss et al.⁸. 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 ese 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.

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

Se realizó según lo recomendado por Wu et al.⁹ 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 amplificó por PCR 83 pb de la región 405-488 del gen *ERG11* (Gene ID: 3641571). Cada reacción estuvo compuesta por tampón de PCR 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, Taq polimerasa Biolase (Bioline®) 5 U y cebadores 0,2 µM (Tabla 1), 10 µL de ADN de cada muestra y se completó el volumen a 50 µL con agua bidestilada.

Secuenciación del gen *ERG11*

Los productos de PCR se purificaron usando el sistema enzimático ExoProStar. Se mezclaron 40 µL de producto PCR y 16 µL de 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 la enzima. 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 (Tabla 2). Los primers utilizados para el secuenciamiento es *ERG11*-Forward: 5'-GAAAGG-GAATTCAATCG y *ERG11*-Reverse: 3'-TGTTAATC-CAACTAAGTAAC. Una vez secuenciadas las muestras, se depuraron las secuencias usando el programa Mega 6.0.

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.

RESULTADOS

Se aislaron un total de 176 cepas de *Candida spp.* a partir de los hemocultivos, en el laboratorio del Complejo

Tabla 1. Cebadores utilizado para la amplificación del gen *ERG11*

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

Fuente: Wu et al. 2018

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

Gen	Nombre	5' a 3'	Secuencia
<i>ERG11</i>	CaERG11_1	Sentido	GAAAGGGAATTCAATCG
	CaERG11_2	Antisentido	TGTTAATCCAAGTAAC
	CaERG11_3	Sentido	CTTCATATGGTCAACAACC
	CaERG11_4	Antisentido	ATGAAACAGAATTAGCTTTG
	CaERG11_5	Sentido	GTTATGAAAACCAACCAG
	CaERG11_6	Antisentido	GAGGTAAGGTAAATTAGGG
	CaERG11_7	Sentido	TCCAGTTATGCTCACTACTA
	CaERG11_8	Antisentido	TACCGAAAACGGAGTAGT

Fuente: Xu et al. 2008

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.

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 (10–12). En la **Tabla 4**, se muestran los resultados obtenidos en la siguiente prueba de sensibilidad para *C. albicans*. 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 **Figura 3** los halos de inhibición para las cepas_ Ca1 y cepa_Ca2 respectivamente.

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 amplifica el gen *ERG11* por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), detectándose mutaciones en las tres cepas dicho gen.

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

El análisis por Mega 6.0 se obtuvieron las secuencias consenso de las cepas (cepa_Ca1, cepa_Ca2 y cepa_Ca3). Después en la **Tabla 6**, se refiere a las secuencias analizadas por BLAST las secuencias consenso y comparadas con la secuencia del gen *ERG11* de *C. albicans* existente en GenBank (AY856352 de 1587 pb).

DISCUSIÓN

La fungemia, es la presencia de un hongo en la sangre por lo tanto *Candida spp.* es la más prevalente en un hemocultivo. Los tratamientos para una fungemia son por lo

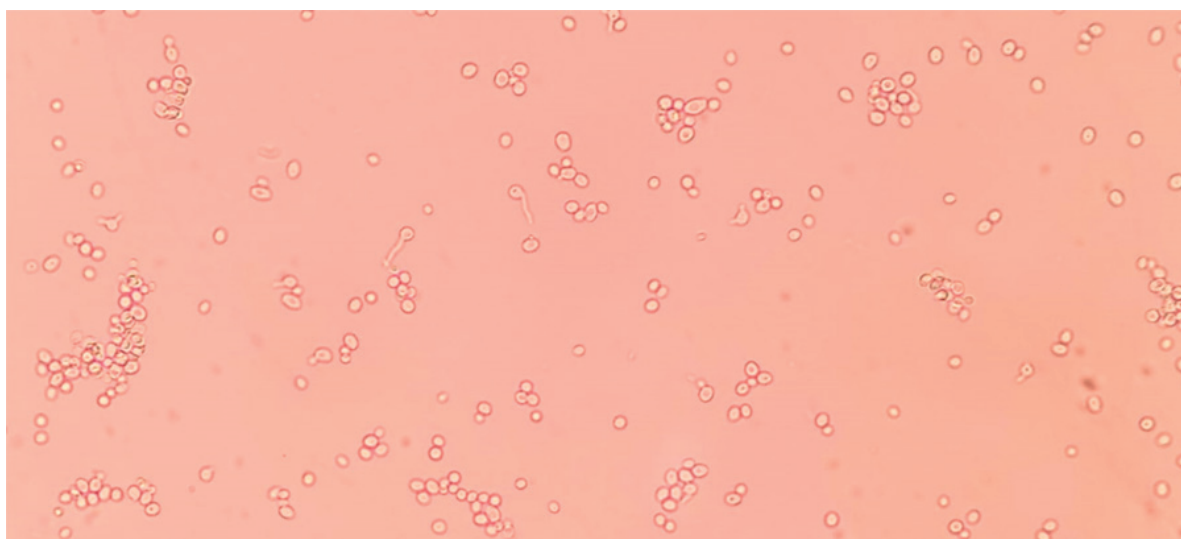


Figura 1. Característica fenotípica de *C. albicans* por la prueba de tubo germinativo
Fuente: Elaboración propia, marzo 2018

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

Antifungico	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

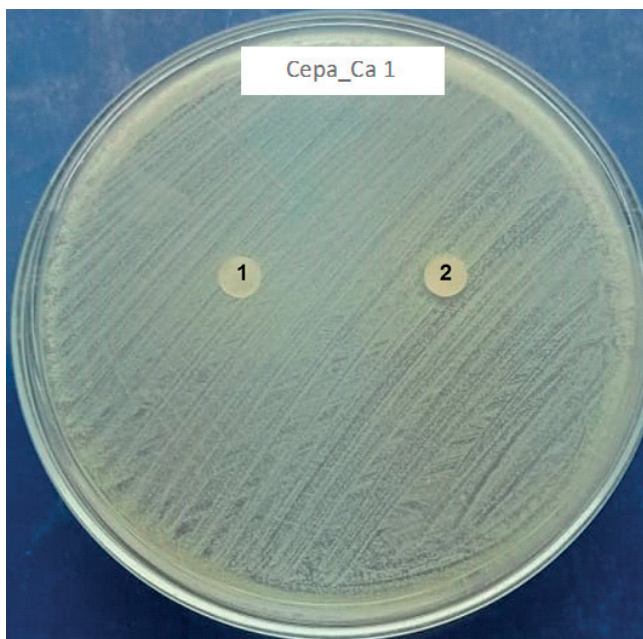


Figura 2: Difusión en disco para *C. albicans* (cepa_Ca1). 1: Fluconazol (FCA25); 2: Voriconazol (VCZ1)

Fuente: Elaboración propia, marzo 2018

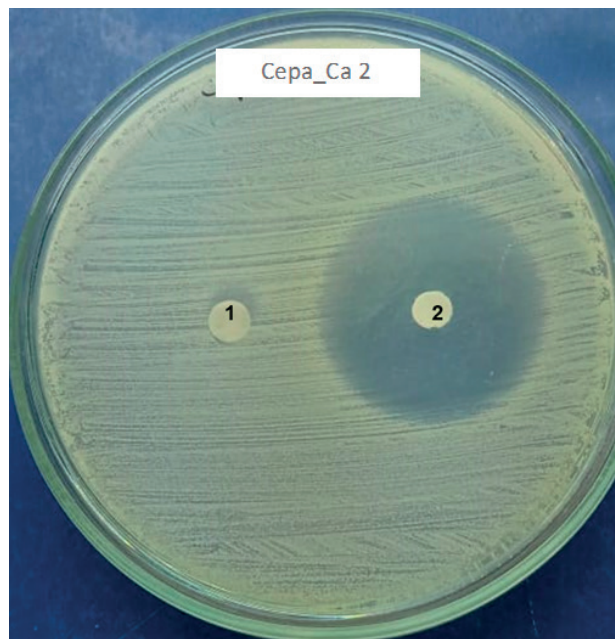


Figura 3: Difusión en disco para *C. albicans* (cepa_Ca2). 1: Fluconazol (FCA25); 2: Voriconazol (VCZ1)

Fuente: Elaboración propia, marzo 2018

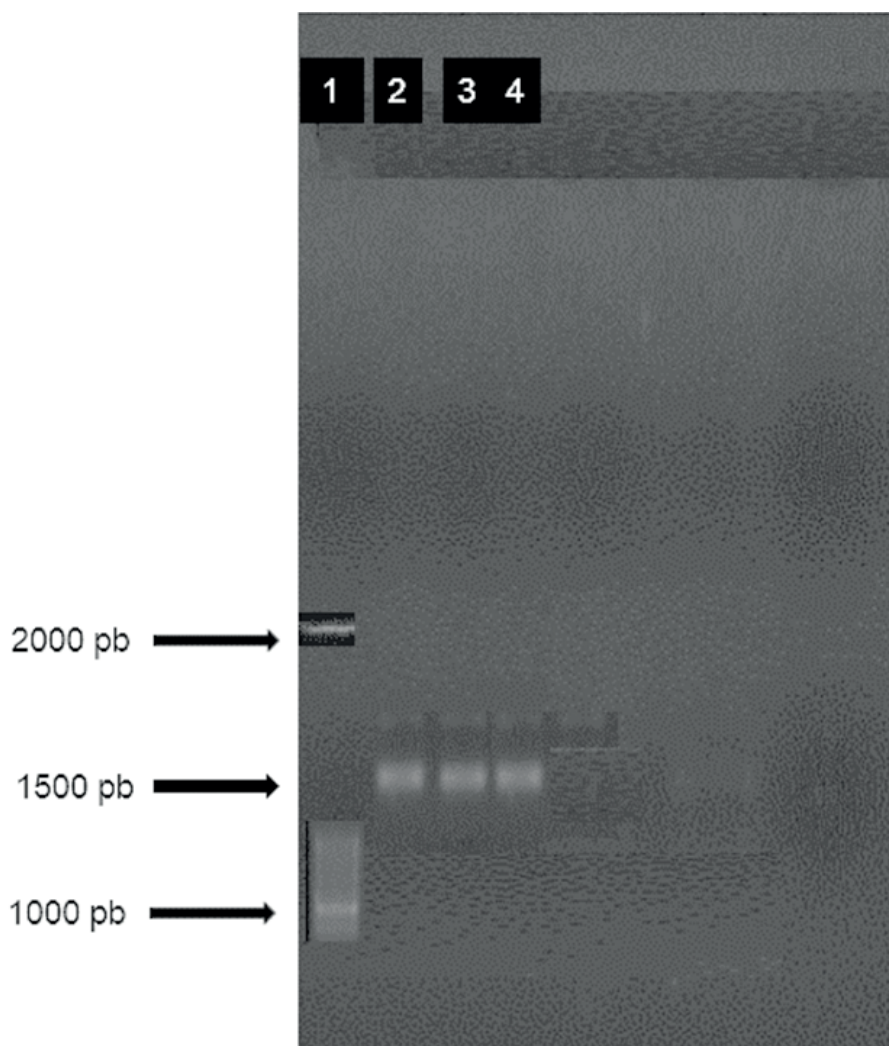


Figura 4. Reacción de la cadena de la polimerasa para la amplificación del gen *ERG11* (1587 pb). Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2, 3 y 4: marcador del gen *ERG11* en cepa_Ca1, cepa_Ca2, cepa_Ca3 respectivamente.

Fuente: Elaboración propia, marzo 2018

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, (Tiro-sina). Abreviatura de los nucleótidos: A, (Adenina); T, (Timina); G, (Guanina); C, (Citosina).

Fuente: Elaboración propia, marzo 2021

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)¹² y otro estudio realizado también en el Perú durante 2013-2015, a partir de hemocultivo se aisló el 27,8 % de *C. albicans*¹³, por lo tanto, en nuestro nosocomio la frecuencia de aislamiento por *C. albicans* con respecto a otros estudios realizados en hospitales del Perú 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 latina¹⁴ y 1 (2,2 %) en Perú¹⁵, 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 debido a una terapia antimicrobiana de amplio espectro o terapia inmunosupresora. En un estudio realizado respecto a la resistencia a voriconazol fue 1 (0,3 %) para Brasil¹⁶ y 3 (5,0 %) en Perú¹⁷. 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*¹⁸. 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^{19,20}. 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 mutación²¹. 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*^{22,23}. 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, no se podría aseverar si contribuye en 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 voriconazol²⁴, 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*^{25,26}.

CONCLUSIÓN

Las cepas de *C. albicans* aisladas con resistencia a los azoles (cepa_Ca1 y cepa_Ca3) fueron resistente a fluconazol y voriconazol. Además, la cepa_Ca2 solo fue resistente a fluconazol, pero no a voriconazol y mediante el secuenciamiento del gen *ERG 11* en las tres cepas, se encontraron distintas mutaciones, siendo de sustitución del aminoácido tirosina por la histidina (Y257H), la relacionada con la baja afinidad de los azoles.

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*. 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*. 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*. 2013;9(9):e1003550.
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.
6. Morschhäuser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* FG B. 2010;47(2):94-106.
7. 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.
8. 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.
9. 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). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy057>
10. Wayne PA. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. *CLSI M44-A*. 2004;23(6).
11. 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.
12. 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.
13. 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*. Julio de 2008;25(3):140-7.
14. 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.
15. 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 multi-center active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2011;43(3):176-85.
16. 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, Perú. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 6):855-60.
17. 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 centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816-23.
18. 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):386-93.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Manastrir 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.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Autofinanciado.