



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

“Frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* de *Candida* spp. resistentes a los antifúngicos imidazoles y triazoles, procedentes de los diferentes servicios del Hospital II EsSalud – Cajamarca, durante el año 2022”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

PRESENTADO POR:

BACH. ORTIZ QUIROZ ANDY MICHELL

ASESOR:

Dr. RIVERA JACINTO MARCO ANTONIO

CO-ASESORA

Blga. CACHO GUTIÉRREZ GABRIELA

Cajamarca – Perú

2024

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Andy Michell Ortiz Quiroz**
DNI: **75469197**
Escuela Profesional/Unidad UNC: **ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**
2. Asesor:
Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO
Facultad/Unidad UNC: **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**
3. Grado académico o título profesional al que accede:
 Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. Tipo de Investigación:
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación:
Frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* de *Candida* spp. resistentes a los antifúngicos imidazoles y triazoles, procedentes de los diferentes servicios del Hospital II EsSalud – Cajamarca, durante el año 2022
6. Fecha de evaluación del antiplagio: **14/1/2025**
7. Software antiplagio: **TURNITIN** **URKUND (OURIGINAL) (*)**
8. Porcentaje de Informe de Similitud: **19%**
9. Código Documento: **oid:3117:420860888**
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
 X APROBADO **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 15 de enero del 2025



* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright©

Andy Michell Ortiz Quiroz

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Ortiz, A. 2024. **Frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* de *Candida* spp. resistentes a los antifúngicos imidazoles y triazoles, procedentes de los diferentes servicios del Hospital II EsSalud – Cajamarca, durante el año 2022/** Andy Michell Ortiz Quiroz.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Blga. Gabriela Cacho Gutiérrez

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo UNC –
2024

“Frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* de *Candida* spp. resistentes a los antifúngicos imidazoles y triazoles, procedentes de los diferentes servicios del Hospital II EsSalud – Cajamarca, durante el año 2022”

AUTOR: Bach. Andy Michell Ortiz Quiroz

ASESOR: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

CO-ASESORA: Blga. Gabriela Cacho Gutiérrez

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

JURADO EVALUADOR



Dr. Ronald Fernando Zelada Mazmela
Presidente



M. Cs. Nestor Estuardo Carbajal Caballero
Secretario



Dr. Walter Aldo Grau Chávez
Vocal



MODALIDAD "A"
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 01:10 pm del 13 de enero del 2025, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 11-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada:

Fragsencia de mutaciones en los genes ERG3 y ERG11 de Candida spp resistentes a los antifúngicos imidazoles y triazoles procedentes de los diferentes servicios del Hospital II EsSalud-Cajamarca, durante el año 2022.

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Ortiz Ruiz Andy Michell

Siendo las 02:20 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: MUY BUENO, con el calificativo de: 18, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTO para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador Nombres y Apellidos		Firma
Presidente:	<u>Dr. Ronald Fernando Zolada Mayamele</u>	
Secretario(a):	<u>M.C. Nestor Estuardo Corbojal Caballero</u>	
Vocal:	<u>Dr. Walter Aldo Grau Chávez</u>	
Accesitaria:	<u>—</u>	
Asesor (a):	<u>Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto</u>	
Asesor (a):	<u>Blgo. Gabriela Cacho Gutiérrez</u>	

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 o menos)

A:

Mi bisabuela Santa, cuyo amor puro y sincero dejó en mi corazón una huella imborrable, siendo un faro de bondad que trasciende el tiempo y la distancia. A mi abuela Eva, ejemplo inquebrantable de fortaleza y resiliencia, cuya capacidad para superar las adversidades con valentía y determinación me ha inspirado profundamente. Y a mi madre Gladys, fuente de una sabiduría inmensa y guía indispensable, cuya enseñanza y apoyo constante han sido el cimiento de mis valores y mi crecimiento personal. A ellas les debo no solo este logro, sino también la inspiración para continuar avanzando con firmeza y gratitud

"El progreso de la ciencia y la tecnología no ha hecho sino abrir nuevos horizontes para la humanidad, tanto en términos de lo que podemos lograr como de lo que podemos aprender." – Carl Sagan

Agradecimientos

A Dios, por ser mi guía en un camino lleno de turbulencias y desafíos, brindándome sabiduría, fortaleza y paciencia para enfrentar cada obstáculo. Gracias por iluminar mi camino y darme la claridad necesaria para seguir adelante con mis objetivos, siempre con fe, determinación y la certeza de que cada paso me acerca a mi propósito.

A mis tías Ana, Diana y Mariela, quienes, con sus sabios consejos de fortaleza, superación y amor incondicional, me han guiado a lo largo del camino de la vida. Su apoyo constante y su ejemplo me han dado las fuerzas necesarias para seguir adelante con determinación.

A mis primas Mailyn y Ashly, quienes, en los momentos más difíciles, siempre han logrado ayudarme a avanzar, con su sonrisa y alegría que las caracteriza. Gracias por recordarme que la vida siempre tiene razones para sonreír, incluso en los momentos de adversidad

A mi hermano, Erixon, quien, en cada momento de debilidad, ha estado allí como soporte y apoyo, brindándome tranquilidad con la serenidad que lo caracteriza. Gracias por ser mi pilar incondicional y por enseñarme a mantener la calma en los momentos más difíciles.

A mis queridos profesores, quienes con su dedicación, paciencia y sabiduría han sido faros de guía en mi aprendizaje. Gracias por su conocimiento, por inspirarme a seguir adelante y por demostrarme que el verdadero poder de la educación va más allá de los libros.

A mi asesor, Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto, por ser un mentor académico excepcional y por creer en mí y en mis habilidades para sacar adelante este proyecto. Gracias por brindarme su confianza y apoyo incondicional, siempre impulsándome a superar mis límites y alcanzar mis metas.

A mi co-asesora, Blga. Gabriela Cacho Gutiérrez, por brindarme su conocimiento, persistencia y dedicación desde los primeros momentos de la ejecución de esta investigación. Gracias por su compromiso y orientación constante.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología del Hospital II EsSalud-Cajamarca: Dr. Victor Llontod, Dr. Victor Cieza, Blgo. Ángel Fuentes, Tec. Lab. Gaby Rojas y Tec. Lab. Angelita Limay, por su conocimiento, apoyo incondicional y colaboración durante la ejecución de esta investigación en dicho establecimiento

A mis amigos de laboratorio, quienes, a lo largo de todo el proceso de ejecución de esta investigación, me motivaron a seguir adelante con su alegría y optimismo, cualidades que los definen.

Finalmente, agradezco a todas las personas que contribuyeron con su granito de arena a lo largo de esta investigación, su apoyo y colaboración han sido esenciales para su desarrollo y éxito.

CONTENIDO

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	4
2.1 Marco teórico.....	4
2.1.1 Antecedentes de la Investigación	4
2.2 Bases Teóricas.....	10
2.2.1 <i>Candida</i> spp.....	10
2.2.1.1 Factores de patogenicidad de <i>Candida</i> spp.	11
2.2.1.2 Candidiasis.....	12
2.2.1.3 Prevalencia de <i>Candida</i> spp.....	14
2.2.1.4 Diagnóstico de <i>Candida</i> spp.....	15
2.2.2 Antifúngicos	16
2.2.2.1 Azoles.....	18
2.2.3 Ergosterol.....	19
2.2.4 Resistencia a los antifúngicos	20
2.2.5 Determinación de resistencia a los antifúngicos	21
2.2.6 Mecanismos de acción de los fármacos antifúngicos.....	22
2.2.6.1 Mecanismos de resistencia a los azoles	23
2.2.7 Mutaciones en <i>ERG3</i>	25
2.2.8 Mutaciones en <i>ERG11</i>	26

2.2.9	Relación entre las mutaciones en <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i>	26
2.2.10	Diagnóstico molecular de mecanismo de resistencia	28
2.2.11	Secuenciamiento Sanger	28
CAPÍTULO III		29
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS		29
3.1	Nivel de Investigación	29
3.2	Tipo y Diseño de investigación	29
3.3	Diseño metodológico.....	29
3.3.1	Material Biológico	29
3.3.2	Autorización y transporte de los aislamientos de <i>Candida spp.</i>	30
3.3.3	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	30
3.3.4	Reactivación y evaluación de la pureza de los aislamientos de <i>Candida spp.</i>	31
3.3.5	Identificación fenotípica de las especies de <i>Candida</i>	31
3.3.5.1	Utilizando el medio cromogénico CHROMagar <i>Candida</i>	31
3.3.5.2	Prueba del tubo germinal	32
3.3.5.3	Producción de velo o película	33
3.3.5.4	Termotolerancia	33
3.3.6	Preparación de los inóculos fúngicos	34
3.3.7	Prueba de sensibilidad a los antifúngicos para <i>Candida spp.</i>	34
3.3.8	Extracción de ADN de cepas de <i>Candida spp.</i>	35

3.3.9 Evaluación de la calidad y concentración aproximada del ADN extraído.....	36
3.3.10 Amplificación de los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i> de <i>Candida</i> spp.....	37
3.3.11 Electroforesis en gel de agarosa	38
3.3.12 Secuenciación y purificación del fragmento del gen <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i>	39
3.3.13 Selección de secuencias molde de comparación.....	39
3.3.14 Análisis bioinformático de los fragmentos de los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i>	40
3.3.15 Análisis estadísticos de datos	41
CAPÍTULO IV	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 Resultados	42
4.1.1. Identificación fenotípica de las especies de <i>Candida</i>	42
4.1.2. Características de origen de los aislamientos.....	45
4.1.2 Determinación de susceptibilidad frente a los Azoles	48
4.1.3 Perfiles de resistencia de los aislamientos de <i>Candida</i> spp.	50
4.1.3.1 Caracterización del PR1 en aislamientos de <i>C. albicans</i>	51
4.1.4. Extracción y amplificación de ADN genómico	53
4.1.5 Análisis de las mutaciones en los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i>	53
4.1.6. Frecuencia de mutaciones en los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i>	58
4.2 Discusión	60
CAPITULO V	75

5.1 Conclusiones	75
5.2 Recomendaciones	76
Referencias Bibliográficas	77
APÉNDICES	98
ANEXOS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de acción de los antifúngicos.....	17
Figura 2. Vía biosintética del ergosterol en <i>C. albicans</i> con bloqueo de las funciones de <i>ERG11</i> y <i>ERG3</i>	27
Figura 3. Distribución porcentual de aislamientos identificados como <i>Candida albicans</i> y <i>Candida no albicans</i> de este estudio.	42
Figura 4. Identificación fenotípica de especies de <i>Candida</i> mediante la prueba cromogénica en ChromAgar <i>Candida</i> Plus.....	43
Figura 5. Identificación fenotípica presuntiva de <i>Candida albicans</i> mediante la observación de tubo germinativo en preparados en fresco con suero.....	43
Figura 6. Identificación fenotípica mediante la prueba de formación de velo o película en caldo BHI.....	44
Figura 7. Identificación fenotípica mediante la prueba de termotolerancia en medio Agar Sabouraud para diferenciar <i>C. albicans</i> de <i>C. dubliniensis</i>	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de Candidiasis clínicas.	13
Tabla 2. Características de las colonias de <i>Candida</i> spp. en CHROMagar <i>Candida</i> Plus..	32
Tabla 3. Características microscópicas de <i>Candida</i> spp para la prueba de tubo germinativo	32
Tabla 4. Características de <i>Candida</i> spp. para la producción de velo o película en BHI....	33
Tabla 5. Características de las colonias de <i>Candida</i> spp. para crecimiento a 42°C.	33
Tabla 6. Concentración de antifúngicos en discos y diámetros de halos de susceptibilidad	35
Tabla 7. Primers empleados en la amplificación por PCR de los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i> ...	38
Tabla 8. Características clínicas de los aislamientos identificados como <i>C. albicans</i> y <i>C. no albicans</i> obtenidas del Hospital II EsSalud-Cajamarca.....	47
Tabla 9. Susceptibilidad frente a los azoles de los aislamientos identificados como <i>C. albicans</i> y <i>C. no albicans</i> obtenidas del Hospital II EsSalud-Cajamarca.	49
Tabla 10. Perfiles de resistencia antifúngica de los aislamientos de <i>C. albicans</i> y <i>C. no albicans</i>	51
Tabla 11. Distribución y características clínicas de los aislamientos de <i>C. albicans</i> con Perfil de Resistencia (PR1).....	52
Tabla 12. Mutaciones encontradas en los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i> de los aislamientos de <i>C. albicans</i> con perfil de resistencia (PR1) y en aislamientos sensibles (control negativo).....	55
Tabla 13. Frecuencias de mutaciones encontradas en los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i> de los aislamientos de <i>C. albicans</i> con perfil de resistencia (PR1).....	P58

LISTA DE ABREVIATURA

ADN: Ácido desoxirribonucleico.	A: Adenina
FDA: Food and Drug Administration	T: Timina
CLSI: Instituto de Normas Clínicas de Laboratorio.	G: Guanina
EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos.	C: Citosina
PS: Perfil de sensibilidad.	A: Alanina
PR: Perfil de resistencia.	N: Asparagina
FLUC: Fluconazol	E: Acido glutámico
VO: Voriconazol	F: Fenilalanina
MCL: Miconazol	G: Glicina
CLO: clotrimazol	H: Histidina
pb: Pares de bases.	I: Isoleucina
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.	K: Lisina
rpm: Revoluciones por minuto.	L: Leucina
TBE: Tampón tris-ácido bórico-EDTA.	P: Prolina
uL: Microlitros.	S: Serina
	Y: Tirosina
	W: Triptofano

GLOSARIO

Resistencia antifúngica, es el patrón de susceptibilidad o resistencia a diferentes fármacos antifúngicos que presenta un microorganismo, los cuales están establecidos por estándares (1).

La multirresistencia fúngica, es la capacidad de las especies de microorganismos para resistir a dos o más grupos o clases de antifúngicos, lo que dificulta significativamente el tratamiento de infecciones fúngicas (1).

Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, es una mezcla ampliamente utilizada en la investigación en biología molecular y bioquímica, diseñada específicamente para la separación y purificación de ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN (2).

PCR convencional, técnica de laboratorio que facilita la amplificación rápida de millones a miles de millones de copias de un segmento específico de ADN, permitiendo su estudio en mayor profundidad (3).

ERG3, es un gen que codifica para la enzima C-5 esterol desaturasa, la cual desempeña un papel fundamental en la biosíntesis del ergosterol, un componente esencial de la membrana celular en *Candida*. Se encuentra en el lumen del retículo endoplasmático. Es ortóloga de la SC5D humana (esterol-C5-desaturasa) (4, 5).

ERG11, es un gen que codifica para la enzima esterol 14- α -desmetilasa que desempeña un papel crítico en el tercer módulo de la vía de biosíntesis del ergosterol, siendo el ergosterol el principal componente esterol en las membranas fúngicas (4, 5).

Secuenciamiento, método de laboratorio que se usa para determinar la composición genética completa de un organismo o tipo de célula específicos, basados en el orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados "bases", que forman la molécula de ADN (6).

Mutación silenciosa, alteraciones en las bases del ADN que no provocan modificaciones en la secuencia de aminoácidos del producto generado por el gen afectado, pero puede influir en procesos como la estabilidad del ARNm o la eficiencia de la traducción (7–9).

Mutación con cambio de sentido, es una modificación en el ADN que provoca la codificación de diferentes aminoácidos en una posición específica de la proteína resultante. Algunas de estas mutaciones pueden afectar la función de la proteína codificada (7–9).

Mutación sin sentido, ocurre en el material genético cuando un cambio en la secuencia genera un codón de terminación en lugar de un codón que codifique un aminoácido específico. Esto da lugar a una proteína trunca, más corta de lo normal, que probablemente sea inestable o no funcional (7–9).

Frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* de *Candida* spp resistentes a los antifúngicos imidazoles y triazoles, procedentes de los diferentes servicios del Hospital

II EsSalud – Cajamarca, durante el año 2022

RESUMEN

La resistencia de *Candida* spp. a los antifúngicos es un grave problema de salud pública a nivel mundial, un fenómeno relacionado a diferentes tipos de mutaciones en genes como *ERG3* y *ERG11*. **Objetivo:** Determinar la frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* en especies de *Candida* resistentes a los azoles (triazoles e imidazoles), aisladas de pacientes atendidos en diferentes servicios del Hospital II EsSalud – Cajamarca. **Materiales y métodos:** Este estudio se llevó a cabo con 204 aislamientos de *Candida* que se identificaron mediante pruebas fenotípicas (tubo germinativo, ChromAgar *Candida* Plus), y cuyos perfiles de resistencia se evaluaron utilizando el método de difusión en disco. Las mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* se identificaron mediante secuenciación Sanger y análisis bioinformático de las secuencias utilizando herramientas como Chromas, Aliview y Translate. **Resultados:** Del total de aislamientos, el 55,4 % correspondieron a *Candida albicans*, mientras que el 44,6 % se agruparon en especies de *Candida* no *albicans*. Se determinaron seis perfiles de resistencia diferentes. El perfil con resistencia a todos los antifúngicos estudiados (PR1) se presentó en el 9,8 % de los aislamientos (20 en total). En estos aislamientos (con perfil PR1) se identificaron 11 mutaciones con cambio de sentido en el gen *ERG3* y 9 en el gen *ERG11*. En el gen *ERG3*, se detectaron mutaciones como N188K, L193P y L225P, cada una con una frecuencia del 10 %. Por su parte, en el gen *ERG11*, se identificaron las mutaciones W244G, A114S y Y257H, con frecuencias del 15 %, 95 % y 100 %, respectivamente. **Conclusiones:** Los aislamientos de *Candida* spp. presentan multiresistencia a los azoles, lo que se asocia con la aparición de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11*.

Palabras clave: *Candida* spp., multiresistencia, azoles, *ERG3*, *ERG11*, mutaciones.

Abstract

Candida spp. resistance to antifungal drugs is a serious public health problem worldwide, a phenomenon related to different types of mutations in genes such as *ERG3* and *ERG11*.

Objective: To determine the frequency of mutations in the *ERG3* and *ERG11* genes in *Candida* species resistant to azoles (triazoles and imidazoles), isolated from patients treated in different services of Hospital II EsSalud - Cajamarca. **Materials and methods:** This study was carried out with 204 *Candida* isolates that were identified by phenotypic testing (germ tube, ChromAgar *Candida* Plus), and whose resistance profiles were evaluated using the disk diffusion method. Mutations in the *ERG3* and *ERG11* genes were identified by Sanger sequencing and bioinformatics analysis of the sequences using tools such as Chromas, Aliview, and Translate. **Results:** Of the total isolates, 55.4% corresponded to *Candida albicans*, while 44.6% were grouped into non-*albicans Candida* species. Six different resistance profiles were determined. The resistance profile to all antifungals studied (PR1) was present in 9.8% of the isolates (20 in total). In these isolates with the PR1 profile, 11 missense mutations were identified in the *ERG3* gene and 9 in the *ERG11* gene. In the *ERG3* gene, mutations such as N188K, L193P and L225P were detected, each with a frequency of 10%. In the *ERG11* gene, the mutations W244G, A114S and Y257H were identified, with frequencies of 15%, 95% and 100%, respectively. **Conclusions:** It is concluded that *Candida* spp. They present multi-resistance to azoles, which is associated with the appearance of mutations in the *ERG3* and *ERG11* genes.

Keywords: *Candida* spp., multi-resistance, azoles, *ERG3*, *ERG11*, mutation

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Candida es una levadura de gran importancia en salud pública debido a su papel como agente infeccioso en implicaciones clínicas graves, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (10). Las infecciones causadas por especies de este género, denominadas “candidiasis”, se consideran oportunistas, ya que estas levaduras son microorganismos comensales del ser humano. Estas infecciones presentan tasas de mortalidad global que varían entre el 20,0 % y el 50,0 %, particularmente en pacientes críticos o con sistemas inmunológicos comprometidos (10, 11). En 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó al género *Candida* en la lista de p b, destacando a *Candida albicans* como la especie principal. Estos datos resaltan la importancia mundial de estudiar estas levaduras en el contexto de la salud pública (11).

En América Latina, las tasas de incidencia de infecciones por *Candida* spp. varían entre 0,74 y 6,0 casos por cada 1 000 ingresos hospitalarios, con una tasa de mortalidad bruta del 72,2 % (12). En Perú, la incidencia promedio mensual de estas infecciones en pacientes hospitalizados es de 0,7 casos, aunque en algunos hospitales puede alcanzar hasta 4,8 casos, con una tasa de mortalidad del 48,0 % (13). En la región de Cajamarca, un estudio sistemático y retrospectivo realizado en el Hospital Regional Docente de Cajamarca entre 2016 y 2020 reportó una prevalencia del 6,8 % de *Candida* spp., de los cuales el 43,1 % fueron aislados en pacientes de UCI (14). Todos estos datos destacan la importancia clínica de las infecciones por *Candida* y sugieren que las cepas aisladas en centros hospitalarios podrían mostrar resistencia a los tratamientos antifúngicos, lo que subraya la necesidad de desarrollar estrategias efectivas para su adecuado manejo.

Actualmente, se ha identificado que *Candida* ha desarrollado resistencia a diversos antifúngicos de uso común y de primera línea, como los azoles (fluconazol, clotrimazol, voriconazol, miconazol, ketoconazol, entre otros) (15). Esta resistencia se atribuye a múltiples factores, entre los cuales destaca el uso inadecuado de los antifúngicos, por parte del personal de salud como de los pacientes durante el tratamiento. A nivel molecular, la resistencia está vinculada al estrés generado por los antifúngicos, lo que favorece la aparición de mutaciones en los genes que codifican los sitios diana de estos medicamentos (16). Entre los genes más relevantes son los pertenecientes a la familia ERG (principalmente ERG3 y ERG11), cuyas mutaciones afectan la síntesis de ergosterol, un componente esencial de la membrana celular de las levaduras, disminuyendo así la eficacia de los antifúngicos (17).

En el Perú, los estudios sobre la resistencia a múltiples antifúngicos y las mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* presentes en cepas de *Candida* son escasos, lo que dificulta su comprensión y análisis para establecer tratamientos adecuados. Ante esta problemática, la presente investigación tuvo como objetivo principal determinar la frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* en especies de *Candida* resistentes a los azoles (triazoles e imidazoles), aisladas de pacientes atendidos en diversos servicios del Hospital II EsSalud – Cajamarca.

Para lograr este objetivo, se emplearon procedimientos convencionales y modificados para evaluar la susceptibilidad de las cepas a cuatro antifúngicos: fluconazol y voriconazol (triazoles), y miconazol y clotrimazol (imidazoles). Además, se utilizaron técnicas moleculares como PCR convencional y secuenciación, complementadas con análisis bioinformático, para identificar y caracterizar las mutaciones presentes en las cepas multirresistentes. Los resultados revelaron distintos perfiles de resistencia y la

presencia de múltiples tipos de mutaciones; con cambio de sentido, sin sentido y silenciosas, en ambos genes evaluados. En particular, los hallazgos de mutaciones previamente reportadas, así como la detección de mutaciones no descritas hasta la fecha, representa un aporte significativo al entendimiento de los mecanismos de resistencia en *C. albicans* y otras especies de este género. Estas alteraciones genéticas no solo confirman la prevalencia de cepas multirresistentes en la región, sino que también destaca la necesidad de alertar a las autoridades sanitarias para implementar estrategias de vigilancia activa y desarrollar alternativas terapéuticas más efectivas. Este estudio también establece una base sólida para futuros trabajos de investigación que contribuyan a mejorar el diagnóstico, tratamiento y control de las infecciones por *Candida* resistentes a los azoles, especialmente en contextos locales, regionales y geográficos.

CAPÍTULO II

2.1 Marco teórico

2.1.1 Antecedentes de la Investigación

En 2017, en Singapur, se realizó un estudio descriptivo con el objetivo de identificar mutaciones en el gen *ERG11* asociadas con altos niveles de resistencia a los azoles en *Candida tropicalis*. Utilizando una muestra total de 1 579 cepas de *C. tropicalis*, observaron que las tasas de resistencia a los azoles aumentaron del 2,9 % al 9,0 % ($P = 0.03$). Este incremento se relacionó con mutaciones específicas en *ERG11*, particularmente con la sustitución de aminoácidos durante el proceso de traducción (Y132F y S154F). Los autores concluyeron que los aislamientos resistentes a los azoles podrían estar asociados con una agrupación clonal de resistencia antifúngica, provocada por mutaciones específicas que afectan la síntesis del ergosterol (18).

En un estudio descriptivo transversal realizado en el oeste de la provincia de Mazandarán, Irán, durante el año 2018, se investigó las mutaciones en el gen *ERG11* en cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol. Se utilizó una muestra de 45 aislamientos, de los cuales 40 fueron resistentes y 5 fueron sensibles al fluconazol. En las cepas resistentes, se detectaron mutaciones con cambio de sentido en el gen *ERG11* mediante PCR, en un 45,0 % de los casos. Las mutaciones identificadas fueron: Y257H, E266D, V404I, D421N, V488I y D504V. Estas mutaciones están relacionadas con la sustitución de aminoácidos, lo que afecta la síntesis de ergosterol. Los resultados sugieren que las mutaciones en el gen *ERG11* podrían desempeñar un papel clave en el desarrollo de la resistencia al fluconazol en los aislados de *C. albicans* (19).

En un estudio descriptivo realizado en Tailandia en 2020, con el fin de evaluar la susceptibilidad a los azoles y caracterizar los mecanismos de resistencia en *Candida albicans*, se analizaron 85 aislamientos clínicos orales. Los resultados indicaron que el 47,0 % de los aislamientos correspondían a *Candida glabrata*, el 33,0 % a *C. tropicalis*, el 11,0 % a *Candida kefyr* y el 9,0 % a *Candida parapsilosis*. En los aislamientos de *C. glabrata* con resistencia cruzada a azoles (fluconazol, itraconazol y ketoconazol), se detectaron mutaciones con cambio de sentido en los genes *ERG3* y *ERG11* en un 2,4%. Los autores concluyeron que estas mutaciones están asociadas al mecanismo de resistencia en *C. glabrata*. Cabe destacar que la baja prevalencia de mutaciones en estos genes se debió a que muchos aislamientos no mostraron resistencia a más de tres fármacos, por lo que no se les realizó un análisis molecular exhaustivo (20).

En un estudio descriptivo transversal realizado en Burkina Faso en 2022, con el objetivo de detectar el gen *ERG11* mutado en cepas de *Candida* spp., se analizaron 262 cepas clínicas aisladas. Los resultados mostraron que el 59,9 % de los aislamientos correspondían a *C. albicans*, seguido de *C. glabrata* (27,9 %), *Candida famata* (7,3 %), *C. tropicalis* (3,1 %) y otras especies (1,9 %). Se observó una tasa de resistencia al fluconazol del 59,5%, y se detectó el gen *ERG11* mutado en un 9,8 % de las cepas. Los autores concluyeron que la presencia del gen *ERG11* mutado en *Candida* spp. puede contribuir a la resistencia a los azoles en estas especies (21).

En un estudio descriptivo experimental realizado en India en 2022, con el objetivo de identificar los mecanismos moleculares de la resistencia a los azoles en *Candida* spp., se analizaron 32 aislados clínicos resistentes a azoles y 10 sensibles. Se encontró que el 37,5

% de los aislados resistentes presentaron mutaciones en el gen *ERG11* (A395T y C461T). Además, en estos aislados se detectaron mutaciones en el gen *ERG11* (A220C) y en *UPC2* (T503C, G751A). También se observó una sobreexpresión media de varios genes, incluidos *CDR1*, *CDR3*, *TAC1*, *ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG11*, *UPC2* y *MKC1*. Los investigadores concluyeron que las mutaciones no sinónimas en el gen *ERG11* y la sobreexpresión coordinada de genes relacionados con la biosíntesis de ergosterol, factores de transcripción y genes de respuesta al estrés, están asociadas con la resistencia a los azoles en *Candida* spp. Aunque no se detectaron mutaciones en el gen *ERG3*, se observó su sobreexpresión, lo que también contribuye a la adquisición de resistencia a los azoles (22).

En un estudio realizado en China en 2022, se analizó sistemáticamente los perfiles de susceptibilidad de *Candida* publicados entre diciembre de 2011 y diciembre de 2021 en China continental. Utilizando un diseño retrospectivo, observacional y descriptivo, se revisaron 89 estudios disponibles en bases de datos, con un total de 44,716 aislamientos de *Candida* spp. Los resultados mostraron una incidencia de *C. albicans* (49,4 %), *C. tropicalis* (21,9 %), *C. parapsilosis* (13,9 %) y *C. glabrata* (11,4 %). En cuanto a la susceptibilidad al fluconazol, *C. parapsilosis* mostró una tasa de 93,3 %, *C. albicans* 91,6 %, *C. glabrata* 79,4 % y *C. tropicalis* 77,9 %. La resistencia al fluconazol estuvo principalmente asociada con mutaciones en los genes *ERG11*, *ERG3*, *ERG4*, *MRR1-2*, *MSH-2* y *PDR-1*. Los autores concluyeron que las mutaciones en los genes responsables de la biosíntesis de ergosterol (*ERG11*, *ERG3*, *ERG4*) son las más comunes en la adquisición de resistencia al fluconazol, especialmente en *C. albicans* y *C. glabrata* (23).

En 2021, en un estudio descriptivo realizado en Brasil con el objetivo de identificar el nicho ambiental de los aislamientos de *Candida* resistentes a los azoles responsables de brotes persistentes en el departamento de UCI. Se analizaron 112 aislamientos y se encontró que el 67,9% eran multirresistentes a los azoles, de los cuales el 92,1% presentaban mutaciones en el gen *ERG11* (Y132F + R398I). Los investigadores concluyeron que se dio una propagación de *Candida* resistente a los azoles, con dicha sustitución de aminoácido en el departamento de UCI, la cual podría brindar el patrón de resistencia a los azoles (24).

En 2019, en Estados Unidos, se realizó un estudio con el objetivo de detectar mutaciones en genes de resistencia de cepas resistentes a antifúngicos (azoles y equinocandinas) mediante tecnología de secuenciación de última generación. Identificaron 54 mutaciones con cambio de sentido diferentes, de las cuales 13 no habían sido previamente reportadas. En el gen *ERG3*, se encontraron dos codones de parada prematuros homocigotos en dos cepas de *C. albicans* altamente resistentes a los azoles y moderadamente resistentes a las equinocandinas. En cuanto al gen *ERG11*, se identificaron siete mutaciones puntuales en *C. albicans* resistente a los azoles. Sin embargo, no se detectaron mutaciones en *ERG11* en *C. glabrata* resistente a los azoles. Los investigadores concluyeron que las mutaciones encontradas están asociadas con la capacidad de las cepas para resistir los antifúngicos utilizados (25).

En 2018, se realizó un estudio descriptivo transversal en el Hospital Regional de Ayacucho, Perú, con el objetivo de determinar las especies de *Candida* y su perfil de resistencia a fluconazol y voriconazol. Se analizaron 110 cepas de *Candida* spp. y se

encontró que el 86,4% correspondían a *C. albicans*, seguida de *C. glabrata* (9,1%), *C. parapsilosis* (2,7%), *C. tropicalis* y *C. krusei* con un 0,9% cada una. El 10,5% de *C. albicans* mostró resistencia al fluconazol y al voriconazol. Además, el 20,0 % de *C. glabrata* presentó una sensibilidad dosis-dependiente, mientras que el 10,0 % mostró resistencia al fluconazol. Los autores concluyeron que, aunque *C. albicans* es la especie más prevalente, existe una variedad significativa de especies de *Candida*, muchas de las cuales presentan grados considerables de resistencia a los azoles. (26).

En 2020, se llevó a cabo un estudio transversal en un hospital de tercer nivel del norte de Perú para determinar la frecuencia y susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp. Se analizaron 232 aislamientos, encontrando una frecuencia de *C. albicans* del 11,2 % y de otras especies del 19,8 %. En cuanto a la susceptibilidad antifúngica, se detectó una resistencia al fluconazol del 19,6 % y al voriconazol del 21,7 %. Los investigadores concluyeron que la frecuencia de *Candida* spp. muestran una alta resistencia a los azoles, lo que podría incrementar los riesgos de morbilidad y mortalidad. (27). Sin embargo, el estudio no aborda los mecanismos moleculares que explican dicha resistencia, como mutaciones o sobreexpresión de genes.

En 2022, en Lima, Perú, se realizó un estudio para determinar la prevalencia de genes asociados con la resistencia al fluconazol y voriconazol en cepas de *C. albicans*. Este estudio observacional, descriptivo y transversal incluyó 176 cepas de *Candida* spp. aisladas de hemocultivos. Los resultados indicaron que el 77,8% de las cepas correspondían a *C. albicans*, de las cuales el 7,7% eran resistentes al fluconazol y el 5,1% al voriconazol. En todas las cepas resistentes a los azoles, se detectaron mutaciones en el

gen *ERG11*, destacándose la sustitución del aminoácido tirosina por histidina en la posición 257 de la proteína (Y257H). El estudio concluyó que esta mutación en *ERG11* está directamente relacionada con la resistencia al fluconazol y voriconazol, debido a un cambio en la afinidad de la proteína hacia estos antifúngicos (28).

En 2022, se realizó un estudio en Cajamarca, Perú, para investigar la frecuencia de mutaciones en el gen *ERG11* en aislamientos clínicos de *C. albicans* resistentes a fluconazol. Los aislamientos fueron recolectados durante ocho meses de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud de Cajamarca. Se determinó que el 19,0 % de los aislamientos de *C. albicans* eran resistentes al fluconazol, siendo las secreciones vaginales la principal fuente de aislamientos resistentes (59,0 %), seguidas por aspirados bronquiales (33,0 %) y esputos (8,0 %). El análisis molecular de 12 aislamientos resistentes identificó 73 mutaciones en el gen *ERG11*. De estas, solo el 25,0 % correspondieron a mutaciones previamente reportadas, destacándose la mutación A114S y Y257H, que se encontró en una gran proporción de los aislamientos resistentes. El estudio concluyó que las mutaciones en *ERG11*, incluida A114S y Y257H, desempeñan un papel crucial en la resistencia de *C. albicans* al fluconazol. (29).

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 *Candida* spp.

El género *Candida* se encuentra clasificado taxonómicamente dentro del reino Fungi, orden *Sacharomycetales* y familia *Saccharomycetaceae*. Se trata de una levadura redonda u ovalada de 4-6 μm de tamaño. Muchas de las especies pertenecientes a este género presentan la capacidad de crecer de diferentes formas dependiendo de las condiciones ambientales. Así, en determinadas circunstancias las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia tanto de pseudohifas como de hifas verdaderas (30). Este género de levadura incluye patógenos oportunistas comunes en el ser humano, con características saprotróficas y cosmopolitas, algunos factores ambientales pueden influir de manera importante en su desarrollo patogénico, tal es el caso del pH que cuando es superior a 7 permite el cambio de la forma levaduriforme a hifa, estructura responsable de la invasión de tejidos y por tanto de la patogenicidad de la levadura (31, 32).

Incluye dentro de su género alrededor de 200 especies y de estas, aproximadamente 20 están implicadas en el desarrollo de infecciones en el humano, algunas con más frecuencia que otras, debido a que únicamente alrededor del 30,0 % de las especies de *Candida* son capaces de crecer a 37°C, condición necesaria para poder desarrollarse en los tejidos humanos. Dentro de las especies infectivas tenemos a *C. albicans*, la que se aísla de forma predominante en las muestras clínicas, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Otras especies que también se han aislado en los pacientes como agentes infecciosos son: *C. auris*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* y *C. norvegensis* (30, 33).

2.2.1.1 Factores de patogenicidad de *Candida* spp.

Las especies de *Candida* presenta características que les permiten diseminarse, invadir, infectar y resistir a diferentes factores extrínsecos e intrínsecos. Entre los factores de patogenicidad que destacan; están las adhesinas, las cuales facilitan a las especies de *Candida* su unión con las células presentes en el hospedador infectado (epiteliales, endoteliales y fagocíticas), además les permiten adherirse a diversas superficies (material quirúrgico e implantes médicos) que en ocasiones favorecen la formación de biopelículas. El segundo factor es la presencia de distintos tipos de enzimas, *Candida*, expresa tres clases diferentes de hidrolasas secretadas: proteasas, fosfolipasas y lipasas; las cuales pueden favorecer la invasión en el hospedador generando daño en los tejidos. El tercer factor es la denominada morfogénesis, capacidad de algunas de las especies de estas levaduras de presentar polimorfismo con alternancia de morfologías (depende de las condiciones ambientales), cada morfología tiene una relevancia en la infección. Luego tenemos el switching fenotípico o cambio en la morfología de la colonia (desencadenado por numerosos factores ambientales), lo cual ayuda a la supervivencia en diferentes ambientes y a la evasión de la respuesta inmune del hospedador. Y por último tenemos la formación de biopelículas, la cual proporciona resistencia a los fármacos antifúngicos y al sistema inmunitario del hospedador. La capacidad de resistencia de las especies de *Candida* suma los diferentes mecanismos de patogenicidad en el que intervienen diferentes factores como la adhesión, el crecimiento y las variaciones morfológicas (33–35).

2.2.1.2 Candidiasis

Es la infección causada por *Candida* spp., la cual coloniza la piel, las uñas, las mucosas bucofaríngeas, gastrointestinales y vaginales, generando diferentes tipos de candidiasis (Tabla 1), dependiendo del lugar donde colonice el patógeno, pueden ser superficiales e invasoras (36). Cuando el sistema inmunológico humano se encuentra comprometido, *Candida* puede transformarse rápidamente de un hongo comensal no patógeno a un agente patógeno, provocando infecciones que van desde una candidiasis superficial hasta formas más graves, como candidiasis invasiva y candidemia. A nivel global, la candidiasis invasiva afecta anualmente a más de 1 565 000 personas y se asocia con una alta tasa de mortalidad, causando aproximadamente 1 000 000 de muertes al año (37).

Según los factores predisponentes del paciente, como condiciones fisiológicas, alteraciones endocrinas, enfermedades asociadas y trastornos inmunológicos, el cuadro clínico de las infecciones por *Candida* puede agravarse significativamente (36, 37). Estos factores no solo predisponen a inflamaciones locales, sino que también pueden llevar a formas diseminadas de la enfermedad, capaces de evolucionar hacia sepsis y, en casos graves, la muerte. Dependiendo de la evolución, estas infecciones pueden presentarse en cuadros clínicos agudo, subagudo o crónico. La tasa de mortalidad asociada es elevada, variando entre el 30 % y el 50 %, dependiendo del tipo de infección, la especie de *Candida* involucrada y el perfil del paciente, especialmente en aquellos inmunocomprometidos, como los que padecen cáncer, VIH/SIDA o se encuentran en cuidados intensivos. La mortalidad tiende a ser mayor en infecciones invasivas, como candidemia o candidiasis diseminada, debido a la dificultad en el diagnóstico temprano y la resistencia antifúngica en algunas cepas (36–38). Estos datos resaltan la importancia de una detección precoz y un manejo clínico adecuado para reducir la morbimortalidad asociada, especialmente en pacientes de alto riesgo.

Tabla 1. Tipos de Candidiasis clínicas.

Candidiasis	Presentación clínica	Factores de riesgo
Superficiales (cutánea y mucosas)	Orofaringitis	Radioterapia para el cáncer de cabeza y cuello, uso de corticoides, edades extremas, prótesis dental.
	Esofagitis	Cáncer.
	Vulvovaginitis	Uso de antibióticos, infección por el VIH, diabetes mellitus, uso sistémico de corticoides, anticonceptivos orales, embarazo.
	Cutánea	Humedad y maceración cutánea, enfermedades vasculares.
	Cutánea congénita	Prematuridad, progenitora con dispositivo intrauterino.
	Mucocutánea crónica	Deficiencia en linfocitos T, enfermedades endocrinológicas.
Invasoras	Candidemia	Uso prolongado de antibióticos y estancias largas en hospital, alteración de la integridad intestinal, nutrición parenteral total, edades extremas, desnutrición, terapia inmunosupresora, neutropenia, trasplante de células madre u órganos sólidos, infección por el VIH con recuentos bajos de CD4, insuficiencia renal/hemodiálisis, diabetes mellitus, quemaduras graves.
	Urinaria	Diabetes mellitus, sonda urinaria, obstrucción urinaria, cirugía urológica.
	Neumonía	Aspiración.
	Endocarditis	Cirugías mayores, antecedentes de endocarditis bacteriana y enfermedad valvular, presencia de catéter venoso central o válvula protésica durante periodos largos, abuso de fármacos intravenosos.
	Pericarditis	Cirugía torácica, presencia de catéteres intravasculares.
	Sistema nervioso central	Cirugía en el sistema nervioso central, derivación ventriculoperitoneal.

	Ocular	Cirugía ocular o trauma.
	Huesos y articulaciones	Cirugía, trauma o inyecciones intraarticulares, infección en el pie diabético.
	Abdominal	Trasplante de órgano sólido, perforaciones recurrentes, cirugía abdominal repetida, fugas anastomóticas, pancreatitis, diálisis peritoneal continua ambulatoria.

Fuente: Arya et al. (36)

Dentro de los tipos de candidiasis, la vulvovaginal es la más frecuente a nivel global, siendo la infección más común del tracto reproductivo femenino, se estima que afecta aproximadamente al 75,0 % de todas las mujeres al menos una vez en la vida; aunque a principio era tratada con antifúngicos de primera línea y mostraba un tratamiento positivo, actualmente ya no presenta dicha capacidad, lo cual la convierte en una infección de interés clínico (38).

2.2.1.3 Prevalencia de *Candida* spp.

En los EE. UU., un promedio del 37,0 % de los recién nacidos pueden verse afectados por candidiasis bucal durante los primeros meses de vida. En pacientes inmunodeprimidos se presentan con mayor frecuencia, por ejemplo, más del 60,0 % de los pacientes con VIH presentan candidiasis, en pacientes diabéticos la prevalencia es de 13,7 % a 64,0 % (34). En las diferentes bases de datos se encontraron los siguientes valores referente al continente asiático, como en Nueva Delhi se ha reportado prevalencias entre 6,0 y 18,0 % para infecciones por *Candida* spp, en el norte de India una prevalencia del 8,1 % para aislamientos *de Candida* spp, y al Sur de India se reveló una prevalencia de 5,7 %. En América Latina la prevalencia fue de 1,18/1000 admisiones hospitalarias (15, 39). La candidiasis es considerada una de las principales enfermedades

fúngicas desatendidas por el sector salud a nivel global, trayendo consigo consecuencias en sus tasas de morbilidad y mortalidad (39).

Se ha reportado diferentes estudios sobre las especies de *Candida* y su predominancia a nivel global. *C. albicans* es el patógeno predominante en el norte y centro de Europa, en Estados Unidos y en gran parte de América Latina. Asimismo, las especies *Candida* no *albicans* predominan en Asia, el sur de Europa y el sur de América. En el norte y centro de Europa, en los Estados Unidos y en Asia (varía según la configuración, el diseño del estudio y la región geográfica), *C. glabrata* es la de mayor proporción. En el sur de Europa, sur de América y Asia, predomina *C. parapsilosis* y en Asia Oriental y Argentina (varía según el diseño del estudio y la región geográfica), tiene una predominancia de *C. tropicalis*. La especie de *C. krusei* se encontró en menor proporción en todas las regiones geográficas (40). Por otra parte, *C. auris* ha tomado relevancia en los últimos años en todo el mundo debido a un brote emergente, lo cual ha puesto en alerta epidemiológica a todo el sector salud global; su predominancia ya ha llegado hasta países latinoamericanos como, Venezuela, Colombia, Perú, entre otros. La frecuencia de las especies de *Candida* causantes de infecciones presenta importantes variaciones según la localización geográfica y el perfil del paciente (41).

2.2.1.4 Diagnóstico de *Candida* spp.

Existen diversos métodos para el diagnóstico de *Candida* spp., los cuales incluyen enfoques microbiológicos, moleculares, inmunológicos y automatizados. Los métodos microbiológicos abarcan principalmente exámenes directos, como el uso de hidróxido de potasio (KOH), técnicas de diferenciación como el tubo germinativo, formación de biopelículas en BHI y pruebas de termotolerancia, entre otros. Además, se emplean

cultivos en medios como Agar Sabouraud Dextrosa con cloranfenicol o ChromAgar *Candida* (42).

Por otro lado, las técnicas moleculares e inmunológicas, como PCR, MALDI-TOF, PNA-FISH y ELISA, también son ampliamente utilizadas (43, 44). Sin embargo, en la actualidad, se han desarrollado sistemas automatizados que ofrecen mayor sensibilidad, precisión y rapidez en la identificación de estas levaduras. Entre ellos se encuentran MicroScan WalkAway96, MicroScan autoSCAN4, Vitek Compact™, Phoenix™, Fungichrom™, y Auxacolor™. Estos sistemas, mediante paneles especializados, permiten detectar no solo la especie de *Candida*, sino también, en algunos casos, determinar la resistencia a distintos antifúngicos (fungigrama) (45, 46).

El gold standard para identificar *Candida* spp. es el cultivo en medios específicos, como el ChromAgar *Candida* o ChromAgar *Candida* plus, seguido de la identificación fenotípica y molecular. Estos métodos permiten diferenciar especies de *Candida* basándose en características morfológicas, bioquímicas y genéticas (44).

2.2.2 Antifúngicos

Son compuestos, naturales o sintéticos, que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad, evitando el desarrollo de infecciones. Estos fármacos son bastante limitados, solo existen cuatro familias de fármacos antifúngicos utilizados en el tratamiento de las infecciones: polienos, azoles, equinocandinas y los análogos de la pirimidina (47). Los principales fármacos antifúngicos frente a distintas infecciones fúngicas son: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, anfotericina B, caspofungina, micafungina, entre otras variedades de fármacos. Muchos de ellos utilizados en primera línea frente a

las infecciones por levaduras, como los azoles. Actualmente, se viene desarrollando nuevos fármacos con mayor capacidad frente a las infecciones fúngicas, tales como Rezafungina, Ibrexafungerp, Fosmanogepix, Olorofima, entre otros (46, 47).

En la mayoría de los casos, los fármacos antimicóticos actúan sobre la membrana citoplasmática de los hongos, interfiriendo específicamente en la síntesis de ergosterol, un componente esencial de dicha membrana, lo que constituye el principal mecanismo de acción de diversas familias de antifúngicos. Por ejemplo: los azoles se unen a la enzima Erg11, inhibiendo la síntesis de ergosterol; los polienos se unen al ergosterol e inducen la formación de poros en la membrana celular, provocando la fuga intracelular de iones; las equinocandinas inhiben la enzima beta-glucano sintasa, lo que altera la arquitectura de la pared celular; y los análogos de la pirimidina se incorporan a los ácidos nucleicos, interrumpiendo la biosíntesis de ADN y ARN (48, 49). Los sitios de acción de los antifúngicos se pueden evidenciar en la Figura 1.

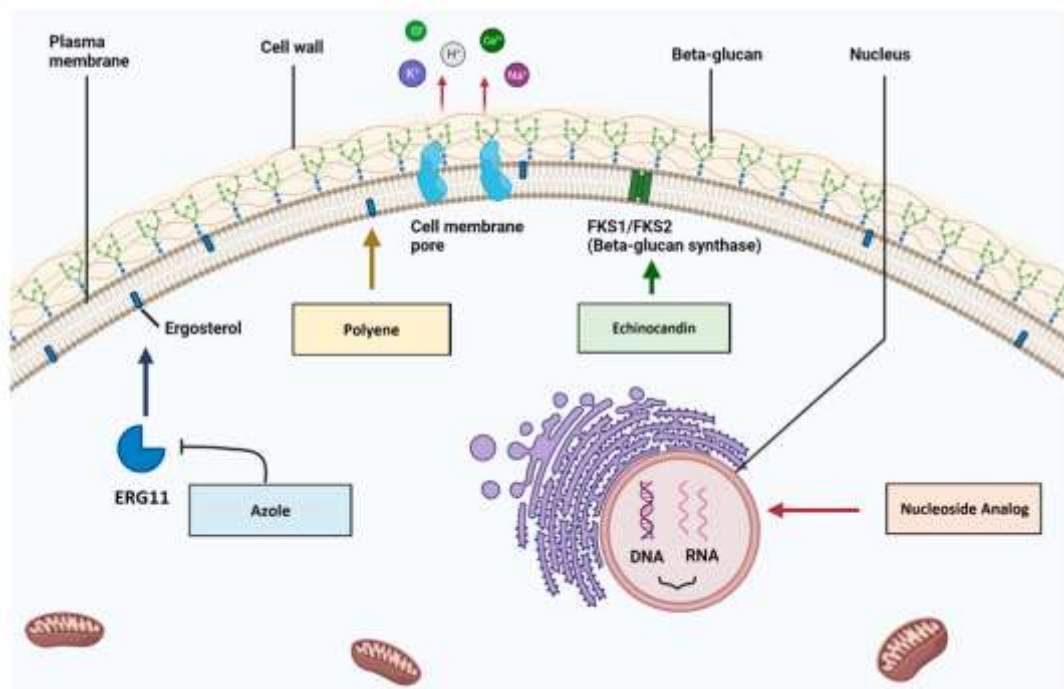


Figura 1. Sitio de acción de los antifúngicos

Fuente: Czajka et al. (49)

2.2.2.1 Azoles

Son fármacos fungistáticos sintéticos, heterocíclicos de cinco átomos, que se caracterizan por tener un anillo imidazólico libre, unido mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. En relación al número de nitrógenos que contienen en el anillo imidazólico se dividen en imidazoles (2 nitrógenos) y triazoles (3 nitrógenos) (46).

Los azoles ejercen su acción antifúngica sobre la membrana celular al inhibir enzimas relacionadas con el citocromo P450, específicamente la 14- α -desmetilasa, que es clave en la biosíntesis del ergosterol, el principal componente de la membrana celular fúngica. La unión de uno de los nitrógenos libres del anillo imidazólico del antifúngico con un átomo de hierro en el sitio activo de la enzima bloquea la activación del oxígeno, un paso crucial para la desmetilación del lanosterol, un intermediario esencial en la síntesis del ergosterol (50).

La inactivación de la 14- α -desmetilasa provoca la acumulación de 14- α -metil-esteroles, lo que altera la membrana celular al interferir con las funciones normales del ergosterol. Además, los imidazoles afectan la síntesis y desintoxicación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que conduce a su acumulación, causando estrés oxidativo y daño en los organelos celulares. Por su parte, los triazoles también inhiben la 14- α -esterol-demetilasa dependiente del citocromo P450, lo que interfiere en la conversión de precursores del ergosterol y genera la acumulación de moléculas como el lanosterol, 4,14-dimetilzimosterol y 24-metilen-dihidro-lanosterol. Este proceso resulta en la formación de una membrana plasmática fúngica con alteraciones estructurales y funcionales. Adicionalmente, los azoles también afectan la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos, contribuyendo a un desbalance en los procesos metabólicos de las células fúngicas (51, 52).

Entre los compuestos azólicos más utilizados en la actualidad destacan: los imidazoles (ketoconazol, miconazol y clotrimazol) y los triazoles (fluconazol, voriconazol e itraconazol). Estos compuestos son utilizados como fármacos de primera y segunda línea en los tratamientos de infecciones fúngicas (46, 53).

2.2.3 Ergosterol

El ergosterol, un esteroles exclusivo de los hongos, desempeña un papel esencial en su crecimiento, proliferación, adaptación al estrés y desintoxicación celular. Por ello, el estudio de su biosíntesis es crucial para comprender la biología de estos organismos. Además, el ergosterol se utiliza como precursor en la síntesis de fármacos esteroides (54). Su producción se basa principalmente en la fermentación de levaduras, y se han implementado diversas estrategias moleculares para aumentar su rendimiento, como la optimización de las condiciones de fermentación, la manipulación genética de la ruta biosintética y la identificación de mutantes con una mayor producción de ergosterol (55).

Durante el proceso de biosíntesis del ergosterol, los genes *ERG3* y *ERG11* juegan roles clave. *ERG11* codifica la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa, responsable de la desmetilación del lanosterol, un paso esencial en la vía de síntesis del ergosterol. Por su parte, *ERG3* codifica la C5-esteroles desaturasa, que interviene en la conversión de intermediarios hacia el ergosterol, como el episterol. Las mutaciones en estos genes están directamente relacionadas con la resistencia a los antifúngicos de la familia de los azoles. En *ERG11*, las mutaciones pueden alterar la afinidad de la enzima hacia los azoles, reduciendo la efectividad del tratamiento antifúngico. En el caso de *ERG3*, las mutaciones pueden inactivar su función, llevando a la acumulación de intermediarios como el 14- α -

metilfecosterol, que no es tóxico para las células fúngicas, lo que contribuye a la resistencia (56).

Además del ergosterol, intermediarios de su ruta biosintética como el zimosterol y el lanosterol tienen aplicaciones industriales, ya que son utilizados como emulsionantes y precursores de sustancias reductoras del colesterol (57). Su producción también se ha optimizado mediante técnicas de manipulación genética (58). Las modificaciones metabólicas de esta vía han permitido la síntesis de compuestos como terpenoides y esteroides, a través de mutagénesis dirigida en genes relacionados con la ruta, como *UPC2P* (G888A), *ERG20P* (K197G) y *HMG2P* (K6R) (57).

Dado que el ergosterol es exclusivo de los hongos, cada paso enzimático de su vía biosintética representa un objetivo potencial para el desarrollo de nuevos antifúngicos. Los genes *ERG3* y *ERG11*, al estar directamente involucrados en la síntesis del ergosterol y a la resistencia a los azoles, son puntos estratégicos para el diseño de terapias dirigidas que mejoren la eficacia de los tratamientos antifúngicos actuales (56, 59).

2.2.4 Resistencia a los antifúngicos

Es la capacidad de un microorganismo fúngico patógeno, frente a una concentración de agente antimicrobiano (fármaco), ocasionando que el antimicrobiano no cumpla con su accionar en la especie fúngica. La resistencia a los antifúngicos puede ser intrínseca (primaria) o adquirida (secundaria). Durante los últimos años muchas especies de hongos han ido adquiriendo capacidades de resistencia a los principales medicamentos de primera línea, lo que ha puesto en alerta al sector salud, permitiendo desarrollar nuevos tratamientos para contrarrestar capacidad de resistencia (48).

Este fenómeno resulta de adaptaciones genéticas y fenotípicas que permiten a los hongos evadir los efectos de los antifúngicos. Los perfiles de resistencia pueden establecerse frente a diferentes grupos de antifúngicos, como azoles, polienos, equinocandinas y derivados de la pirimidina, o subgrupos específicos como imidazoles y triazoles (60–62). Actualmente, se ha identificado la capacidad de las especies de *Candida* para desarrollar resistencia secundaria a distintos tipos de azoles, lo que les confiere un perfil de multiresistencia, representando un desafío significativo en el tratamiento antifúngico (62).

2.2.5 Determinación de resistencia a los antifúngicos

El CLSI ha estandarizado dos métodos principales para determinar la sensibilidad de los antifúngicos. El primero es el método de microdilución en caldo, aplicable tanto a levaduras (documentos M27-A4, M60, M57 y M59) como a hongos filamentosos y dermatofitos (documentos M38-A3, M61, M57 y M59). El segundo es el método de difusión en agar, diseñado para levaduras (documentos M44-A2 y M60) y para hongos filamentosos no dermatofitos (documentos M51-A y M61) (63–65).

Por su parte, el EUCAST también ha desarrollado métodos estandarizados de microdilución, aplicables a levaduras (documento E.DEF 7.3.1) y hongos filamentosos (documento E.DEF 9.3). Aunque los métodos propuestos por el CLSI y el EUCAST comparten muchas similitudes, existen diferencias metodológicas en aspectos como la concentración de glucosa en el medio de cultivo, la forma del fondo de la microplaca, la cantidad de inóculo (que es mayor en el método EUCAST), el tipo de lectura y el tiempo de incubación. A pesar de estas diferencias, los resultados obtenidos mediante ambos métodos suelen ser comparables (64, 66, 67).

Ambos métodos permiten comparar y determinar cepas susceptibles (que no han adquirido resistencia) y cepas resistentes (que exhiben mecanismos de resistencia intrínseca o adquirida) (63). Asimismo, existen otros métodos comerciales aprobados por la FDA que permiten una lectura más fácil, así como la automatización de los mismos, entre los que destacan Sensititre YeastOne colorimetric plate ® (TREK Diagnostic Systems), Vitek 2 yeast susceptibility test ® (Biomérieux), ATB Fungus ® (Biomérieux) como métodos de microdilución, o Etest ® y Neo-Sensitabs ® (Rosco Diagnostica) (68, 69).

2.2.6 Mecanismos de acción de los fármacos antifúngicos

Los fármacos antifúngicos tienen la capacidad de interactuar con el blanco del patógeno (membrana, proteínas de transporte, enzimas, entre otros), la asociación con el blanco depende de la familia a la cual pertenezca dicho fármaco antifúngico (polienos, azoles, equinocandinas y derivados de la pirimidina) (70). Por ejemplo, los polienos se unen al ergosterol, componente esencial de la membrana celular fúngica, y forma poros, asimismo, aumentan el nivel de estrés oxidativo dentro de la célula, dañando las mitocondrias; los azoles actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol, específicamente la enzima Erg11, de tal modo que se acumulan metabolitos tóxicos y se altera la estructura de la membrana, que se vuelve más permeable y vulnerable; las equinocandinas inhiben de manera no competitiva el enzima β -1,3-glucano sintetasa, lo que supone pérdida de integridad en la pared celular del hongo y los derivados de la pirimidina genera alteraciones enzimáticas para finalmente entrar en el núcleo celular e interrumpir la síntesis de ADN (52, 70, 71).

Los mecanismos de acción de los fármacos se pueden clasificar de acuerdo a su modo de acción o su sitio de unión dentro del patógeno: unión al ergosterol y ruptura de las membranas celulares fúngicas, inhibición de la síntesis del ergosterol, inhibición de la síntesis del 1,3 β -D-glucano y alteración de la síntesis de ARN e interferencia con la replicación de ADN. El mecanismo de acción varía de acuerdo a los antifúngicos que se utilice, muchas especies de hongos para contrarrestar dichos mecanismos han ido adquiriendo diferentes capacidades de resistencia (intrínseca) los cuales les permiten adaptarse o contrarrestar el accionar del fármaco (52, 71).

2.2.6.1 Mecanismos de resistencia a los azoles

Los mecanismos de resistencia a los azoles son los más comunes entre las especies del género *Candida* y repercute de manera relevante, ya que estos fármacos son de primera línea y los más utilizados para su tratamiento (72). El uso excesivo de azoles en el tratamiento, junto con las malas prácticas en la identificación de especies patógenas y la profilaxis inadecuada de las infecciones por *Candida*, ha contribuido al aumento de la resistencia. Además, algunas especies del género *Candida* tales como *C. glabrata* y *C. krusei* exhiben resistencia intrínseca a los azoles (73).

Los principales mecanismos que confieren resistencia a los antifúngicos de la familia de los azoles en especies del género *Candida* incluyen mutaciones puntuales en los genes que codifican enzimas clave implicadas en la biosíntesis del ergosterol, lo que altera su función y afecta la composición de la membrana celular. Además, se observa la sobreexpresión de genes asociados con procesos críticos para la estabilidad y funcionalidad de la membrana, como aquellos que codifican bombas de eflujo encargadas de expulsar los azoles del interior al exterior de la célula, reduciendo así su eficacia. Estos

mecanismos, tanto genéticos como funcionales, trabajan en conjunto para facilitar la supervivencia de *Candida* en presencia de los azoles (72, 73).

Las especies de *Candida* presentan diversos mecanismos específicos de resistencia antifúngica. Uno de los principales es la sobreexpresión de sistemas de bombeo que facilitan la expulsión del antifúngico fuera de la célula. Entre estos sistemas se encuentran las bombas de eyección de tipo facilitador principal (MF, Major Facilitator), codificadas por los genes *MDR* (Multi-Drug Resistance), y los transportadores tipo casete de unión a trifosfato de adenosina (ABC, ATP-Binding Cassette), que son regulados por los genes *CDR* (*Candida* Drug Resistance). Además, la sobreexpresión del gen *ERG11* provoca una producción excesiva de la enzima 14- α -desmetilasa, lo que incrementa la síntesis de ergosterol, su sustrato, y requiere mayores concentraciones de antifúngico para ser efectivo (74–76).

Otro mecanismo de resistencia radica en las mutaciones genéticas. Por ejemplo, las mutaciones en *ERG11* disminuyen la afinidad de la enzima 14- α -desmetilasa por los azoles, mientras que las mutaciones en *ERG3*, que codifica la enzima C5 esteroles desaturasa, evitan la transformación de los esteroides 14- α -metilados en compuestos tóxicos. Además, genes como *Tac1p* y *Mrr1p*, que regulan la transcripción de transportadores asociados con la resistencia antifúngica, también pueden presentar mutaciones puntuales que contribuyen a este fenómeno (74, 75).

En el caso de resistencia asociada a la formación de biopelículas, se observan cambios en los estados metabólicos y fisiológicos de las células, una matriz extracelular rica en glucano que dificulta la entrada de los azoles al interior celular, alta densidad celular capaz de tolerar concentraciones elevadas de antifúngicos y la sobreproducción de sistemas de bombeo. Estas alteraciones incluyen modificaciones en el gen *ERG11*, que

afecta la diana del antifúngico, así como mutaciones en *ERG3*, que alteran la ruta de biosíntesis del ergosterol. Además, las alteraciones en el transporte del fármaco, mediadas por las bombas de eyección localizadas en la membrana celular (codificadas por los genes *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* y *MDR2*), desempeñan un papel crucial en la resistencia de las especies de *Candida* (74–76).

2.2.7 Mutaciones en *ERG3*

Las mutaciones en el gen *ERG3*, en particular aquellas que generan sustituciones, alteran la función de la enzima C-5 desaturasa, esencial en la biosíntesis del ergosterol. Esta enzima cataliza la formación de un doble enlace entre los carbonos C-5 y C-6 del anillo B del episterol. Este proceso implica la oxidación del episterol, eliminando dos átomos de hidrógeno (desaturación). La reacción utiliza oxígeno molecular (O_2) y un donador de electrones, como NADPH, para facilitar la transferencia de electrones. El producto resultante es el ergosta-5,7,22-trienol, un precursor clave en la biosíntesis del ergosterol (77, 78).

Cuando el gen *ERG3* se inactiva o presenta mutaciones puntuales, se bloquea la actividad de la C-5 desaturasa, lo que impide la interacción con el episterol y genera un desvío en la ruta biosintética. Como resultado, se acumulan intermediarios alternativos, como el ergosta-7,22-dienol, que, aunque tóxicos para la célula en condiciones normales, pueden integrarse en la membrana celular como un mecanismo compensatorio. Este fenómeno tiene como efectos la interrupción de la síntesis de ergosterol, y por otro, una disminución en la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos de la familia de los azoles (77, 78).

2.2.8 Mutaciones en *ERG11*

El gen *ERG11* codifica la lanosterol 14- α -desmetilasa, enzima perteneciente a la familia del citocromo P450, cuya función es catalizar la desmetilación en la posición C-14 del lanosterol, produciendo 4,4'-dimetilcolesta-8,14,24-trieno-3-beta-ol, un paso clave en la biosíntesis del ergosterol (79). Las mutaciones en este gen pueden conferir resistencia a los antifúngicos debido a la sustitución de aminoácidos, ya sea en el sitio activo o en el área de reconocimiento de la enzima Erg11p por los azoles (80, 81). Aunque se han identificado más de 169 sustituciones no sinónimas en este gen de cepas de *Candida*, solo algunas están directamente relacionadas con la resistencia a los azoles. Estas variaciones estructurales en la 14- α -desmetilasa, codificada por *ERG11*, afectan la unión de los azoles sin comprometer la actividad enzimática, lo que permite que el organismo continúe con su metabolismo. Cabe destacar que el gen *ERG11* exhibe una notable plasticidad genética, lo que favorece los cambios estructurales en la enzima (79–82).

2.2.9 Relación entre las mutaciones en *ERG3* y *ERG11*

Las mutaciones en *ERG11* y *ERG3* pueden combinarse para generar resistencia a los azoles. Las alteraciones en *ERG11* reducen la afinidad de la lanosterol 14- α -desmetilasa por los azoles, permitiendo la acumulación de intermediarios como el 14- α -metilfecosterol, tóxicos para la célula. Por su parte, las mutaciones en *ERG3* interrumpen la conversión de fecosterol en episterol, evitando la formación de derivados más tóxicos y favoreciendo la acumulación de esteroides alternativos, como el ergosta-7,22-dienol, que reemplaza parcialmente al ergosterol (Figura 2). Esta interacción metabólica permite que las células sobrevivan en presencia de los azoles, reforzando su resistencia antifúngica. (50, 78, 81).

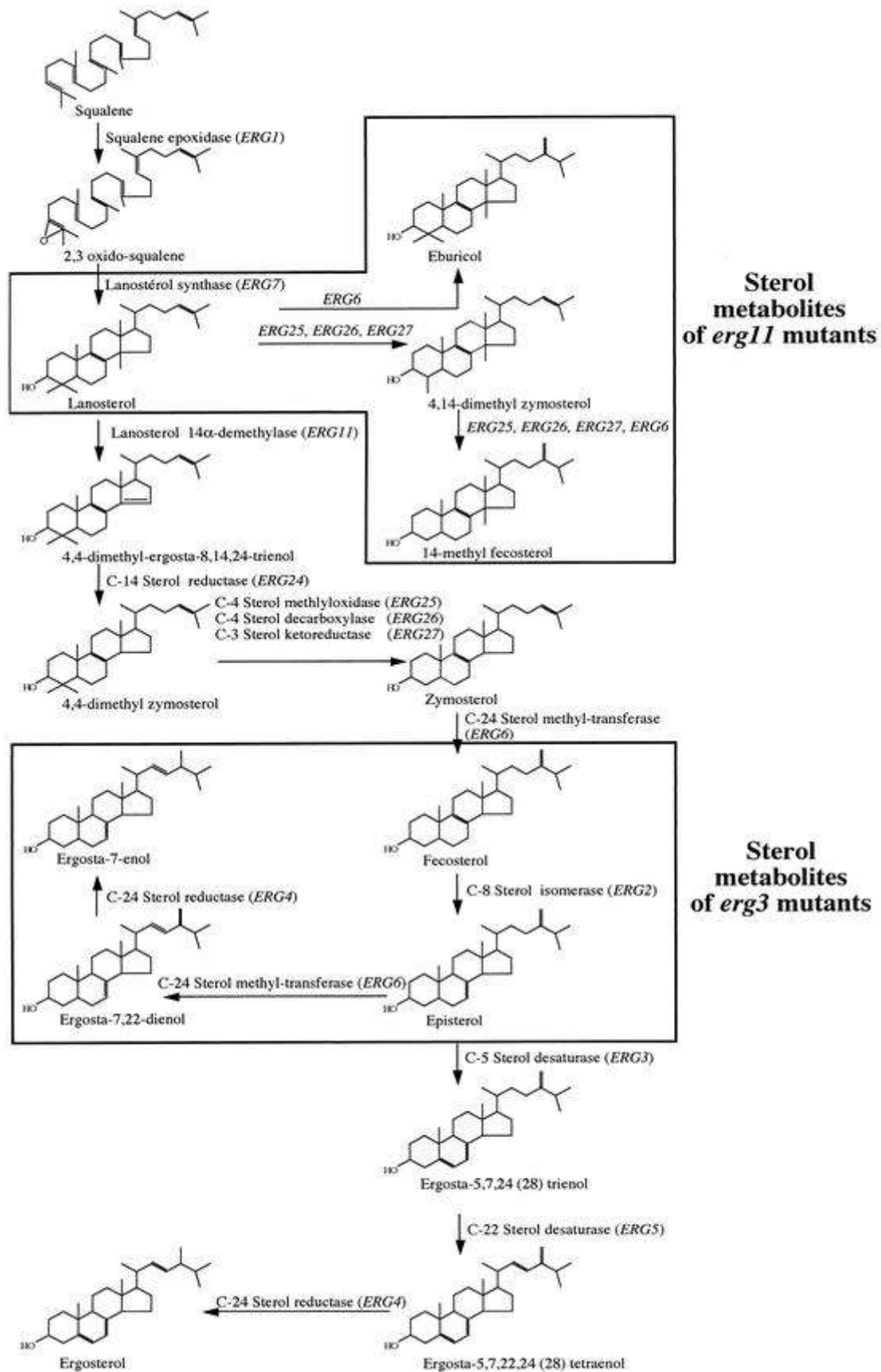


Figura 2. Vía biosintética del ergosterol en *C. albicans* con bloqueo de las funciones de *ERG11* y *ERG3*

Fuente: Sanglard et al. (50)

2.2.10 Diagnóstico molecular de mecanismo de resistencia

Existen diferentes metodologías para detección molecular principalmente, PCR (reacción en la cadena de la polimerasa), secuenciamiento Sanger, NGS, pruebas en la detección y amplificación basada en la secuenciación de los ácidos nucleicos (NASBA), la qPCR (tiempo real) con sondas fluorescentes para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), sonda de transcripción inversa RNAm en los principales genes de resistencia a fármacos, como *ERG11*, *MDR1*, *CDR1* y *CDR2* o actualmente técnicas automatizadas (83).

2.2.11 Secuenciamiento Sanger

En la secuenciación por el método de Sanger, el ADN amplificado o el ADN complementario (ADNc) se une a un oligonucleótido cebador y se extiende utilizando la enzima ADN polimerasa. Durante este proceso, se emplea una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTP: dATP, dGTP, dCTP y dTTP) junto con didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP: ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP), que actúan como terminadores de cadena. La incorporación de los ddNTP en concentraciones limitadas detiene la elongación en diferentes puntos, generando fragmentos de ADN de distintas longitudes que pueden ser diferenciados (84, 85).

A lo largo de esta evolución, y hasta el día de hoy, la secuenciación de ADN de Sanger ha servido como el estándar de oro para la determinación de secuencias de ácidos nucleicos (NA) (85).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1 Nivel de Investigación

Descriptivo, ya que busca detallar la variabilidad genética asociada a la resistencia a los azoles en aislados de *Candida*, al observar y registrar las características de las variables sin modificarlas.

3.2 Tipo y Diseño de investigación

El presente estudio es de tipo básico, ya que genera conocimiento fundamental para futuras investigaciones aplicadas sobre la variabilidad genética en los genes *ERG3* y *ERG11* en aislados de *Candida* resistentes a los azoles. Además, es de diseño observacional, ya que se limita a recopilar información mediante la observación, y transversal, dado que los datos se obtienen en un único momento.

3.3 Diseño metodológico

3.3.1 Material Biológico

El número de aislamientos de *Candida* spp., analizados fue 204 los cuales fueron obtenidos de pacientes atendidos en el laboratorio de Microbiología del Área de Patología en el Hospital II EsSalud – Cajamarca, durante el año 2022.

Marco muestral

Registro de los aislamientos identificados parcial o completamente como *Candida* spp., en el laboratorio de Microbiología del Área de Patología en el Hospital II EsSalud – Cajamarca, durante el año 2022.

Unidad de análisis

Cada uno de los aislamientos de *Candida* spp. provenientes de pacientes atendidos en el laboratorio de Microbiología del Área de Patología en el Hospital II EsSalud – Cajamarca, durante el año 2022.

3.3.2 Autorización y transporte de los aislamientos de *Candida* spp.

Se solicitó autorización por escrito al jefe del Laboratorio del Área de Patología del Hospital II EsSalud de Cajamarca para el acceso al cepario del año 2022 (Apéndice 1). Los 204 aislamientos de levaduras estuvieron preliminarmente identificados como *Candida* spp. Los aislamientos fueron transportados en cadena de frío desde el Laboratorio del Área de Patología del Hospital II EsSalud de Cajamarca hasta el laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cajamarca para ser procesados.

3.3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Los datos de los aislamientos (origen, sexo y edad del paciente, servicio y área hospitalaria) se obtuvieron de los informes y registros clínicos del laboratorio de Microbiología; esta información se relaciona con los pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud de Cajamarca durante el año 2022. Dichos datos se recopilaron mediante una ficha diseñada por el investigador; no se tomó datos que identifiquen a las personas (Apéndice 2).

Además, todas las características fenotípicas encontradas en los aislamientos de *Candida* spp. se registraron en la tabla elaborada en la investigación (Apéndice 3).

3.3.4 Reactivación y evaluación de la pureza de los aislamientos de *Candida* spp.

La reactivación de los aislamientos se llevó a cabo inoculando de 2 a 4 colonias en un tubo de ensayo con tapa rosca, que contenía 5 mL de caldo BHI. Este tubo se incubó a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se sembró el cultivo en agar Sabouraud sin antibiótico y se mantuvo a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, se evaluaron las características morfológicas (aspecto, tamaño, forma, color, elevación de la colonia) y la pureza de cada aislamiento (86).

Para evaluar la pureza del cultivo, se realizó un examen directo y un examen con hidróxido de potasio (KOH al 10%). Para ello, se tomó una asada de las colonias reactivadas y se diluyó en una gota de solución salina para el examen directo, así como en una gota de hidróxido de potasio al 10% para el examen con KOH. Luego, se observaron las muestras bajo el microscopio óptico, registrando las observaciones obtenidas (86, 87).

3.3.5 Identificación fenotípica de las especies de *Candida*

3.3.5.1 Utilizando el medio cromogénico CHROMagar *Candida*

Los aislamientos reactivados de *Candida* spp. se sembraron en placas Petri con CHROMagar™ *Candida* Plus y se incubaron a 37°C durante un periodo de 24 a 48 h. Al término de este período se evaluó el crecimiento y el color de las colonias formadas. El color observado resulta de una reacción cromogénica, producto de la acción de la enzima β -glucosidasa, que hidroliza un cromógeno específico para cada especie de *Candida*, en presencia de un indicador particular. La interpretación del color de las colonias se realizó conforme a lo establecido en la tabla 2 (44, 88).

Tabla 2. Características de las colonias de *Candida* spp. en CHROMagar *Candida* Plus

Especies	Aspecto de la colonia
<i>C. albicans</i>	Verde (tono turquesa u oscuro)
<i>C. dublinensis</i>	Verde opaco
<i>C. tropicalis</i>	Azul metálico
<i>C. parapsilosis</i>	Blanco a tonalidad marrón
<i>C. glabrata</i>	De malva a morado
<i>C. krusei</i>	Rosa pálido

3.3.5.2 Prueba del tubo germinal

Se siguió el método descrito por Hernández y Pérez, con algunas modificaciones, seleccionado por su alta sensibilidad (98,0%) y especificidad (99,6%) para diferenciar *C. albicans* de otras especies. En esta prueba se diluyó una porción de colonia de la levadura a evaluar en 0,5 ml de suero humano; esta muestra se incubó a 37°C durante un periodo de 2 a 4 h. Para completar la prueba, una gota de la emulsión fue puesta sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, observándose bajo un microscopio óptico con aumentos de 100X y 400X. Los resultados se interpretaron de acuerdo con la descripción de la tabla 3 (89–91).

Tabla 3. Características microscópicas de *Candida* spp para la prueba de tubo germinativo.

Especies	Tubo germinativo
<i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	Presencia de tubo germinal: blastoconidias con prolongaciones angostas, no septadas en su origen.
<i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Presencia de pseudohifas: blastoconidias acompañadas de prolongaciones que inician desde un septo y tienen mayor ancho y largo que las hifas de los tubos germinales.
<i>C. glabrata</i>	Ausencia de cualquier tipo de filamentación: blastoconidias pequeñas redondas y uniformes.
<i>C. krusei</i>	Filamentación variable

3.3.5.3 Producción de velo o película

En esta prueba se tomó en cuenta las indicaciones de Moreno et al., se inoculó una porción de colonia de levadura en un tubo de vidrio con 3 mL de caldo BHI. La muestra se incubó a 37°C durante 24 h (89, 92). La interpretación del resultado se hizo conforme a lo descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Características de *Candida* spp. para la producción de velo o película en BHI.

Especies	Producción de velo o película
<i>C. albicans</i>	(+)
<i>C. dubliniensis</i>	(+)
<i>C. tropicalis</i>	(+++)
<i>C. parapsilosis</i>	(+)
<i>C. glabrata</i>	(+)
<i>C. krusei</i>	(++)

3.3.5.4 Termotolerancia

En esta prueba se siguió las indicaciones de Brito A.; con algunas modificaciones, las cepas que mostraron coloración verde opaco en el medio CHROMagar™ *Candida* Plus fueron inoculadas en tubos con agar Sabouraud sin antibiótico. Los tubos se incubaron a 45°C durante 24 h (89, 91). La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo con lo descrito en la tabla 5.

Tabla 5. Características de las colonias de *Candida* spp. para crecimiento a 42°C.

Especies	Crecimiento
<i>C. albicans</i>	Crecimiento óptimo.
<i>C. dubliniensis</i>	Crecimiento nulo o escaso.

3.3.6 Preparación de los inóculos fúngicos

Cada una de las levaduras fue sembrada en placas con agar Sabouraud e incubadas a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se tomó de 3 a 5 colonias para resuspenderlas en 3 mL de solución salina fisiológica estéril (SSFE) hasta alcanzar una turbidez equivalente al tubo 0,5 del estándar de turbidez de McFarland en el nefelómetro, la cual corresponde a una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (89, 91).

3.3.7 Prueba de sensibilidad a los antifúngicos para *Candida* spp

Para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos (antifungigrama), se siguió las recomendaciones de Meiss et al., con algunas modificaciones, basado en el método de difusión en disco. Primero, con ayuda de un hisopo estéril, se diseminó el inóculo preparado en el paso anterior sobre la superficie de la placa con agar Mueller Hinton modificado (medio + 2 % glucosa y 0,5 mg/mL de azul de metileno) (Anexo 1); el estriado se hizo en tres direcciones diferentes cubriendo toda la superficie del medio, dejando secar el inóculo con la placa volteada de 3 a 5 min. Luego de este tiempo, y con ayuda de una aguja estéril, se dispuso los antifúngicos contenidos en discos (Liofilchem®) sobre la superficie del agar presionando suavemente (89, 91, 93). Los antifúngicos utilizados fueron: triazoles (fluconazol y voriconazol) e imidazoles (clotrimazol y miconazol). La distancia entre los discos se estableció según lo indicado en el "Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico", colocándolos a 20 mm del borde de la placa y separados entre sí por 40 mm (89), las concentraciones de los antifúngico por disco se describen en la Tabla 6.

Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en aerobiosis; al cabo del tiempo de incubación se realizó la medición de los halos de inhibición y se interpretó según las

categorías establecidas por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI): sensible (S), intermedio (I) y resistente (R) (89, 94–96), se interpretaron los resultados utilizando los puntos de corte descritos en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración de antifúngicos en discos y diámetros de halos de susceptibilidad (94–96).

Antifúngico	Disco	Diámetro (mm)		
		¹ R	² I	³ S
Fluconazol	25 µg	≤14	15-18	≥19
Voriconazol	1 µg	≤13	14-17	≥17
Clotrimazol	50 µg	≤10	11-19	≥20
Miconazol	10 µg	≤11	12-19	≥20

¹R: Resistente

²I: Intermedio

³S: Sensible

3.3.8 Extracción de ADN de cepas de *Candida* spp.

Se siguieron las recomendaciones descritas por Sambrook y Russell, con algunas modificaciones (97). Las levaduras se sembraron en Agar Sabouraud Dextrosa a una temperatura de 30 °C durante 24 h; se procedió a realizar el proceso de digestión celular, el cual consistió en suspender de 2 a 4 colonias aisladas en 500 µL de agua grado molecular (contenido en un microtubo de 1,5 mL) hasta obtener una mezcla homogénea, ayudados por el procedimiento de aspirar y soltar la suspensión con la ayuda de una micropipeta o realizando un vortex leve durante 10 s. Posteriormente, a la suspensión se le agregó 1 mL de buffer de lisis (ver Anexo 2) y se mezcló en vortex durante 20 s. Luego, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µL del contenido sobre el pellet. Después, se agregó 0,5 mL de buffer de lisis y se homogenizó por inversión manual unas 60 veces.

Finalmente, se adicionaron 20 μL de beta-mercaptoetanol y 10 μL de proteinasa K, seguido de un vortex de 10 s. La mezcla se incubó toda la noche en un termobloque a 56 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 h (97).

El siguiente paso fue extraer ADN utilizando la técnica del fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, en proporciones de 25:24:1 (FCAI). El producto digerido se mezcló mediante vortex durante 10 s y se incubó por 30 min a 56 $^{\circ}\text{C}$ para conseguir una digestión completa. Luego, se agregó 500 μL de FCAI y se hizo un vortex durante 20 s más. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min, con un intervalo de 5 min a temperatura ambiente se volvió a centrifugar. La fase acuosa obtenida se transfirió a un nuevo microtubo estéril, evitando transferir la interfase (Ver Apéndice 4). A este producto se le adicionó 600 μL de isopropanol al 100,0 % para precipitar el ADN (Ver Apéndice 5), se mezcló 50 veces por inversión manual y se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se obtuvo un pellet, el cual se lavó tres veces con etanol al 70,0 %. Finalmente, el pellet se secó en estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$, dejando el microtubo invertido sobre papel filtro por aproximadamente 1 h; el pellet fue resuspendido en 50 μL de agua grado molecular y se conservó a -20 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (97).

3.3.9 Evaluación de la calidad y concentración aproximada del ADN extraído

La calidad y concentración del ADN extraído se evaluó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop™ Lite (Thermo Scientific). Primero, siguiendo las indicaciones del software, se colocó 1 μL de agua grado molecular en el capilar del equipo para usarlo como blanco. Este proceso se repitió hasta que el valor obtenido fuera menor o igual a 0 en el parámetro de concentración. Posteriormente, se limpió el capilar con papel absorbente (98).

Las muestras de ADN a evaluar se homogenizaron durante 5 s en un vortex y se concentraron con un spin durante 5 s. Después, se tomó 1 μL del ADN y se colocó en el centro del capilar del Nanodrop y se procedió a medir; esto se repitió para cada muestra de ADN. Los criterios de evaluación considerados fueron: que la concentración se encontrara en el rango de 100-200 ng/ μL , y que los valores de los cocientes de lectura 260/280 y 260/230 estuvieran entre los rangos de 1.8-2.1 y 1.8-2.5, respectivamente, para ser considerados de buena calidad. Al finalizar la evaluación, se limpió el capilar utilizando agua grado molecular (98).

3.3.10 Amplificación de los genes *ERG3* y *ERG11* de *Candida* spp

Regiones de los genes *ERG3* y *ERG11* fueron amplificadas por PCR usando los primers de la tabla 7 (99, 100). Las condiciones de reacción consideraron las indicaciones descritas por el fabricante del kit de amplificación denominado 2X PCR Taq MasterMix (Applied Biological Materials Inc., abm®). La mezcla de reacción para ambos genes (*ERG3* y *ERG11*) consistió de 15 μL de TaqMasterMix, 12,72 μL de agua grado molecular y 0,84 μL de cada uno de los correspondientes primers a 10 μM . Finalmente, a cada reacción se agregó 0,6 μL de ADN fúngico completando un volumen de reacción de 30 μL .

La amplificación de los genes se llevó a cabo utilizando un termociclador S1000TM (BioRad Laboratories, Inc.), utilizando las siguientes condiciones de reacción: para el gen *ERG3* se inició con la activación de la polimerasa a 94 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización del ADN a 94 °C durante 30 s, hibridación de los primers a 50 °C durante 45 s, extensión a 70 °C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min. Para el gen *ERG11* se inició con la activación de la polimerasa a 94 °C

durante 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización del ADN a 94 °C durante 30 s, hibridación de los primers a 53,8 °C durante 1 min y 20 s, extensión a 70 °C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min.

Tabla 7. Primers empleados en la amplificación por PCR de los genes *ERG3* y *ERG11* (99,100).

Gen	Primers	Secuencia	Tamaño	Ta ¹
<i>ERG3</i>	Forward	5'-ATGGATATCGTACTAGAAATTTGTGA-3'	1163 pb	50 °C
	Reverse	5'-TCATTGTTCAACATATTCTCTATCG-3'		
<i>ERG11</i>	Forward	5' GAAAGGGAATTCAATCG 3'	1745 pb	53.8 °C
	Reverse	5' TGTTAATCCAATAAGTAAC 3'		

¹Ta: temperatura de hibridación o *annealing*

3.3.11 Electroforesis en gel de agarosa

La detección de los productos de PCR de los genes *ERG3* y *ERG11* se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa en un sistema horizontal. Se preparó un gel de agarosa al 1%, suspendiendo 0,4 g de agarosa (OmniPur®) en 40 mL de buffer TBE 0,5x.(101) Esta solución fue calentada hasta disolver la agarosa, dejándola enfriar durante unos minutos antes de agregar 4 µL de colorante SYBR-Safe (Invitrogen™). La mezcla homogeneizada se vertió en el molde de electroforesis horizontal, donde se dejó solidificar, y luego se retiraron los peines con cuidado para no dañar los pocillos del gel.

El gel solidificado se colocó en la cubeta de electroforesis horizontal (EasyCast™, Thermo Scientific) y se cubrió con buffer TBE 0,5x. A continuación, se mezclaron 4 µL de cada producto de PCR con 1 µL de tampón de carga (BlueJuice Gel Loading Buffer, Thermo Fisher™) y se depositaron en los pocillos (uno por carril) correspondientes del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V y 500 mA durante 30 min utilizando la fuente de energía PowerPac Basic Power Supply (BioRad Laboratories, Inc.). Las bandas

obtenidas fueron observadas en un transiluminador de luz UV (Major Science Co, Ltd.) empleando una cámara de oscuridad (Clever Scientific, Ltd.), y se realizó la fotodocumentación de los resultados.

3.3.12 Secuenciación y purificación del fragmento del gen *ERG3* y *ERG11*

Los productos de PCR correspondientes a los genes *ERG3* y *ERG11* fueron enviados a secuenciar en MACROGEN Chile (<https://dna.macrogen.com/main.do>); donde se utilizó el método de Sanger, en ambos sentidos (forward y reverse), para garantizar la precisión y la cobertura completa de las regiones amplificadas. Este método, ampliamente reconocido por su alta fiabilidad en la identificación de mutaciones puntuales, permite obtener lecturas precisas de las secuencias nucleotídicas.

El envío de los productos de PCR se realizó siguiendo estrictamente las instrucciones proporcionadas por la empresa, lo que incluyó la preparación adecuada de las muestras, la conservación en condiciones óptimas de temperatura para evitar la degradación del ADN, y el etiquetado claro de cada muestra. Adicionalmente, se incluyó toda la documentación necesaria, como información sobre las concentraciones de ADN y los primers utilizados para el análisis.

3.3.13 Selección de secuencias molde de comparación

Las secuencias moldes de comparación de los genes sin mutaciones se obtuvieron de cepas de referencias en la base de datos de NCBI ((National Center for Biotechnology Information) tanto para *ERG3* y *ERG11* (Códigos de acceso: XM_708484.2 y XM_711668.2 respectivamente); posteriormente, estas secuencias de nucleótidos se tradujeron con el Translate Tool para obtener las secuencias de aminoácidos molde sin

presencia de mutaciones de los genes en estudio, y así poder detectar mutaciones con cambio de sentido.

3.3.14 Análisis bioinformático de los fragmentos de los genes *ERG3* y *ERG11*

Las secuencias obtenidas (cromatogramas) fueron sometidas a un proceso de edición y análisis en los programas Chromas, Translate Tool y Aliview.

El programa Chromas v. 2.6.6.(102), se utilizó para revisar y editar cada una de las secuencias del cromatograma obtenidos en ambos sentidos (Forward y Reverse) para cada producto secuenciado, según la calidad y la forma de los picos obtenidos (Apéndice 6). Terminado este paso se obtuvo la secuencia consenso de cada producto en formato Fasta (Apéndice 7); este resultado se pasó al programa en línea Translate Tool (Expasy, Swiss Institute of Bioinformatics) (103) para traducir y obtener la secuencia de aminoácidos.

Utilizando el programa AliView (104), las secuencias de aminoácidos obtenidas se alinearon frente a los moldes de aminoácido sin mutaciones (traducidos de las secuencias de los genes sin mutaciones); luego se buscó, identificó y analizó las mutaciones en las secuencias de aminoácidos correspondientes a los genes *ERG3* y *ERG11*; AliView también se utilizó para alinear la secuencia de nucleótidos y poder identificar el cambio de nucleótido que conlleva a generar una mutación con cambio de sentido, sin sentido y silenciosa.

3.3.15 Análisis estadísticos de datos

La información recolectada mediante la ficha de recolección de datos se almacenó en una base de datos utilizando el programa Excel 2019. Al finalizar la investigación, todos los datos fueron analizados con el software SPSS versión 26. Los resultados descriptivos se presentaron en tablas y gráficos. La asociación entre los grupos formados (especie de *Candida*, origen de muestra, perfiles de resistencia, edad, sexo del paciente, y área o servicio hospitalario) se evaluó mediante la prueba de Chi cuadrado y/o el test exacto de Fisher, considerando una significancia estadística de $p \leq 0,05$; lo que representa un nivel de confianza del 95,0% y un error del 5,0%.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1. Identificación fenotípica de las especies de *Candida*

De los 204 aislamientos clínicos provenientes del Hospital II EsSalud de Cajamarca, 113 (55,4 %) aislamientos fueron identificados como *C. albicans* y 91 (44,6 %) aislamientos como *Candida no albicans* (38 (18,6 %) *C. glabrata*, 24 (11,7 %) *C. parasilopsis*, 13 (6,3 %) *C. tropicalis*, 7 (3,4 %) *C. krusei* y 09 (4,4 %) se agruparon en otras especies (Figura 3); la identificación fenotípica se realizó mediante la prueba cromogénica en ChromAgar *Candida* Plus (Figura 4), la prueba de tubo germinativo (Figura 5), la prueba de producción de velo o película en BHI (Figura 6) y la prueba de termotolerancia (Figura 7) en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca.

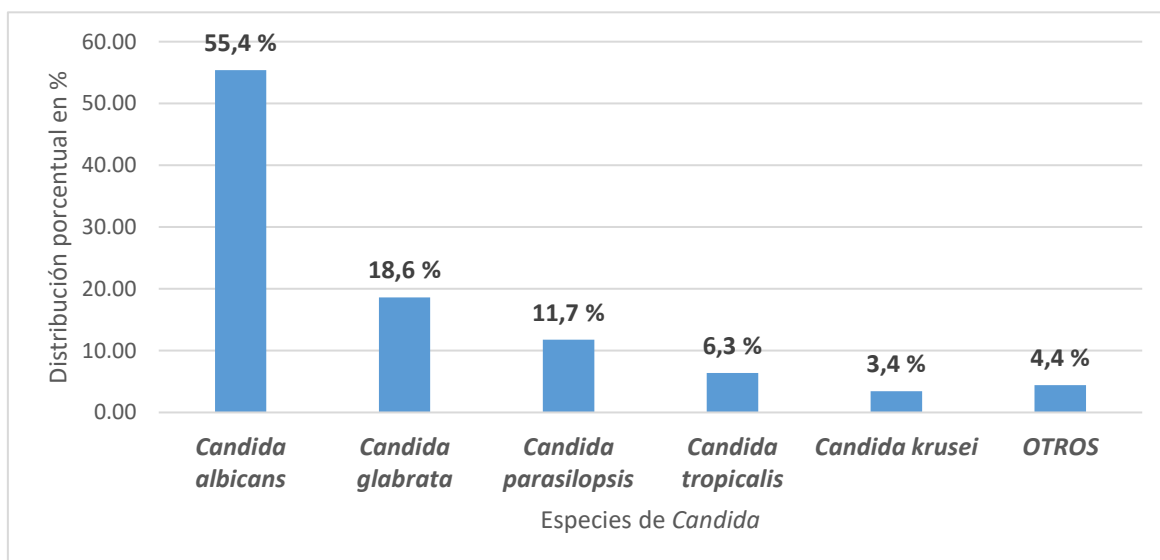


Figura 3. Distribución porcentual de aislamientos identificados como *Candida albicans* y *Candida no albicans* de este estudio.

En la Figura 4, mediante la prueba cromogénica se logró diferenciar diversos colores de colonias, tales como: colonias de color verde turquesa (*C. albicans*), rosa pálido (*C. krusei*), azul metálico (*C. tropicalis*), blanco a marrón (*C. parapsilosis*), morado (*C. glabrata*) y otras tonalidades (diferentes especies de *Candida*). En caso de bacteria solo se presenta una pigmentación mínima de color morado fuerte.

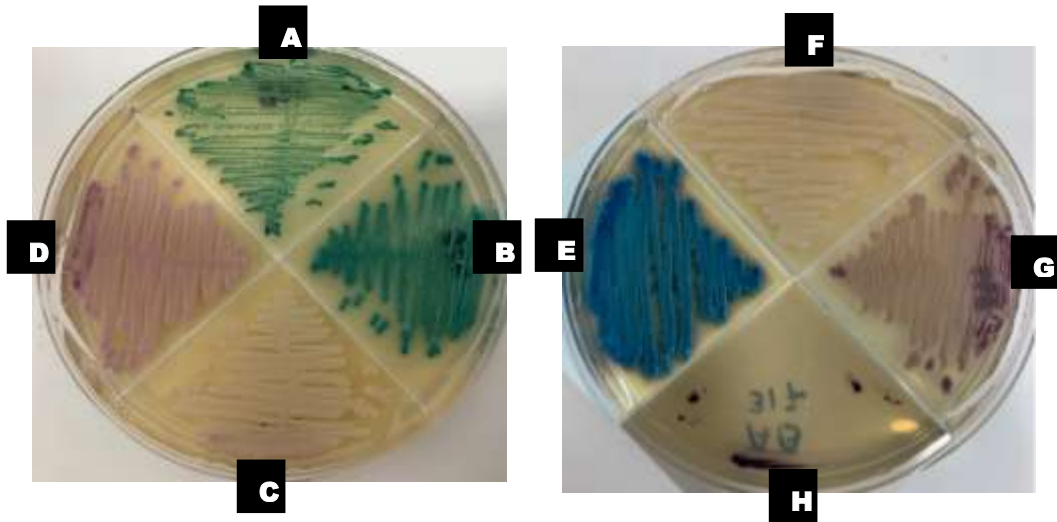


Figura 4. Identificación fenotípica de especies de *Candida* mediante la prueba cromogénica en ChromAgar *Candida* Plus. (A) *C. albicans*, (B y C) Otras especies de *Candida*, (D) *C. Krusei*, (E) *C. tropicalis*, (F) *C. parasilopsis*, (G) *C. glabrata* y (H) Bacterias

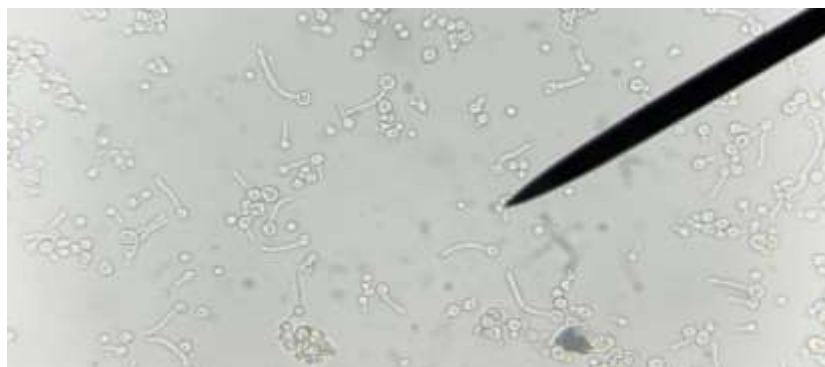


Figura 5. Identificación fenotípica presuntiva de *Candida albicans* mediante la observación de tubo germinativo en preparados en fresco con suero (Blastoconidias con prolongaciones angostas y no septadas en su origen).

En la Figura 6, se observa que algunos tubos presentan opacidad y turbidez en su interior, junto con una película ligera o moderada en la superficie del caldo BHI. En contraste, otros tubos no muestran ningún cambio en el caldo BHI.

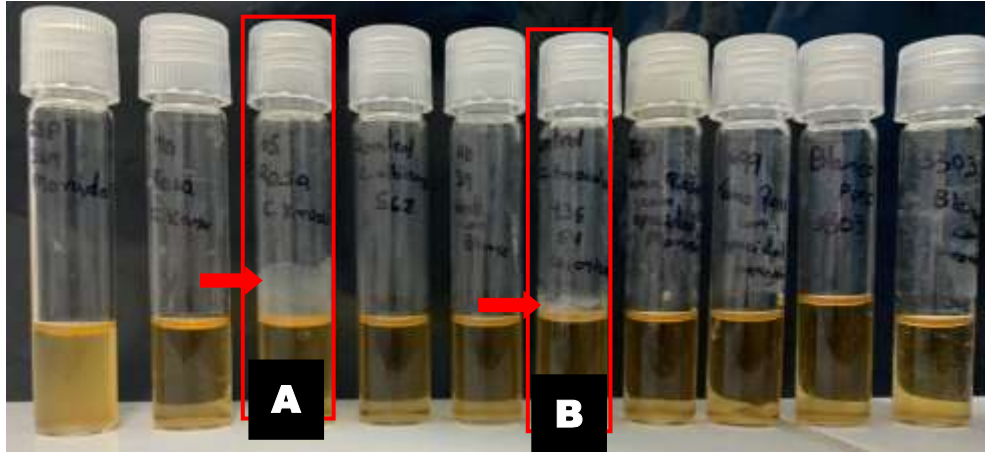


Figura 6. Identificación fenotípica mediante la prueba de formación de velo o película en caldo BHI. (A) *C. krusei* y (B) *C. tropicalis*.



Figura 7. Identificación fenotípica mediante la prueba de termotolerancia en medio Agar Sabouraud para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*. (A) Termotolerancia negativa: *C. dubliniensis* y (B) Termotolerancia positiva: *C. albicans*.

4.1.2. Características de origen de los aislamientos.

En este estudio se analizaron 204 aislamientos de *Candida* spp., los cuales, según los registros clínicos, provenían de diferentes áreas hospitalarias. De estos, 105 aislamientos (51,5 %) correspondieron a pacientes atendidos en Consulta Externa, 55 aislamientos (27,0 %) al área de Hospitalización y 44 aislamientos (21,6 %) a Urgencias/Emergencias. Al comparar dichos resultados, *C. albicans* predominó en Consulta Externa, con 68 aislamientos (64,8 %), mientras que el área de Hospitalización presentó una mayor proporción de *C. no albicans*, con 34 aislamientos (61,8 %).

En cuanto a los servicios hospitalarios, la mayor proporción de aislamientos procedió de Medicina General, con 96 casos (47,1 %), seguida de Gineco-Obstetricia, con 88 aislamientos (43,1 %), y otros servicios hospitalarios, con 20 aislamientos (9,8 %). La mayor presencia de *C. albicans* se observó en Gineco-Obstetricia, con 68,2 % de los aislamientos, mientras que *C. no albicans* predominó en Medicina General, con 55,2 %.

Respecto al origen de los aislamientos, al comparar los resultados, las secreciones vaginales representaron la mayor proporción de aislamientos (40,7 %), con predominancia de *C. albicans* (68,7 %). En las muestras respiratorias (37,7 %), *C. no albicans* fue la especie más frecuente (58,4 %), marcando un contraste con las secreciones vaginales. Las muestras de orina (18,6 %) mostraron una ligera predominancia de *C. albicans* (55,3 %), aunque con una diferencia menos marcada. Finalmente, las "otras muestras biológicas" (2,9 %) presentaron una distribución equitativa entre *C. albicans* y *C. no albicans* (50,0 % cada una). Esto evidencia que la distribución de especies varía según el tipo de muestra biológica.

En relación con los rangos de edad, los menores (0-17 años) representaron el 6,9 % de los aislamientos (14 casos), predominando *C. albicans* (78,6 %). En adultos de 18 a 60 años, que constituyeron el 60,3 % de los aislamientos (123 casos), también predominó *C. albicans* (61,0 %), aunque con una mayor proporción de *C. no albicans* (39,0 %) en comparación con los menores. En adultos mayores (61 años o más, 32,8 %; 67 casos), *C. no albicans* fue la especie más frecuente (59,7 %). Respecto al género, los varones representaron el 30,9 % de los aislamientos (63 casos), con predominancia de *C. no albicans* (60,3 %), mientras que las mujeres, con el 69,1 % de los aislamientos (141 casos), mostraron una mayor proporción de *C. albicans* (62,4 %). Los datos descritos se resumen en la Tabla 8.

El análisis estadístico de las características clínicas de los aislamientos y su relación con las especies de *Candida* (*C. albicans* y *C. no albicans*) muestra que todos los valores p obtenidos son menores a 0,05 ($p < 0,05$) (ver en Tabla 8). Esto indica que las diferencias observadas entre los grupos *C. albicans* y *C. no albicans* son estadísticamente significativas para todas las características analizadas.

Los valores de chi-cuadrado obtenidos para las características analizadas muestran asociaciones significativas entre estas variables y el tipo de *Candida*. Para origen, el test ($p=0,008$) indica que la distribución de *C. albicans* y *C. no albicans* varía significativamente entre las diferentes fuentes de muestra, siendo *C. albicans* más frecuente en secreciones vaginales. En el caso de sexo, la asociación es también significativa ($p=0,003$), mostrando que *C. albicans* predomina en mujeres, mientras que *C. no albicans* es más común en hombres.

Con respecto a edad, el test ($p=0,005$) señala una diferencia significativa entre los grupos etarios, observándose que *C. albicans* predominó en menores de edad (en la muestra

estudiada), mientras que *C. no albicans* es más común en adultos mayores. Para área, los resultados ($p=0,006$) indican que el tipo de *Candida* varía significativamente según el área de atención, con un predominio de *C. albicans* en consulta externa y de *C. no albicans* en hospitalización. Finalmente, para servicio, la asociación también es significativa ($p=0,005$), observándose que *C. albicans* es más frecuente en pacientes de ginecología-obstetricia, mientras que *C. no albicans* predomina en medicina general.

Estos datos sugieren que la distribución de las especies de *Candida* varían según estas características, lo que refleja diferencias en factores clínicos, epidemiológicos o de susceptibilidad.

Tabla 8. Características clínicas de los aislamientos identificados como *C. albicans* y *C. no albicans* obtenidas del Hospital II EsSalud-Cajamarca.

Características		Total	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida no albicans</i>	P
Origen	Secreción vaginal	83 (40,7 %)	57 (68,7 %)	26 (31,3 %)	0,008
	Muestras respiratorias	77 (37,7 %)	32 (41,6 %)	45 (58,4 %)	
	Orina	38 (18,6 %)	21 (55,3 %)	17 (44,7 %)	
	Otros	6 (2,9 %)	3 (50,0 %)	3 (50,0 %)	
Edad	Menores de edad (0-17 años)	14 (6,9 %)	11 (78,6 %)	3 (21,4 %)	0,005
	Adulto (18-60 años)	123 (60,3 %)	75 (61,0 %)	48 (39,0 %)	
	Adulto mayor (≥ 61 años)	67 (32,8 %)	27 (40,3 %)	40 (59,7 %)	
Sexo	Masculino	63 (30,9 %)	25 (39,7 %)	38 (60,3 %)	0,003
	Femenino	141 (69,1 %)	88 (62,4 %)	53 (37,6 %)	

Área	Consulta externa	105 (51,5 %)	68 (64,8 %)	37 (35,2 %)	0,006
	Hospitalización	55 (27,0 %)	21 (38,2 %)	34 (61,8 %)	
	Urgencia/ Emergencia	44 (21,6 %)	24 (54,5 %)	20 (45,5 %)	
Servicio	Medicina general	96 (47,1 %)	43 (44,8 %)	53 (55,2 %)	0.005
	Gineco - Obstetra	88 (43,1 %)	60 (68,2 %)	28 (31,8 %)	
	Otros	20 (9,8 %)	10 (50,0 %)	10 (50,0 %)	

Se utilizan valores de $p < 0,05$ e intervalos de confianza al 95,0 %

4.1.2 Determinación de susceptibilidad frente a los Azoles

En el análisis de los 204 aislamientos de *Candida* spp. frente a azoles (imidazoles y triazoles), mediante el método de disco de difusión (Apéndice 8), se observó que el 53,4 % presentó resistencia a al menos un azol, mientras que el 46,6 % mostró sensibilidad a todos los azoles evaluados. En cuanto a la frecuencia de resistencia de los aislamientos a los triazoles, se evidencio una mayor capacidad: el 34,4 % de los aislamientos fueron resistentes al fluconazol y el 17,6 % presentaron resistencia intermedia. Respecto al voriconazol, se identificó un 18,2 % de resistencia y un 12,7 % de resistencia intermedia. En el caso de los imidazoles, también se observó una moderada capacidad de resistencia y resistencia intermedia. El miconazol presento un 13,7 % de resistencia y un 20,6 % de resistencia intermedia. Por otro lado, el clotrimazol presentó un 0,5 % de resistencia y un 9,3 % de resistencia intermedia.

Estos resultados reflejan variaciones en la capacidad de los aislamientos para resistir a los distintos azoles evaluados, esto se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Susceptibilidad frente a los azoles de los aislamientos identificados como *C. albicans* y *C. no albicans* obtenidas del Hospital II EsSalud-Cajamarca.

Tipo de Antifúngico	Antifúngico	Características	Total	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida no albicans</i>
Triazoles	Fluconazol	Sensible	98 (48,0 %)	53 (54,1 %)	45 (45,9 %)
		Intermedio	36 (17,6 %)	20 (55,6 %)	16 (44,4 %)
		Resistente	70 (34,4 %)	40 (57,1 %)	30 (42,9 %)
	Voriconazol	Sensible	141 (69,1 %)	78 (55,3 %)	63 (44,7 %)
		Intermedio	26 (12,7 %)	8 (30,8 %)	18 (69,2 %)
		Resistente	37 (18,2 %)	27 (73,0 %)	10 (27,0 %)
Imidazoles	Miconazol	Sensible	134 (65,7 %)	67 (50,0 %)	67 (50,0 %)
		Intermedio	42 (20,6 %)	21 (50,0 %)	21 (50,0 %)
		Resistente	28 (13,7 %)	25 (89,3 %)	3 (10,7 %)
	Clotrimazol	Sensible	184 (90,2 %)	93 (50,5 %)	91 (49,5 %)
		Intermedio	19 (9,3 %)	19 (100,0 %)	0 (0,0 %)
		Resistente	1 (0,5 %)	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)

4.1.3 Perfiles de resistencia de los aislamientos de *Candida* spp.

Se identificaron seis perfiles distintos de resistencia antifúngica, siendo el PR3 el más prevalente. Este perfil, caracterizado por resistencia múltiple al fluconazol y miconazol (pertenecientes a los grupos de triazoles e imidazoles, respectivamente), incluyó 28 aislamientos (13,7 %). De estos, 15 (53,6 %) correspondieron a *C. albicans* y 13 (46,4 %) a *C. no albicans*.

El perfil PR4, con resistencia al fluconazol y voriconazol, fue el segundo más frecuente (11,3 %), predominando *C. no albicans* (78,3 %). El perfil con multirresistencia a todos los antifúngicos evaluados (PR1) representó el 9,8 % de los aislamientos y estuvo compuesto exclusivamente por *C. albicans*. El PR2, con resistencia al fluconazol, miconazol y voriconazol, comprendió el 9,3 % de los aislamientos, mostrando una distribución equilibrada entre *C. albicans* (52,6 %) y *C. no albicans* (47,4 %). Entre los perfiles con resistencia a un único antifúngico, el PR5, resistente al fluconazol, representó el 7,8 % y tuvo mayor presencia de *C. albicans* (62,5 %), mientras que el PR6, resistente al miconazol, registró solo el 1,5 %, predominando *C. no albicans* (66,7 %).

En términos generales, 90 aislamientos (44,1 %) mostraron resistencia a dos o más antifúngicos de la familia de los azoles, lo que refleja un patrón de resistencia múltiple significativo. Además, 67 aislamientos (32,8 %) presentaron resistencia a al menos un antifúngico perteneciente a los grupos de triazoles o imidazoles, mientras que 20 aislamientos (9,8 %) exhibieron un perfil de multiresistencia a todos los antifúngicos evaluados (PR1). La distribución porcentual de estos perfiles de resistencia en ambos grupos de especies se presenta detalladamente en la Tabla 10.

Los resultados de la prueba de Chi-cuadrado muestran una asociación significativa entre los perfiles de resistencia a antifúngicos y las especies de *Candida* ($p = 0,0001$). Esto

indica que las diferencias en los patrones de resistencia entre *C. albicans* y *C. no albicans* no son aleatorias, sino que están relacionadas con características específicas de cada especie. *C. albicans* se asocia principalmente con perfiles multirresistentes como PR 1 (FLUC-MCL-VO-CLO), mientras que *C. no albicans* predomina en perfiles como PR 4 (FLUC-VO) y PR 6 (MCL) (Tabla 10).

Tabla 10. Perfiles de resistencia antifúngica de los aislamientos de *C. albicans* y *C. no albicans*.

Código	Perfil de resistencia	Total	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida no albicans</i>	<i>p</i>
*PS1	Sensible	95 (46,6 %)	52 (54,7 %)	43 (45,3 %)	0.0001
*PR1	FLUC-MCL-VO-CLO	20 (9,8 %)	20 (100,0 %)	0 (0,0 %)	
*PR2	FLUC-MCL-VO	19 (9,3 %)	10 (52,6 %)	9 (47,4 %)	
*PR3	FLUC-MCL	28 (13,7 %)	15 (53,6 %)	13 (46,4 %)	
*PR4	FLUC-VO	23 (11,3 %)	5 (21,7 %)	18 (78,3 %)	
*PR5	FLUC	16 (7,8 %)	10 (62,5 %)	6 (37,5 %)	
*PR6	MCL	3 (1,5 %)	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	

***PS: Perfil de sensibilidad;**

***PR: Perfil de resistencia**

Se utilizan valores de $p < 0,05$ e intervalos de confianza al 95,0 %

4.1.3.1 Caracterización del PR1 en aislamientos de *C. albicans*

Al comparar los resultados de los aislamientos con resistencia total a los antifúngicos evaluados (PR1), se observa que el mayor porcentaje proviene de secreciones vaginales (80,0 %), seguido de orina (15,0 %) y muestras respiratorias (5,0 %). En cuanto al género,

los aislamientos se identificaron mayoritariamente en mujeres (90,0 %), mientras que solo un 10,0 % correspondió a varones. Respecto a los rangos de edad, predominan los aislamientos provenientes de adultos (80,0 %), seguidos por menores de edad (15,0 %) y adultos mayores (5,0 %). Según el área de atención, el 80,0 % de los aislamientos se registraron en Consulta Externa, mientras que Hospitalización y Urgencias/Emergencias representaron el 5,0 % y 15,0 %, respectivamente. Finalmente, por servicio, se destaca Gineco-Obstetricia como el principal origen de los aislamientos (75,0 %), seguido de Medicina General (20,0 %) y otros servicios (5,0 %). Estos datos obtenidos se presentan a continuación en la tabla 11.

Tabla 11. Distribución y características clínicas de los aislamientos de *C. albicans* con Perfil de Resistencia (PR1)

CARACTERISTICAS		N	%
Origen	Secreción vaginal	16	80,00 %
	Muestras respiratorias	1	5,00 %
	Orina	3	15,00 %
Sexo	Femenino	18	90,00 %
	Masculino	2	10,00 %
Edad	Menores de edad (0-17 años)	3	15,00 %
	Adulto (18-60 años)	16	80,00 %
	Adulto mayor (>=61 años)	1	5,00 %
Área	Consulta externa	16	80,00 %
	Hospitalización	1	5,00 %
	Urgencia/emergencia	3	15,00 %
Servicio	Medicina general	4	20,00 %
	Gineco-obstetra	15	75,00 %
	Otros	1	5,00 %

N: recuento de aislados resistentes de acorde a las características analizadas;

%: frecuencia de aislados resistentes de acorde a las características analizadas.

4.1.4. Extracción y amplificación de ADN genómico

A los 20 aislamientos de *C. albicans* con multiresistencia total a los azoles (PR1) se les realizó la extracción de ADN genómico. Las cuantificaciones y calidad de las muestras de ADN obtenidas mediante el espectrofotómetro Nanodrop™, son óptimas para el trabajo (Apéndice 9). El ADN extraído se utilizó para amplificar fragmentos de los genes *ERG3* y *ERG11*, con el propósito de identificar mutaciones mediante secuenciación. Adicionalmente, se realizó la extracción de ADN de 2 cepas sensibles a todos los antifúngicos, las cuales sirvieron como controles para la comparación de mutaciones con las cepas resistentes.

Los productos amplificados muestran bandas definidas que corresponden a los tamaños esperados según el peso molecular característico de cada gen: aproximadamente 1163 pb para el gen *ERG3* y 1750 pb para el gen *ERG11* (Apéndice 10)

4.1.5 Análisis de las mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11*

Este análisis se realizó para identificar posibles mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11*, de los 20 aislamientos de *C. albicans* que presentaron un perfil de resistencia total a los antifúngicos evaluados (PR1) en la prueba de susceptibilidad mediante difusión en disco, las cuales podrían ocasionar cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas, afectando tanto la biosíntesis de ergosterol como la resistencia a múltiples antifúngicos. La calidad de las secuencias fue evaluada utilizando el programa Chromas, donde se calificaron como de buena calidad el cromatograma tanto para el gen *ERG3* (Apéndice 11) como para el gen *ERG11* (Apéndice 12).

El análisis de las secuencias nucleotídicas y las secuencias traducidas de los genes *ERG3* y *ERG11* en los 20 aislamientos reveló la presencia de diversas mutaciones (Tabla 12), esto se pudo verificar en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos en Aliview, tanto para el *ERG3* (Apéndice 11) y el *ERG11* (Apéndice 12). En el gen *ERG3* se identificaron 11 tipos de mutaciones con cambio de sentido, las cuales podrían ocasionar modificaciones en la estructura proteica al alterar los aminoácidos correspondientes. Estas mutaciones fueron: Q86H, A101D, N114Y, Y139N, F144L, L187F, N188K, L193P, L225P, K240N y E368V. En el caso del gen *ERG11*, se encontraron 9 mutaciones con cambio de sentido: A114S, S216L, Y221H, S222P, W244G, Y257H, I261F, L276S y L305P, además de una mutación sin sentido: L280STOP, que generó un cambio significativo en la estructura de la proteína al introducir un codón de terminación prematura. Asimismo, se identificaron mutaciones silenciosas que no produjeron cambios en los aminoácidos ni en la estructura proteica. Para el gen *ERG3*, se observaron 7 mutaciones silenciosas distintas: C306T, T381C, T390G, T432C, C438T, A462G y T765C. De manera similar, en el gen *ERG11*, se detectaron 8 mutaciones silenciosas: T204C, T456G, A579C, T639C, T693A, A789G, T822C y T951C. Estos hallazgos indican la complejidad de las alteraciones genéticas en los aislamientos estudiados y su potencial impacto en los mecanismos de resistencia antifúngica.

En las levaduras sensibles, no se identificó ningún tipo de mutación en el gen *ERG3*. Sin embargo, en el gen *ERG11* se detectó una mutación con cambio de sentido, E266D, y cinco mutaciones silenciosas: A798C, T996C, C1110T, T1203C y A1440G.

Tabla 12. Mutaciones encontradas en los genes *ERG3* y *ERG11* de los aislamientos de *C. albicans* con perfil de resistencia (PR1) y en aislamientos sensibles (control negativo).

Código de Aislamiento	Gen	Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido	Tipo de mutación
Aislamientos Resistentes				
324	<i>ERG3</i>	-	T381C	MS
		-	T432C	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
369	<i>ERG3</i>	N114Y	A340T	MCS
		Y194C	A581G	MCS
		-	C306T	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
627	<i>ERG3</i>	-	C306T	MS
		-	T381C	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
947	<i>ERG3</i>	-	C306T	MS
		-	T381C	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
1138	<i>ERG3</i>	N188K	T564G	MCS
		-	T381C	MS
		-	A462G	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
		L280STOP	T839G	MSS
3172	<i>ERG3</i>	L187F	T633C	MCS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		W244G	T730G	MCS
		Y257H	T769C	MCS
		L280STOP	T839G	MSS
3227	<i>ERG3</i>	E368V	A1103T	MCS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
		-	T456G	MS
3788	<i>ERG3</i>	L193P	T578C	MCS
		L225P	T674C	MCS
		-	T390G	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS

		Y257H	T769C	MCS
		L276S	T827C	MCS
		-	T693A	MS
		-	T822C	MS
		-	T951C	MS
3820	<i>ERG3</i>	-	-	-
	<i>ERG11</i>	W244G	T730G	MCS
		A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
		L280STOP	T839G	MSS
-	T639C	MS		
3922	<i>ERG3</i>	Y139N	T415A	MCS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
		I261F	A781T	MCS
		L305P	C913T	MCS
		-	T204C	MS
		-	T693C	MS
4073	<i>ERG3</i>	-	C306T	MS
		-	T381C	MS
		-	T432C	MS
		-	C438T	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
4653	<i>ERG3</i>	-	-	-
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
5247	<i>ERG3</i>	-	-	-
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
5564	<i>ERG3</i>	L225P	T674C	MCS
		-	C306T	MS
		-	T381C	MS
		-	T765C	MS
	<i>ERG11</i>	S216L	C647T	MCS
		Y221H	A662T	MCS
		W244G	T730G	MCS
		Y257H	T769C	MCS
L280STOP	T839G	MSS		
5734	<i>ERG3</i>	-	C306T	MS
		-	T381C	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS

		Y257H	T769C	MCS
		L280STOP	T839G	MSS
		-	T693A	MS
5801	<i>ERG3</i>	F144L	T432G	MCS
		-	T306C	MS
		-	A462G	MS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
L280STOP		T839G	MSS	
6164	<i>ERG3</i>	-	-	-
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
6312	<i>ERG3</i>	K240N	A720C	MCS
	<i>ERG11</i>	A114S	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
7008	<i>ERG3</i>	-	-	-
	<i>ERG11</i>	A114H	G340T	MCS
		Y257H	T769C	MCS
		-	A579C	MS
7019	<i>ERG3</i>	Q86H	A258T	MCS
		A101D	C302A	MCS
	<i>ERG11</i>	A114H	G340T	MCS
		S222P	T664C	MCS
		Y257H	T769C	MCS
		-	A789G	MS
Aislamientos Sensibles				
3895	<i>ERG3</i>	-	-	-
	<i>ERG11</i>	E266D	C658T	MCS
		-	A798C	MS
		-	T996C	MS
		-	C1110T	MS
	-	T1203C	MS	
4121	<i>ERG3</i>	-	-	-
	<i>ERG11</i>	-	T996C	MS
		-	C1110T	MS
		-	T1203C	MS
	-	A1440G	MS	

(MS) Mutación silenciosa

(MCS) Mutación con cambio de sentido

(MSS) Mutación sin sentido

4.1.6. Frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11*

En el análisis de mutaciones del gen *ERG3*, se identificaron 11 mutaciones con cambio de sentido, de las cuales las más frecuentes fueron N188K, L193P y L225P, cada una con una frecuencia del 10 %. Las demás mutaciones (Q86H, A101D, N114Y, Y139N, F144L, L187F, K240N y E368V) tuvieron una frecuencia del 5 %. Además, se encontraron 8 mutaciones silenciosas, entre las que predominaron, C306T y T381C, ambas con una frecuencia del 35 %, mientras que T432C y A462G alcanzaron un 10 % cada una. Las mutaciones silenciosas T390G, C438T y T765C presentaron una frecuencia del 5 %.

En el caso del gen *ERG11*, se identificaron 9 mutaciones con cambio de sentido, siendo Y257H la más prevalente con una frecuencia del 100 %, seguida de A114S con un 95 % y W244G con un 15 %. Las mutaciones restantes (S216L, Y221H, S222P, I261F, L276S y L305P) presentaron una frecuencia del 5 % cada una. Además, se halló una mutación sin sentido, L280STOP, con una frecuencia del 30 %. Finalmente, se identificaron 8 mutaciones silenciosas, entre las que T693A alcanzó un 15 %, y las demás (T204C, T465G, A579C, T639C, A789G, T822C y T951C) presentaron una frecuencia del 5 % cada una; estos porcentajes pueden observarse en la Tabla 13.

Tabla 13. Frecuencias de mutaciones encontradas en los genes *ERG3* y *ERG11* de los aislamientos de *C. albicans* con perfil de resistencia (PR1)

Gen	Tipo de mutación	Características	N	%
<i>ERG3</i>	MUTACIONES CON CAMBIO DE SENTIDO	Q86H	1	5,00 %
		A101D	1	5,00 %
		N114Y	1	5,00 %
		Y139N	1	5,00 %
		F144L	1	5,00 %
		L187F	1	5,00 %
		N188K	2	10,00 %

		L193P	2	10,00 %		
		L225P	2	10,00 %		
		K240N	1	5,00 %		
		E368V	1	5,00 %		
	MUTACIONES SILENCIOSAS	C306T	7	35,00 %		
		T381C	7	35,00 %		
		T390G	1	5,00 %		
		T432C	2	10,00 %		
		C438T	1	5,00 %		
		A462G	2	10,00 %		
		T765C	1	5,00 %		
		<i>ERG11</i>	MUTACIONES CON CAMBIO DE SENTIDO	A114S	19	95,00 %
				S216L	1	5,00 %
	Y221H			1	5,00 %	
S222P	1			5,00 %		
W244G	3			15,00%		
Y257H	20			100,00 %		
I261F	1			5,00 %		
L276S	1			5,00 %		
L305P	1			5,00 %		
MUTACIONES SIN SENTIDO	L280STOP		6	30,00 %		
MUTACIONES SILENCIOSAS	T204C	1	5,00 %			
	T465G	1	5,00 %			
	A579C	1	5,00 %			
	T639C	1	5,00 %			
	T693A	3	15,00 %			
	A789G	1	5,00 %			
	T822C	1	5,00 %			
	T951C	1	5,00 %			

N: Numero de mutaciones encontradas en los genes de los aislamientos de *C. albicans* con perfil de resistencia (PR1)

%: Porcentaje de mutaciones encontradas en los genes de los aislamientos de *C. albicans* con perfil de resistencia (PR1)

4.2 Discusión

Candida es una levadura de gran relevancia en salud pública, ya que actúa como un agente infeccioso con implicancias clínicas potencialmente mortales, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (105). En Perú, los estudios sobre la multirresistencia a los antifúngicos en *Candida* spp. son limitados, y los trabajos enfocados en las mutaciones genéticas asociadas con esta resistencia son aún más escasos. En la región de Cajamarca, la información sobre los perfiles de resistencia y las mutaciones genéticas en *Candida* es especialmente exiguo. Esto genera importantes vacíos en el conocimiento, dificultando el desarrollo de tratamientos efectivos para las infecciones causadas por estas especies.

En este contexto, la presente investigación es significativa por ser la primera, tanto a nivel regional como nacional, en enfocarse en el estudio de la resistencia a antifúngicos de la familia de los azoles (imidazoles y triazoles), así como en la evaluación de la frecuencia de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* de *Candida* multirresistentes, aisladas de pacientes atendidos en diversos servicios del Hospital II EsSalud - Cajamarca. Para llevar a cabo este análisis, se emplearon procedimientos microbiológicos convencionales y técnicas moleculares avanzadas, como la PCR convencional y el secuenciamiento Sanger. Estas metodologías permitieron determinar la susceptibilidad antifúngica, identificar los perfiles de resistencia y establecer la frecuencia de mutaciones en los genes estudiados, proporcionando información crucial para el manejo clínico y el control efectivo de las infecciones causadas por *Candida* spp. en la región.

De los 204 aislamientos analizados en el presente estudio, se determinó que el 55,4 % correspondieron a *C. albicans* y el 44,6 % a *C. no albicans* (Figura 3). Estos hallazgos concuerdan parcialmente con un estudio realizado en Cajamarca, donde el 63,3 % de los aislamientos clínicos se identificaron como *C. albicans* a través de la presencia de tubo

germinativo, característico de esta especie, mientras que el 36,7 % correspondieron a *C. no albicans* (29). De manera similar, en 2017, en hospitales de Trujillo, Perú, se reportó una mayor prevalencia de *C. albicans* (64,1 %) en comparación con *C. no albicans* (33,9 %), utilizando pruebas fenotípicas como el tubo germinativo y ChromAgar *Candida* (106). En el ámbito internacional, estos resultados coinciden parcialmente con estudios realizados en México, en 2017, donde se detectó una prevalencia del 80,0 % para *C. albicans* frente a un 20,0 % de *C. no albicans* en pacientes hospitalizados con sospecha de infección fúngica. Este último trabajo incluyó tanto pruebas fenotípicas (CHROMagar *Candida*TM) como moleculares (PCR) (107). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican un aumento en la proporción de *C. no albicans* en comparación con estos estudios previos.

Este incremento en la frecuencia de *C. no albicans* encontrado en esta investigación en comparación con los estudios anteriores está alineado con las tendencias observadas en estudios internacionales recientes. Por ejemplo, en 2021, se realizó un análisis sistemático en China, abarcando un periodo de 10 años (diciembre de 2011 a diciembre de 2021), que incluyó 44 716 aislamientos de *Candida*. Este análisis mostró una distribución casi equitativa entre *C. albicans* (49,6 %) y *C. no albicans* (50,4 %), mostrando un incremento en la prevalencia de *C. no albicans* (108).

Los resultados del estudio realizado evidencia no solo la relevancia de *C. albicans* como el principal patógeno, sino también la preocupante frecuencia de *C. no albicans*. Este incremento podría estar directamente relacionado con la inadecuada identificación de las especies de *Candida* en entornos clínicos y el uso indiscriminado de antifúngicos sin un diagnóstico preciso. La falta de identificación adecuada genera tratamientos empíricos que, además de ser ineficaces en algunos casos, favorecen una adaptación selectiva que

impulsa la proliferación de especies de *C. no albicans*. Por lo tanto, es fundamental reforzar los métodos de diagnóstico e identificación específicos en los laboratorios clínicos, así como promover un uso racional de los antifúngicos, especialmente en regiones como Cajamarca, donde la información sobre estas especies es escasa.

En el presente estudio también se evaluó la susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp., encontrándose niveles alarmantes de resistencia y resistencia intermedia frente a los cuatro antifúngicos azólicos analizados: fluconazol y voriconazol (triazoles) y miconazol y clotrimazol (imidazoles). Los aislamientos presentaron resistencia al fluconazol hasta en un 34,4 % y un 17,6 % presentaron resistencia intermedia, mientras que al voriconazol hubo un 18,2 % de resistencia y un 12,7 % de resistencia intermedia. Por otro lado, frente a los imidazoles las levaduras tuvieron un comportamiento variado: frente al miconazol se presentó 13,7 % de resistencia y 20,6 % de resistencia intermedia, mientras que frente al clotrimazol se encontraron los niveles más bajos de resistencia, con solo un 0,5 % y un 9,3 % de resistencia intermedia, lo que lo posiciona como una opción terapéutica relativamente más eficaz (Tabla 9).

Los resultados obtenidos son coherentes con estudios previos realizados en diferentes regiones. En 2015 se reportó una resistencia al fluconazol del 30,4 % en *Candida* spp. aisladas de secreciones vaginales en Loja, Ecuador (109), cifra comparable con el 34,4 % encontrado en este trabajo. Además, ambos estudios coinciden en que la mayoría de los aislamientos provinieron de pacientes adultos jóvenes, representando el 53,3 % en el estudio ecuatoriano y el 60,3 % en este (pacientes entre 19 y 60 años). En Venezuela, en el año 2021, encontraron que el 32,3 % de los aislamientos de *Candida* spp. eran resistentes al fluconazol y el 19,5 % al voriconazol (110), resultados similares a los aquí reportados (34,4 % y 18,2 %, respectivamente).

Por otro lado, en 2020, en un hospital del norte de Perú, se documentó resistencia al fluconazol en un 19,56 % y al voriconazol en 21,73 % (27). Estos valores, aunque ligeramente diferentes, confirman que la resistencia a triazoles constituye un problema constante en distintos contextos geográficos nacionales. Asimismo, en Cajamarca, se reportó un 19,0 % de resistencia al fluconazol en aislamientos de *C. albicans* obtenidos en la misma institución de salud evaluada en este estudio, pero en un periodo anterior (aislados del 2021) (29). Los resultados actuales, con un 34,4 % de aislamientos resistentes al fluconazol, reflejan un incremento significativo de la resistencia en un periodo relativamente corto (2021-2022), este aumento significativo podría estar estrechamente relacionado con la deficiente identificación de las especies de *Candida*, lo que lleva a un uso indiscriminado de antifúngicos sin un diagnóstico adecuado, generando adaptabilidad a los antifúngicos.

En cuanto a los imidazoles, la resistencia al miconazol mantuvo similitud a los valores presentados por los triazoles, en cambio, frente al clotrimazol presentó bajas frecuencias. Estos hallazgos son consistentes con investigaciones previas. En 2021, se reportó que *Candida* spp. tenía una resistencia combinada del 7,2 % frente al clotrimazol, aunque también evidenció resistencia cruzada con el fluconazol (111). En 2017, también se informó que el 18,0 % de los aislamientos evaluados presentaban resistencia al clotrimazol y un 46,0 % al miconazol, lo que demuestra una variabilidad en los patrones de susceptibilidad según las especies de *Candida* (112). En América Latina, en 2016, se evaluó la actividad antifúngica de los imidazoles, específicamente clotrimazol y miconazol; los resultados mostraron que los aislamientos de *C. albicans* analizados, presentaban resistencia a estos antifúngicos en un porcentaje significativo (113). A nivel nacional, la falta de consenso sobre la resistencia a imidazoles convierte este trabajo en una referencia valiosa para entender este fenómeno.

Un hallazgo destacado del estudio fue la evidencia de multirresistencia frente a triazoles e imidazoles, identificándose que el 9,8 % de los aislamientos fueron resistentes a todos los antifúngicos azólicos evaluados (PR1), esto se puede apreciar en la Tabla 10. Este fenómeno ha sido previamente reportado por otros estudios. En Chile, en 2016, se identificó aislamientos de *Candida* spp. con resistencia simultánea al fluconazol y clotrimazol (114), mientras que, en Nicaragua, en el año 2015 se encontró que el 33,3 % de los aislamientos eran completamente resistentes a estos mismos antifúngicos (115). Durante el 2020, en Ecuador, documentaron perfiles de multirresistencia a fluconazol, voriconazol, miconazol y clotrimazol, con mayor prevalencia de resistencia a los triazoles (116).

Los resultados del presente trabajo subrayan la necesidad de implementar políticas de uso racional de antifúngicos debido a los diferentes perfiles de resistencias encontrados. La detección de un aumento significativo en la resistencia al fluconazol y voriconazol en un corto periodo de tiempo es un indicador de alerta sobre el impacto del uso descontrolado de estos medicamentos. Adicionalmente, la multirresistencia entre triazoles e imidazoles plantea un desafío relevante en la práctica clínica, al reducirse considerablemente las opciones terapéuticas disponibles. Este fenómeno plantea la necesidad de investigar los mecanismos moleculares subyacentes que contribuyen a esta resistencia cruzada.

Un mecanismo crucial en la resistencia fúngica a los antimicóticos radica en las alteraciones en la transcripción de genes relacionados con las enzimas responsables de la biosíntesis del ergosterol. En particular, las mutaciones en los genes de la familia *ERG* (como *ERG3* y *ERG11*), los cuales se han identificado como un factor relevante en el desarrollo de resistencia antifúngica. Sin embargo, estos mecanismos no han sido investigados exhaustivamente, lo que deja un vacío importante en el entendimiento de la

resistencia molecular en *Candida* spp. En el presente estudio, se realizó una búsqueda específica de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* en cepas multirresistentes a imidazoles (miconazol y clotrimazol) y triazoles (fluconazol y voriconazol). Estas cepas representaron el 9,8 % (20 aislamientos) de todos los aislados analizados, y todas fueron identificadas como *C. albicans*. Este hallazgo es de gran relevancia, ya que *C. albicans* es una de las especies más comunes y clínicamente importantes en infecciones fúngicas, lo que refuerza la necesidad de caracterizar los mecanismos moleculares asociados a su resistencia.

En el presente estudio, se identificaron diferentes tipos de mutaciones en el gen *ERG3* en los 20 aislamientos de *C. albicans* resistentes a los cuatro azoles evaluados (fluconazol, voriconazol, miconazol y clotrimazol). Las mutaciones detectadas incluyeron tanto mutaciones con cambio de sentido (que producen cambios en la secuencia de aminoácidos) como mutaciones silenciosas (que no afectan la secuencia de aminoácidos) (Tabla 12). Entre las mutaciones con cambio de sentido identificadas, se encontraron las siguientes: Q86H, A101D, N114Y, Y139N, F144L, L187F, N188K, L193P, L225P, K240N y E368V. De estas, la mutación L193P, que implica la sustitución de una leucina por una prolina en la posición 193 de la proteína, es particularmente relevante, ya que ha sido previamente reportada en estudios relacionados con la resistencia a los azoles (117–119).

La mutación L193P se identificó en 2 de los aislamientos analizados en este trabajo. Este hallazgo es consistente con estudios previos que han asociado esta mutación con resistencia a los azoles. Por ejemplo, en el año 2010, en Reino Unido, se caracterizaron mutantes del gen *ERG3* en cepas de *C. albicans* resistentes a los azoles, reportando nueve mutaciones con cambio de sentido, entre las cuales se encontraba L193P (117). De

manera similar, en Francia, en el 2012, se investigaron los mecanismos responsables de la resistencia al fluconazol en dos aislamientos de *C. albicans* y también identificaron la mutación L193P como un factor clave en la resistencia (118). Por último, en China durante el año 2017, se reportó esta misma mutación en cepas resistentes tanto a fluconazol como a voriconazol, reforzando su relevancia en el fenómeno de resistencia cruzada entre triazoles (119).

Probablemente la sustitución de leucina por prolina en la enzima C-5 desaturasa (*ERG3*) de *Candida* puede tener implicaciones importantes en la resistencia a los antifúngicos, ya que afecta su función en la biosíntesis del ergosterol, particularmente en la conversión de fecosterol a episterol, un paso clave en esta vía. La leucina, siendo un aminoácido no polar y alifático, contribuye a estabilizar la estructura de la enzima mediante interacciones hidrofóbicas, lo que facilita la flexibilidad necesaria para que la enzima funcione correctamente; en contraste, la prolina, con su cadena lateral cíclica, introduce rigidez en la estructura proteica, lo que reduce la flexibilidad del sitio activo (120). Esta rigidez puede alterar la capacidad de la enzima para interactuar adecuadamente con el sustrato y realizar su función catalítica, lo que podría afectar la conversión de fecosterol y, en consecuencia, la síntesis de ergosterol, un factor crítico para la resistencia a los antifúngicos.

También se identificaron mutaciones silenciosas (C306T, T381C, T390G, T432C, C438T, A462G y T765C) (Tabla 12), entre las cuales C306T, T381C, T432C y C438T ya han sido previamente reportadas en el gen *ERG3* de aislamientos de *C. albicans* resistentes a los azoles. Por ejemplo, en un estudio realizado en China, en el año 2019, la mutación silenciosa C306T fue detectada en casi todos los aislamientos de *C. albicans*, tanto resistentes como sensibles a los azoles (121). De manera similar, en Francia, se

identificó las mutaciones C306T, T381C, T432C y C438T en cepas tanto resistentes como sensibles, mientras que, en China, se documentó las mutaciones T381C y T432C específicamente en cepas resistentes a los azoles (122). Estos hallazgos sugieren que dichas mutaciones silenciosas no desempeñan un papel determinante en el desarrollo de la resistencia a los azoles en *C. albicans*. Aunque están presentes en aislamientos resistentes y sensibles, su impacto funcional parece ser limitado, dado que no alteran directamente la estructura ni la función de la proteína codificada por el gen *ERG3*. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que estas mutaciones contribuyan indirectamente al modificar la estabilidad del ARN mensajero o influir en la expresión génica. Las mutaciones silenciosas, aunque codifican el mismo aminoácido, no son sinónimas con respecto los potenciadores del splicing exónico (ESE) y pueden interferir con la capacidad del ESE para promover un splicing eficiente o para dirigir el splicing en el lugar correcto en la secuencia de ácido nucleico (123). Por tanto, su posible papel en la resistencia a largo plazo debe ser considerado en futuros estudios para determinar si pueden tener un impacto acumulativo o secundario en la funcionalidad del gen y su proteína.

Las mutaciones con cambio de sentido identificadas en este estudio (Q86H, A101D, N114Y, Y139N, F144L, L187F, N188K, L225P, K240N y E368V) no han sido reportadas previamente en la literatura científica. Esto podría deberse a la escasa cantidad de investigaciones enfocadas en las mutaciones específicas del gen *ERG3*, particularmente en *C. albicans*. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha provienen de regiones como Europa y Asia, lo que genera un sesgo geográfico que limita las posibilidades de comparar estos hallazgos con reportes anteriores. No obstante, esta ausencia de antecedentes también representa una oportunidad significativa para generar conocimiento referente a este gen.

Las mutaciones identificadas en este trabajo abren nuevas líneas de investigación orientadas a comprender su impacto, tanto en la diversidad y variabilidad genética del gen *ERG3* como en su relación con los mecanismos de resistencia antifúngica. Además, estos hallazgos proporcionan un punto de referencia que podría facilitar la realización de estudios futuros enfocados en establecer conjeturas más sólidas y generar datos que sean comparables en diferentes contextos geográficos, generando un enfoque más integral y general en el estudio de la resistencia antifúngica y el conocimiento sobre las mutaciones en *ERG3*.

También se llevó a cabo el secuenciamiento del gen *ERG3* en dos aislamientos sensibles a los azoles analizados. Los resultados no evidenciaron ningún tipo de mutación en estos aislamientos, lo que refuerza la relevancia de las mutaciones identificadas en las cepas resistentes. Este hallazgo sugiere que las mutaciones encontradas en las cepas resistentes podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la resistencia a los azoles, destacando la necesidad de continuar investigando su impacto funcional y su relación con los mecanismos de resistencia antifúngica.

La investigación también identificó diferentes tipos de mutaciones en el gen *ERG11* en los aislamientos que presentaban un perfil de multirresistencia a los azoles analizados. Se identificaron mutaciones de tres tipos: mutaciones con cambio de sentido, mutaciones sin sentido y mutaciones silenciosas (Tabla 12). En los 20 aislamientos multirresistentes evaluados, se detectaron al menos dos mutaciones de distinto tipo en cada uno, lo que sugiere una alta frecuencia de alteraciones genéticas en este gen en cepas resistentes. Estos hallazgos muestran la importancia de las mutaciones en *ERG11* como un posible factor clave en los mecanismos de resistencia antifúngica.

En un reciente estudio sistemático realizado en 2024, se recopiló 2 222 casos de sustituciones asociadas con resistencia a los azoles reportados en la literatura. Además, se llevaron a cabo análisis computacionales exhaustivos de las secuencias. En total, se identificaron 169 sustituciones en el gen *ERG11*, en 133 sitios de la enzima esterol 14- α -desmetilasa en siete especies del género *Candida*. Específicamente, *C. albicans* presentó 120 sustituciones distribuidas en 97 sitios distintos (124). En el presente estudio, se identificaron nueve sustituciones de aminoácidos (A114S, S216L, Y221H, S222P, W244G, Y257H, I261F, L276S y L305P) (Tabla 12), de las cuales seis ya habían sido previamente reportadas en investigaciones anteriores (A114S, Y221H, S222P, Y257H, L276S y L305P).

En el presente trabajo, se observó que la mutación con cambio de sentido Y257H (sustitución de tirosina por histidina en la posición 257) se presentó en el 100 % (20 aislamientos) de los aislamientos multirresistentes secuenciados. Asimismo, la mutación A114S (sustitución de alanina por serina en la posición 114), alcanzó el 95,0 % (19 aislamientos). En contraste, las mutaciones Y221H, S222P, L276S y L305P tuvieron una frecuencia significativamente menor, detectándose únicamente en el 5,0 % de los casos (1 aislamiento cada una) (Tabla 13). Estos hallazgos evidencian que la presencia de estas mutaciones no es excluyente, ya que en los aislamientos se encontraron de dos a más mutaciones coexistiendo simultáneamente. Esto sugiere una posible propagación entre estas variantes genéticas, que podría contribuir al perfil multirresistente observado, dentro del establecimiento analizado.

Las mutaciones con mayor prevalencia identificadas en este estudio, A114S e Y257H, han sido descritas previamente en la literatura científica. Un estudio realizado en China durante el año 2015, se analizó las mutaciones del gen *ERG11* en aislamientos de *Candida* spp. resistentes a los azoles (fluconazol, itraconazol y voriconazol). Los resultados

indicaron que la especie predominante era *C. albicans*, la cual presentaba un perfil de resistencia cruzada a los azoles evaluados. En dicho estudio se detectaron 27 mutaciones con sustitución de aminoácidos, siendo A114S e Y257H las más frecuentes. Además, se observó que estas mutaciones se presentaban simultáneamente en las cepas analizadas, reforzando su relevancia en el contexto de la resistencia antifúngica (125). Por otro lado, en China en el mismo año, se reportó estas mutaciones en aislados de cepas de *Candida* resistentes a los triazoles, destacando su alta frecuencia (126). De manera similar, en Irán, en el año 2022, se confirmó la misma tendencia, al identificar la presencia de A114S e Y257H en un gran grupo de cepas resistentes a los azoles (127).

En el contexto americano, nacional y local, la información disponible sobre mutaciones en el gen *ERG11* sigue siendo limitada, aunque los estudios existentes respaldan los datos obtenidos en esta investigación. Por ejemplo, en el año 2017, en Estados Unidos, se secuenció el gen *ERG11* de 63 aislamientos clínicos resistentes al fluconazol, de los cuales 55 presentaban al menos una mutación. En este análisis se identificaron 26 sustituciones de aminoácidos, destacando nuevamente A114S e Y257H (128).

En el ámbito nacional, en el año 2021, se evaluó la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia al fluconazol y voriconazol en *C. albicans*, encontrando que todas las cepas secuenciadas portaban la mutación Y257H (129). Por su parte, a nivel local, en Cajamarca, se analizó la frecuencia de mutaciones en *ERG11* en aislamientos resistentes al fluconazol, identificando una alta frecuencia tanto de A114S como de Y257H (29). Este último estudio, aunque en años diferentes (2021-2022), corrobora la relevancia de estas mutaciones en la población local.

En relación a las mutaciones con mayores frecuencias encontradas en el gen *ERG11*. Se puede inferir que la sustitución de tirosina por histidina en la enzima lanosterol 14- α -

desmetilasa (*ERG11*) de *Candida* podría conferir resistencia a los azoles al alterar las interacciones en el sitio activo. La tirosina, con su grupo hidroxilo y estructura aromática, facilita la unión estable con ciertos de ciertos sustratos con el sitio activo de la enzima. Al ser reemplazada por histidina, que tiene un grupo imidazol más pequeño y químicamente diferente, se debilitan estas interacciones, disminuyendo la afinidad a sustratos por la enzima codificada por el gen *ERG11* (120). Esto permite que la enzima pierda parte de su actividad catalítica y detenga su proceso de síntesis de lanosterol, generando la producción de esteroides alternativos necesarios para la supervivencia celular, incluso en presencia de antifúngicos. Este cambio adaptativo es un mecanismo clave de resistencia en *Candida*

Asimismo, en el caso de la sustitución de alanina por serina en la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa (*ERG11*) de *Candida* puede tener implicaciones importantes para la resistencia a los azoles. Probablemente, debido a la naturaleza no polar de la alanina, la cual contribuye a mantener la estructura hidrofóbica del sitio activo de la enzima. Sin embargo, al ser reemplazada por serina, que es polar, pueden formarse nuevas interacciones, como puentes de hidrógeno, o modificarse las interacciones hidrofóbicas dentro del sitio activo (120). Estos cambios estructurales podrían alterar la afinidad de la enzima por su sustrato (lanosterol) o inhibidores (como los azoles), afectando así su función y potenciando la resistencia a los antifúngicos.

En cuanto a las mutaciones Y221H, S222P, L276S y L305P, aunque no se cuenta con suficiente información que demuestre una relación directa con las mutaciones de mayor prevalencia (A114S e Y257H), su presencia en aislamientos resistentes a los azoles ha sido documentada en estudios previos.

En el caso de las mutaciones Y221H y L276S, estas fueron registradas en un estudio realizado en China, durante el año 2004, donde se analizaron aislamientos resistentes a los azoles, y se encontró dichas mutaciones, demostrando su posible implicancia en la resistencia (130). Por otro lado, en 2013, se reportó la presencia de las mutaciones Y221H, L276S y L305P en aislamientos clínicos resistentes a los azoles (131), lo que guarda similitud con los datos obtenidos en el presente estudio.

Con respecto a la mutación S222P, hasta la fecha, su única referencia en la literatura científica corresponde al estudio realizado a nivel local, Cajamarca (29). Este dato es particularmente relevante, ya que los aislamientos analizados en ese estudio provienen del mismo establecimiento que los utilizados en esta investigación, aunque en un periodo de tiempo distinto, lo que muestra la persistencia de esta mutación en dicha institución.

En cuanto a la mutación sin sentido L280STOP (Tabla 13) identificada en algunos aislamientos resistentes analizados (6; 30,0 %), representa un hallazgo relevante debido al significativo porcentaje encontrado y a la limitada información existente sobre este tipo de mutaciones en el gen *ERG11*. Las mutaciones sin sentido generan codones de terminación prematuros que interrumpen la cadena polipeptídica, afectando la funcionalidad de la proteína resultante y, potencialmente, contribuyendo a la resistencia antifúngica. Un estudio realizado en India (2019) se identificó mutaciones sin sentido en las posiciones 245 y 283 del gen *ERG11* en aislamientos de *C. albicans* resistentes a los azoles (132). Estos hallazgos confirman la posible existencia de este tipo de mutaciones en cepas resistentes y la diversidad genética del gen *ERG11*.

En relación con las mutaciones silenciosas identificadas en este estudio (T204C, T465G, A579C, T639C, T693A, A789G, T822C y T951C) (Tabla 13), solo una de ellas, T693A, ha sido previamente reportada en aislamientos resistentes a los azoles. Esta mutación

presentó una incidencia del 15,0 % (3 aislamientos) en los datos analizados, lo cual coincide con los hallazgos de un estudio realizado en 2022, en dicho estudio, llevado a cabo con aislamientos provenientes de China, se documentó la presencia de T693A en cepas de *Candida* resistentes a los azoles (133), lo que respalda la validez de los resultados obtenidos en el presente trabajo. En contraste, las demás mutaciones silenciosas encontradas en este estudio no han sido reportadas previamente en la literatura científica, lo que sugiere un vacío en el conocimiento sobre su relevancia. Si bien las mutaciones silenciosas no afectan directamente la secuencia de aminoácidos de la proteína, algunos estudios sugieren que podrían influir en la estabilidad del ARNm (123), lo que eventualmente podría impactar en la resistencia antifúngica.

En el presente estudio, el secuenciamiento del gen *ERG11* en los aislamientos sensibles, utilizados como contraste para analizar las levaduras resistentes, permitió identificar una mutación con cambio de sentido (E266D) y cinco mutaciones silenciosas (A798C, T996C, C1110T, T1203C y A1440G) (Tabla 12). Estas alteraciones han sido previamente reportadas en cepas sensibles a los azoles. La mutación E266D ha sido documentada en múltiples estudios que emplearon aislamientos sensibles como controles frente a cepas resistentes, lo que sugiere que esta mutación es característica de aislamientos sensibles y no está relacionada con la capacidad de resistencia a los azoles en *C. albicans*. En este contexto, en un estudio realizado en el año 2004, coincide con los resultados obtenidos, ya que también se identificó la misma mutación con cambio de sentido en aislamientos sensibles a los azoles (134).

La detección de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* en cepas multirresistentes de *C. albicans* tiene importantes implicaciones clínicas y terapéuticas. En primer lugar, pone de manifiesto la necesidad de desarrollar pruebas de diagnóstico molecular que permitan identificar de manera rápida y precisa estos cambios genéticos. Este tipo de herramientas

podría facilitar un manejo más personalizado y efectivo de las infecciones por *C. albicans*, especialmente en pacientes con infecciones recurrentes o resistentes a los tratamientos con antifúngicos convencionales. En segundo lugar, la comprensión de los mecanismos moleculares de resistencia es esencial para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Estas podrían incluir el desarrollo de fármacos específicos capaces de superar los efectos de las mutaciones identificadas o el uso de combinaciones terapéuticas que reduzcan la probabilidad de que surjan resistencias. Por ejemplo, la identificación de mutaciones en el presente estudio, como Y257H y A114S en el gen *ERG11*, y su alta prevalencia en las cepas resistentes subraya su relevancia como objetivos potenciales para el desarrollo de terapias.

Finalmente, este trabajo documenta un amplio espectro de mutaciones con cambio de sentido, sin sentido y silenciosas, tanto previamente reportadas como no reportadas. Estos hallazgos no solo amplían el conocimiento sobre los genes *ERG3* y *ERG11*, sino que también enfatizan la importancia de continuar investigando las variaciones genéticas en diferentes contextos geográficos y clínicos. En tal sentido, este estudio contribuye a la base de datos global sobre mutaciones asociadas con resistencia en *C. albicans*, proporcionando una referencia para futuras investigaciones y apoyando el desarrollo de estrategias más efectivas para abordar este desafío clínico. A medida que se generen más datos, será posible no solo entender mejor la distribución y frecuencia de estas mutaciones, sino también correlacionarlas con resultados clínicos específicos, fortaleciendo así el manejo y tratamiento de las infecciones por *Candida*.

CAPITULO V

5.1 Conclusiones

- De los 204 aislamientos clínicos analizados, el 55,4 % (113 aislamientos) se identificó como *C. albicans*, mientras que el 44,6 % (91 aislamientos) correspondieron a especies de *C.* no *albicans*, incluyendo *C. glabrata* (38 aislamientos), *C. parapsilosis* (24 aislamientos), *C. tropicalis* (13 aislamientos), *C. krusei* (7 aislamientos) y otras especies (9 aislamientos).
- Se determinó que el 53,4 % de los aislamientos clínicos presentó resistencia a al menos un antifúngico de la familia de los azoles. Además, el 44,1 % (90 aislamientos) mostró resistencia a dos o más antifúngicos de esta familia. Por otro lado, el 32,8 % (67 aislamientos) mostró resistencia específica a al menos un antifúngico de los grupos de triazoles o imidazoles, y un 9,8 % (20 aislamientos) exhibió un perfil de resistencia total.
- En los 20 aislamientos multirresistentes a todos los antifúngicos (PR1) se identificaron diversas mutaciones en los genes asociados a la resistencia. En el gen *ERG3* se detectaron 11 mutaciones con cambio de sentido y 7 mutaciones silenciosas. En el caso del gen *ERG11*, se detectaron 9 mutaciones con cambio de sentido. Además, se identificó una mutación sin sentido y 8 mutaciones silenciosas.

5.2 Recomendaciones

Los hallazgos revelan un panorama preocupante de resistencia antifúngica en *Candida* spp., destacando una diversidad significativa de mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11*, asociados con la resistencia a los azoles. Se recomienda priorizar estudios epidemiológicos en *C. albicans*, por su alta prevalencia y multirresistencia, así como en especies de *C. no albicans*, cuya incidencia está en aumento. Es fundamental implementar técnicas moleculares para detectar mutaciones relacionadas con la resistencia y diseñar estrategias de vigilancia, control y uso racional de antifúngicos en los hospitales. Además, se sugiere capacitar al personal de salud en diagnóstico temprano y manejo adecuado de estas infecciones, con el objetivo de mitigar su impacto en la región.

Referencias Bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [cited 2024 Dec 11]. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. Baptista M, Cunha JT, Domingues L. DNA-based approaches for dairy products authentication: A review and perspectives. *Trends Food Sci Technol*. 2021 Mar 1;109:386–97.
3. National Human Genome Research Institute Home (NHGRI). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [Internet]. [cited 2024 Dec 11]. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reacción-en-cadena-de-la-polimerasa-PCR>
4. Kantroo HA, Mubarak MM, Chowdhary R, Rai R, Ahmad Z. Antifungal Efficacy of Ultrashort β -Peptides against *Candida* Species: Mechanistic Understanding and Therapeutic Implications. *ACS Infect Dis* [Internet]. 2024 Nov 8 [cited 2024 Dec 11];10(11). doi: 10.1021/acsinfecdis.4c00476
5. Jordá T, Puig S. Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 1;11(7):1–18.
6. Lin L, Wang M, Zeng J, Mao Y, Qin R, Deng J, et al. Sequence Variation of *Candida albicans Sap2* Enhances Fungal Pathogenicity Via Complement Evasion and Macrophage M2-Like Phenotype Induction. *Advanced Science* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Dec 11];10(20):2206713. doi: 10.1002/advs.202206713
7. Carvallo P. Conceptos sobre genética humana para la comprensión e interpretación de las mutaciones en cáncer y otras patologías hereditarias. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2017 Jul 1;28(4):531–7.

8. Schrader TJ. Mutagens. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2024 Dec 11];4059–67. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00817-8
9. Brigatti KW. Introduction to concepts of genetics and genomics. Genomics of Rare Diseases: Understanding Disease Genetics Using Genomic. 2021 Jan 1;1–15.
10. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Horizonte Médico (Lima) [Internet]. 2018 Dec 31 [cited 2024 Dec 10];18(1):75–85. doi: <https://doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n1.11>
11. WHO. Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2022 [cited 2024 Dec 10]. 48 p. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363682/9789240060241-eng.pdf?sequence=>
12. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. PLoS One [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2024 Dec 10];11(1):e0146909. doi: 10.1371/journal.pone.0146909
13. Olsen Verme M, Palomino Escalante FC, Regal Ludowieg M. Candidemia en 15 hospitales de Perú 2017-2019. 2020 [cited 2024 Dec 10]. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/8470>
14. Gutiérrez Orrillo VE. Variabilidad de las infecciones del tracto urinario en pacientes atendidos en el hospital regional docente de Cajamarca durante el periodo 2016-2020 [Internet] [Tesis de Pregrado]. [Cajamarca, Perú]: Universidad Nacional De Cajamarca; 2022 [cited 2024 Dec 10].

15. Bilbao Bilbao N. Estado actual de las resistencias de *Candida* a los fármacos antifúngidos y estudio de los mecanismos implicados [Internet] [Trabajo Fin de Grado]. [España]: Universidad del País Vasco; 2018 [cited 2024 Dec 10].
16. Nagashima M, Yamagishi Y, Mikamo H. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from the patients with vaginal candidiasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2016 Feb 1;22(2):124–6.
17. Manastir L, Ergon MC, Yücesoy M. Investigation of mutations in Erg11 gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses* [Internet]. 2011 Mar [cited 2024 Dec 10];54(2):99–104. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01766.x /
18. Chew KL, Cheng JWS, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP. *ERG11* mutations are associated with high-level azole resistance in clinical *Candida tropicalis* isolates, a Singapore study. *Mycoscience*. 2017 Mar 1;58(2):111–5.
19. Majdi M, Koohpar ZK, Omran AN. Investigation of Mutations of *ERG11* Gene in Fluconazole Resistant Strains of *Candida albicans* Isolated From Patients With Vulvovaginitis in West of Mazandaran. *Iranian Journal of Medical Microbiology* [Internet]. 2019 [cited 2024 Dec 10];13(1):14–21. doi: 10.30699/ijmm.13.1.14
20. Tantivitayakul P, Lapidattanakul J, Kaypetch R, Muadcheingka T. Missense mutation in *CgPDR1* regulator associated with azole-resistant *Candida glabrata* recovered from Thai oral candidiasis patients. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2024 Dec 10];17:221–6. doi: 10.1016/j.jgar.2019.01.006
21. Dovo EE, Zohoncon TM, Tovo SF, Soubeiga ST, Kiendrebeogo IT, Yonli AT, et al. First detection of mutated *ERG11* gene in vulvovaginal *Candida albicans*

- isolates at Ouagadougou/Burkina Faso. BMC Infect Dis [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Dec 10];22(1). doi: 10.1186/s12879-022-07619-5
22. Paul S, Shaw D, Joshi H, Singh S, Chakrabarti A, Rudramurthy SM, et al. Mechanisms of azole antifungal resistance in clinical isolates of *Candida tropicalis*. PLoS One [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2024 Dec 10];17(7). doi: 10.1371/journal.pone.0269721
 23. Bilal H, Shafiq M, Hou B, Islam R, Khan MN, Khan RU, et al. Distribution and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species from mainland China: A systematic analysis. Virulence [Internet]. 2022 [cited 2024 Dec 10];13(1):1573–89.doi: 10.1080/21505594.2022.2123325
 24. Thomaz DY, de Almeida JN, Sejas ONE, Del Negro GMB, Carvalho GOMH, Gimenes VMF, et al. Environmental Clonal Spread of Azole-Resistant *Candida parapsilosis* with *Erg11*-Y132F Mutation Causing a Large Candidemia Outbreak in a Brazilian Cancer Referral Center. J Fungi (Basel) [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2024 Dec 10];7(4). doi: 10.3390/jof7040259
 25. Spettel K, Barousch W, Makristathis A, Zeller I, Nehr M, Selitsch B, et al. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. PLoS One. 2019 Jan 10;14(1):e0210397.
 26. Herreras-Gomez L, Cárdenas-López V. Perfil de resistencia antifúngica en el tratamiento de candidiasis vaginal: Un diagnóstico de agentes etiológicos. Revista Habanera de Ciencias Médicas [Internet]. 2022 Apr [cited 2024 Dec 10];2(2). <https://revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4241>
 27. Vásquez-Zamora KG, Villalobos-Barboza K, Vergara Espinoza MA, Ventura-Flores R, Silva-Díaz H, Vásquez-Zamora KG, et al. Frecuencia y susceptibilidad

- antifúngica de *Candida* spp. (no *C. albicans*) aislada de pacientes de unidades de cuidados críticos de un hospital de tercer nivel del norte del Perú. *Horizonte Médico* (Lima) [Internet]. 2020 Dec 28 [cited 2024 Dec 10];20(4):e1230. doi: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2020.v20n4.06>
28. Ponce Medina AJ. 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 [Internet] [Tesis de Maestría]. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2022 [cited 2024 Dec 10].
 29. Carbonell Vigo MO. Frecuencia de mutaciones del gen ERG11 en *Candida albicans* resistentes al fluconazol, procedentes del Hospital II EsSalud de Cajamarca. [Internet] [Tesis de Pregrado]. [Cajamarca, Perú]: Universidad Nacional de Cajamarca, 2023 Feb 22 [cited 2024 Dec 10]
 30. Quintana SMC, Sjostrom PD, Baldeón GM, Socarrás DA, Paz MC, Molina AH. Genoma de *Candida albicans* y resistencia a las drogas. *Revista Científica Salud Uninorte* [Internet]. 2017 Mar 27 [cited 2024 Dec 10];33(3):438–50. doi: <http://dx.doi.org/10.14482/sun.33.3.10932>
 31. Salas I, García J, Miranda K. Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*. *Rev Costarric Cienc Med* [Internet]. 2000 [cited 2024 Dec 11];21(1–2):43–9. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482000000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
 32. Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pinteá-Simon IA, Man A. *Candida* and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Dec 11];8(6):857. doi: [10.3390/microorganisms8060857](https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857)

33. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Estándares para el diagnóstico de las infecciones fúngicas: identificación y sensibilidad de los aislamientos. 2019.
34. Cardenas HJM. Identificación de *Candida* en cavidad bucal de pacientes con diabétes y VIH/SIDA. Revista Estomatología [Internet]. 2022 Feb 7 [cited 2024 Dec 10];30(1):29–345. doi: 10.25100/re.v30i1.9305
35. Feng Z, Lu H, Jiang Y. Promising immunotherapeutic targets for treating candidiasis. Front Cell Infect Microbiol. 2022Feb9;14:1339501.doi: 10.3389/fcimb.2024.1339501
36. Arya N. R., Naureen B. Rafiq. Candidiasis. European Handbook of Dermatological Treatment [Internet]. 2023 May 29 [cited 2024 Dec 10];131–6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560624/>
37. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. Lancet Infect Dis. 2024 Jul;24(7):e428–38. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8
38. Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. J Fungi (Basel) [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Dec 10];6(1). doi: 10.3390/jof6010027
39. Navarro Rodríguez P. Mecanismos de resistencia a azoles en especies de *Candida* no *albicans* [Internet] [Tesis Doctoral]. TDX (Tesis Doctorals). [Xarxa, España]: Universitat Rovira i Virgili; 2019 [cited 2024 Dec 10].
40. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. International Journal of Infectious Diseases. 2010 Nov 1;14(11):e954–66. doi: 10.1016/j.ijid.2010.04.006

41. Paucar-Miranda CJ, Sandoval-Ahumada RE, López-Martínez RL, Terrel-Gutierrez L, Zurita-Macalapu S, Urcia-Ausejo F, et al. Primer reporte de *Candida auris* en Perú. Anales de la Facultad de Medicina [Internet]. 2021 [cited 2024 Dec 10];82(1):56–61. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v82i1.20739>
42. Cai W, Ruan Q, Li J, Lin L, Xi L, Sun J, et al. Fungal Spectrum and Susceptibility Against Nine Antifungal Agents in 525 Deep Fungal Infected Cases. Infect Drug Resist. 2023;16:4687–96. doi: 10.2147/IDR.S403863
43. Fallah B, Shams-Ghahfarokhi M, Salehi M. Identification of *Candida* Species Associated with Blood Infection by Multiplex PCR and Phenotypic Characteristics. 2023. Doi: 10.22037/amls.v9.38406
44. Lüthje P, Pranada AB, Carruthers-Lay D, Desjardins M, Gaillot O, Wareham D, et al. Identification of microorganisms grown on chromogenic media by MALDI-TOF MS. J Microbiol Methods. 2017 May 1;136:17–20. doi: 10.1016/j.mimet.2017.03.001
45. Gutiérrez Vásquez E. Caracterización genética mediante secuenciación de siguiente generación de *Candida auris* aislada de infecciones invasivas en hospitales de Bogotá [Internet] [Tesis de Maestría]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2022 [cited 2024 Dec 10].
46. Cartón Herrán JD. Actividad antifúngica de la combinación de fluconazol con otros fármacos: un enfoque terapéutico alternativo de las candidiasis [Internet] [Tesis Doctoral]. [España]: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea; 2018 [cited 2024 Dec 10].
47. Reales-Calderón JA, Molero G, Gil C, Martínez JL. The fungal resistome: a risk and an opportunity for the development of novel antifungal therapies. Future Med

- Chem [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2024 Dec 10];8(12):1503–20. doi: 10.4155/fmc-2016-0051
48. Tapia C. Antifúngicos y resistencia. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2012 Jun [citado 2024 Dec 10] ; 29(3): 357-357. doi: 10.4067/S0716-10182012000300020
49. Czajka KM, Venkataraman K, Brabant-Kirwan D, Santi SA, Verschoor C, Appanna VD, et al. Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. Cells 2023, Vol 12, Page 2655 [Internet]. 2023 Nov 19 [cited 2025 Jan 5];12(22):2655. doi: 10.3390/cells12222655
50. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2024 Dec 11];47(8):2404–12. doi: 10.1128/AAC.47.8.2404-2412.2003
51. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2024 Dec 11];58(S2):2–13. doi: 10.1111/myc.12330
52. Santos GC de O, Vasconcelos CC, Lopes AJO, Cartágenes M do S de S, Filho AKDB, do Nascimento FRF, et al. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. Front Microbiol [Internet]. 2018 Jul 3 [cited 2024 Dec 11];9(JUL):1351. doi: 10.3389/fmicb.2018.01351
53. Figueroa Tataje JJ. Frecuencia de *Candida* spp colonizantes resistentes a Azoles aisladas de pacientes hospitalizados en una Unidad de Cuidados Críticos, Lima,

- Perú [Internet] [Tesis de Pregrado]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2019 [cited 2024 Dec 10].
54. Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric on *Aspergillus flavus*. Food Chem. 2017 Apr;220:1–8. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.179
 55. Náhlík J, Hrnčířík P, Mareš J, Rychtera M, Kent CA. Towards the design of an optimal strategy for the production of ergosterol from *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. Biotechnol Prog. 2017 May 1;33(3):838–48. doi: 10.1002/btpr.2436
 56. Bhattacharya S. Ergosterol Synthesis. Encyclopedia of Mycology: Volume 1,2. 2021 Jan 1;1:V1-230-V1-238.
 57. Wriessnegger T, Pichler H. Yeast metabolic engineering – Targeting sterol metabolism and terpenoid formation. Prog Lipid Res. 2013 Jul 1;52(3):277–93. doi: 10.1016/j.plipres.2013.03.001
 58. Paramasivan K, Mutturi S. Recent advances in the microbial production of squalene. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2022 38:5 [Internet]. 2022 Apr 15 [cited 2024 Dec 11];38(5):1–21. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03273-w>
 59. Parks LW, Smith SJ, Crowley JH. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast—A review. Lipids [Internet]. 1995 Mar 1 [cited 2024 Dec 11];30(3):227–30. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02537825>
 60. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida*

- Species. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Jan 12 [cited 2024 Dec 11];7(JAN). doi: 10.3389/fmicb.2016.02173
61. Yassin MT, Mostafa AA, Al-Askar AA, Bdeer R. In vitro antifungal resistance profile of *Candida* strains isolated from Saudi women suffering from vulvovaginitis. *Eur J Med Res* [Internet]. 2020 Jan 4 [cited 2024 Dec 11];25(1):1–9. doi: <https://doi.org/10.1186/s40001-019-0399-0>
62. Giusiano G, Rojas F, Toma-Vanacore S, Mangiaterra M. Frecuencia y perfil antifúngico de especies de *Candida* spp. aisladas de exudados vaginales de niñas premenárquicas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Aug;27(7):428. doi:10.1016/j.eimc.2008.07.009
63. Méndez J, Herrera ML. Métodos de susceptibilidad antifúngica: revisión metodológica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños* [Internet]. 2001 [cited 2024 Dec 10];36(1–2):37–44.
64. Castro Méndez C, García Sánchez E, Martín-Mazuelos E. Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Dec 10];37:32–9. doi: 10.1016/j.eimc.2019.12.012
65. Procop GW, Dufresne PJ, Berkow E, Cullen SK, Fuller J, Hanson K, et al. Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing. 4th edition. Vol. 8. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
66. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, et al. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the antifungal

- susceptibility testing subcommittee of the european committee on antimicrobial susceptibility testing (AFST-EU. Clin Microbiol Infect. 2003 Jun 1;9(6):467–74.
67. Arendrup MC, Guinea J, Meletiadis J. Twenty Years in EUCAST Anti-Fungal Susceptibility Testing: Progress & Remaining Challenges. Mycopathologia [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2024 Dec 10];189(4):1–13. doi: <https://doi.org/10.1007/s11046-024-00861-2>
 68. Maldonado I, Fernandez L, Vivot W, Domecq P, Davel G, Cordova S. Evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad in vitro de especies de *Candida* a los antifúngicos. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2011;43(2):120–6. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213019228010>
 69. Ochiuzzi ME, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Soloaga R. Evaluación de las tarjetas AST-YSO1 del sistema Vitek 2 para determinar la sensibilidad a antifúngicos de levaduras del género *Candida*. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2014 [cited 2024 Dec 10];46(2):111–8. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70058-6
 70. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. Chem Rev [Internet]. 2020 Mar 24 [cited 2024 Dec 10];121(6):3390. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199
 71. Ksiezopolska E, Schikora-Tamarit MÀ, Beyer R, Nunez-Rodriguez JC, Schüller C, Gabaldón T. Narrow mutational signatures drive acquisition of multidrug resistance in the fungal pathogen *Candida glabrata*. Curr Biol [Internet]. 2021 Dec 6 [cited 2024 Dec 10];31(23):5314–5326.e10. doi: 10.1016/j.cub.2021.09.084.
 72. Liu JY, Shi C, Wang Y, Li WJ, Zhao Y, Xiang MJ. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. Res Microbiol

- [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2024 Dec 10];166(3):153–61. doi: 10.1016/j.resmic.2015.02.009.
73. Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: Deciphering the mechanisms governing multidrug resistance in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr Biol* [Internet]. 2021 Dec 6 [cited 2024 Dec 10];31(23):R1520–3. doi: 10.1016/j.cub.2021.09.071.
74. Fuentes M, Hermosilla G, Alburquenque C, Falconer MA, Amaro J, Tapia C. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. *Revista chilena de infectología* [Internet]. 2014 [cited 2024 Dec 11];31(5):511–7. doi: 10.4067/S0716-10182014000500001
75. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE, López-Ávila K, et al. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Revista biomédica* [Internet]. 2016 Sep 5 [cited 2024 Dec 11];27(3):127–36. doi: 10.32776/revbiomed.v27i3.541
76. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019 Jul 1;25(7):792–8. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.028.
77. Branco J, Fonseca E, Gomes NC, Martins-Cruz C, Silva AP, Silva-Dias A, et al. Impact of *ERG3* mutations and expression of ergosterol genes controlled by *UPC2* and *NDT80* in *Candida parapsilosis* azole resistance. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2024 Dec 10];23(8):575.e1-575.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2017.02.002.
78. Hirayama T, Miyazaki T, Sumiyoshi M, Ashizawa N, Takazono T, Yamamoto K, et al. *ERG3*-Encoding Sterol C5,6-DESATURASE in *Candida albicans* Is

- Required for Virulence in an Enterically Infected Invasive Candidiasis Mouse Model. *Pathogens* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Dec 10];10(1):1–9. doi: 10.3390/pathogens10010023.
79. Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE. Mode of Action and Resistance to Azole Antifungals Associated with the Formation of 14 α -Methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Feb 27;207(3):910–5. doi: 10.1006/bbrc.1995.1272.
80. Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1999 Nov 1 [cited 2024 Dec 11];180(2):171–5. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08792.x
81. Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, Forche A, Berman J. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, *ERG11* and *TAC1*. *Mol Microbiol* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2024 Dec 11];68(3):624–41. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06176.x
82. Selmecki A, Forche A, Berman J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science (1979)* [Internet]. 2006 Jul 21 [cited 2024 Dec 11];313(5785):367–70. doi: 10.1126/science.1128242
83. Aguirre IA. Diagnóstico molecular de especies de *Candida* y otras levaduras. Identificación de mutaciones en los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2* en relación con la sensibilidad reducida a azoles, y equinocandinas en el gen *FKS* [Internet] [Trabajo Fin de Grado]. [España]: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea; 2018 [cited 2024 Dec 10].

84. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1977 [cited 2024 Dec 17];74(12):5463. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
85. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. J Vet Diagn Invest [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 Dec 17];32(6):767. doi: 10.1177/1040638720905833
86. Mendoza M. Importancia de la identificación de levaduras. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología [Internet]. 2005 [cited 2024 Dec 10];25(1):15–23.
87. Rojas-Rodríguez A, Rodríguez-Castillejos G, Horta-Rodríguez C, Zapata-Serna Y, Tovar-Aguirre OL, Issel Acost R, et al. Resistencia a agentes antimicóticos en *Candida albicans*: análisis bibliométrico de la literatura científica. Redalyc. 2022 Apr 29;47(4):138–44.
88. CHROMagar™ *Candida* Plus - Chromagar [Internet]. [cited 2024 Dec 11]. <https://www.chromagar.com/es/product/chromagar-candida-plus/>
89. Zurita Macalupú SR, Urcia Ausejo FC. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. Repositorio Institucional - INS [Internet]. 2017 [cited 2024 Dec 10];139.
90. Hernández-Botero JS, Cárdenas JEP. Identificación de *Candida glabrata* y otras especies comunes del género *Candida* mediante el uso secuencial del medio de cultivo cromógeno y la prueba del tubo germinal. Iatreia [Internet]. 2015 [cited 2024 Dec 10];28(4):355–67.

91. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas [Internet]. 2007.
92. Moreno X, Ventura M, Panizo MM, Garcés MF. Evaluación de la formación de biopelículas en aislamientos bacterianos y fúngicos por el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y el cualitativo de agar con rojo Congo. *Biomédica* [Internet]. 2023 [cited 2024 Dec 13];43(Suppl 1):77. doi: 10.7705/biomedica.6732
93. 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* [Internet]. 2000 Apr [cited 2024 Dec 10];36(4):215–23. doi: 10.1016/s0732-8893(99)00152-2.
94. BIO-RAD. Estudio de la sensibilidad de los hongos a los antifúngicos. USA; 2014.p.3
95. ROSCO DIAGNOSTICA. Susceptibility testing of yeasts 2011. Dinamarca; 2011.p.4
96. Pinoncely N. Prevalencia de la resistencia a antifúngicos y de mutaciones en genes asociados en especies de *Candida* aisladas de pacientes ginecológicas [Internet] [Tesis de Pregrado]. [México]: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada; 2010 [cited 2024 Dec 11].
97. Sambrook J., Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition [Internet]. [cited 2024 Dec 11].

98. Mushi MF, Okamo B, Majinge DC, Gross U, Bader O, Mshana SE. Diversity of the diploid sequence type of *Candida albicans* clinical isolates from a tertiary-care hospital in Mwanza, Tanzania. *New Microbes New Infect* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2024 Dec 11];37:100731. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100731
99. Feng W, Yang J, Xi Z, Ji Y, Zhu X, Yang L, et al. Regulatory Role of *ERG3* and *Efg1* in Azoles-Resistant Strains of *Candida albicans* Isolated from Patients Diagnosed with Vulvovaginal Candidiasis. *Indian J Microbiol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2024 Dec 11];59(4):514. doi: 10.1007/s12088-019-00833-x
100. Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2024 Dec 11];53(2):217–24. doi: 10.1093/jac/dkh040
101. Osman Mohamed A, Suliman Mohamed M, Abdelrahman Hussain M, Fatahalrahman Ahmed I. Detection of antifungal drug-resistant and *ERG11* gene mutations among clinical isolates of *Candida* species isolated from Khartoum, Sudan. [Internet]. 2021 [cited 2024 Dec 11];9:1050. doi: 10.12688/f1000research.24854.2
102. Chromas | Technelysium Pty Ltd [Internet]. [cited 2024 Dec 11]. <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>
103. Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, Stockinger H, Ioannidis V, Durinx C. Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jul 2;49(W1):W216–27.

104. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 Feb 27 [cited 2024 Dec 11];30(22):3276–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btu531.
105. Kalkanlı N, Atmaca S, Özcan N. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Isolated to Clinical Samples. *Hamidiye Medical Journal* [Internet]. 2024 Sep 26 [cited 2024 Dec 12];148–56. doi: 10.4274/hamidiyemedj.galenos.2024.82713
106. Muñoz E, Chavez M. Distribución anatómica y susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* aislados de pacientes en tres hospitales de la ciudad de Trujillo, Perú. *Revista Ciencia y Tecnología*. 2017;13(3):69–78. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/1878>
107. Camacho-Cardoso JL, Martínez-Rivera MÁ, Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F. Detección molecular de especies de *Candida* en especímenes de pacientes hospitalizados. *Gac Med Mex*. 2017;153(5):581–9.
108. Bilal H, Shafiq M, Hou B, Islam R, Khan MN, Khan RU, et al. Distribution and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species from mainland China: A systematic analysis. *Virulence* [Internet]. 2022 [cited 2024 Dec 10];13(1):1573. doi: 10.1080/21505594.2022.2123325
109. Chillogallo Granda CS. Especies de *Candida* y su resistencia a fluconazol en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas atendidas en el Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Loja [Internet] [Tesis de Pregrado]. [Ecuador]: Universidad Nacional de Loja; 2015 [cited 2024 Dec 10].
110. Cermeño J, Rodríguez J, Rondón M. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de *Candida* spp., en mucosa oral de pacientes con VIH. *Revista Multidisciplinaria del*

- Consejo de Investigación [Internet]. 2021 [cited 2024 Dec 10];33(236):1315–0162.
111. Frej-Madrzak M, Golec S, Włodarczyk K, Choroszy-Król I, Nawrot U. Susceptibility to clotrimazole of *Candida* spp. Isolated from the genitourinary system—a single center study. *Pathogens*. 2021 Sep 1;10(9).
 112. Khadka S, Sherchand JB, Pokhrel BM, Parajuli K, Mishra SK, Sharma S, et al. Isolation, speciation and antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from various clinical specimens at a tertiary care hospital, Nepal. *BMC Res Notes*. 2017 Jun 24;10(1).
 113. Nogueira De Castro IM, Alexandre De Vasconcelos Júnior A, Cunha FA. Activity comparison of imidazole and triazole antifungals against *Candida albicans*. Vol. 48. 2016.
 114. Diaz MC, Araya I. Identification and in vitro antifungal susceptibility of vaginal *Candida* spp. isolates to fluconazole, clotrimazole and nystatin [Internet]. 2016 May.
 115. Suarez A, Castillo I, Octavio L. Perfil de resistencia micótica de *Candida* sp. al clotrimazol, fluconazol y nistatina en mujeres durante la segunda mitad del embarazo con candidiasis vulvo-vaginal atendidas en el hospital L. F. M. en el período de Octubre-Noviembre de 2015 [Internet]. [Nicaragua]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2015 [cited 2024 Dec 9].
 116. Ávila Tandazo MK, Villacís Villacís AG, Silverio C. Evaluación de susceptibilidad en *Candida* spp por colorimetría obtenida en gestantes de un hospital obstétrico. *Revista Vive*. 2021 Mar 26;3(9):227–46.

117. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrillow AGS, et al. Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4527–33.
118. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegéville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol 5,6-desaturase (*Erg3*) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012 Sep 1;67(9):2131–8.
119. Fu Wanrui. The Research Progress on Occurrence of *Candida* Drug Resistance. *Adv Microbiol*. 2017;06(04):98–107.
120. Blanco A, Blanco G. *Química Biológica* [Internet]. 11th ed. El Ateneo, editor. 2023 [cited 2025 Jan 6]. 760 p.
121. Feng W, Yang J, Xi Z, Ji Y, Zhu X, Yang L, et al. Regulatory Role of *ERG3* and *Efg1* in Azoles-Resistant Strains of *Candida albicans* Isolated from Patients Diagnosed with Vulvovaginal Candidiasis. *Indian J Microbiol*. 2019 Dec 1;59(4):514–24.
122. Garnaud C. Tolérance et résistance aux antifongiques chez *Candida* spp.: caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques. [Internet] [Grade Docteur] [France]: Université Grenoble Alpes; 2017 [cited 2024 Dec 9].
123. Brigatti KW. Introduction to concepts of genetics and genomics. *Genomics of Rare Diseases: Understanding Disease Genetics Using Genomic Approaches*. 2021 Jan 1;1–15.

124. Prasad Rao RS, Pinto L, Shastry RP, Dakal TC, Suravajhala PN, Sashindran VK, et al. Azole resistance: Patterns of amino acid substitutions in *Candida* sterol 14 α -demethylase [Internet]. 2024. doi:10.1101/2024.07.04.602050
125. Wang B, Huang LH, Zhao JX, Wei M, Fang H, Wang DY, et al. *ERG11* mutations associated with azole resistance in *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidosis patients. Asian Pac J Trop Biomed. 2015;5(11):909–14. doi:10.1016/j.apjtb.2015.08.002
126. Hu L, Du X, Song Y, Li M, Zai S, Hu X, et al. Genetic and phenotypic characterization of *Candida albicans* strains isolated from infectious disease patients in Shanghai. J Med Microbiol. 2015 Jan 1;64(1):74–83. doi:10.1099/jmm.0.080200-0
127. Jahanshiri Z, Manifar S, Arastehnazari F, Hatami F, Lotfali E. Azole Resistance in *Candida albicans* Isolates from Oropharyngeal Candidiasis is Associated with *ERG11* Mutation and Efflux Overexpression. Jundishapur J Microbiol. 2022 Sep 1;15(9). doi:10.5812/jjm-131046
128. Flowers SA, Colón B, Whaley SG, Schuler MA, David Rogers P. Contribution of clinically derived mutations in *ERG11* to azole resistance in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jan 1;59(1):450–60. doi:10.1128/AAC.03470-14
129. Ponce-Medina AJ, Inostroza-Ruiz LA. 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. Cienc Invest. 2021 Dec 31;24(1):39–45.

130. Lee MK. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004 Jan 16;53(2):217–24. doi: 10.1093/jac/dkh040
131. Ying Y, Zhao Y, Hu X, Cai Z, Liu X, Jin G, et al. In vitro fluconazole susceptibility of 1 903 clinical isolates of *Candida albicans* and the identification of *ERG11* mutations. *Microbial Drug Resistance*. 2013 Aug 1;19(4):266–73. doi: 10.1089/mdr.2012.0204
132. Paul S, Kannan I, Mohanram K. Extensive *ERG11* mutations associated with fluconazole-resistant *Candida albicans* isolated from HIV-infected patients. *Curr Med Mycol*. 2019;5(3):1–6. doi: 10.18502/cmm.5.3.1739
133. Odiba AS, Durojaye OA, Ezeonu IM, Mgbeahuruike AC, Nwanguma BC. A New Variant of Mutational and Polymorphic Signatures in the *ERG11* Gene of Fluconazole-Resistant *Candida albicans*. *Infect Drug Resist*. 2022;15:3111–33. doi: 10.2147/IDR.S360973
134. Kamai Y, Maebashi K, Kudoh M, Makimura K, Naka W, Uchida K, et al. Characterization of mechanisms of fluconazole resistance in a *Candida albicans* isolate from a Japanese patient with chronic mucocutaneous candidiasis. *Microbiol Immunol*. 2004;48(12):937–43. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03623.x

APÉNDICES

Apéndice 1.

SOLICITUD: Permiso de traslado de aislamientos

Dr. Víctor Daniel Cieza Mestanza

Encargado del Área de Patología Clínica del Hospital II – EsSalud Cajamarca

Yo Andy Michell Ortiz Quiroz, identificado con DNI N° 75469197, estudiante de la Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología de la Universidad Nacional de Cajamarca, ante usted respetuosamente me presento y expongo:


Que habiendo dialogado con el encargado del Área de Patología Clínica del Hospital II – EsSalud Cajamarca, solicito que me brinde el permiso necesario para poder trabajar, trasladar y manipular los aislamientos clínicos de pacientes atendidos en el Área De Microbiología Clínica; lo cual será solo para uso académico (Trabajo de Tesis) sin otro beneficio.

Por lo expuesto ruego a usted acceder a mi solicitud.

Cajamarca, 14 de noviembre del 2022

Atentamente,

|


Dr. Víctor D. Cieza Mestanza
Especialista en Patología Clínica
Cajamarca, 14 de noviembre del 2022
Cieza Mestanza, Víctor Daniel
(Representante de la Institución)

Apéndice 2.

FICHA DE REGISTRO DE DATOS sobre aislamientos cepas de *Candida spp*

N°

N°	Código	Numero de solicitud	Fecha de toma de muestra	Tipo de muestra	Servicio hospitalario	Sexo del paciente	Edad

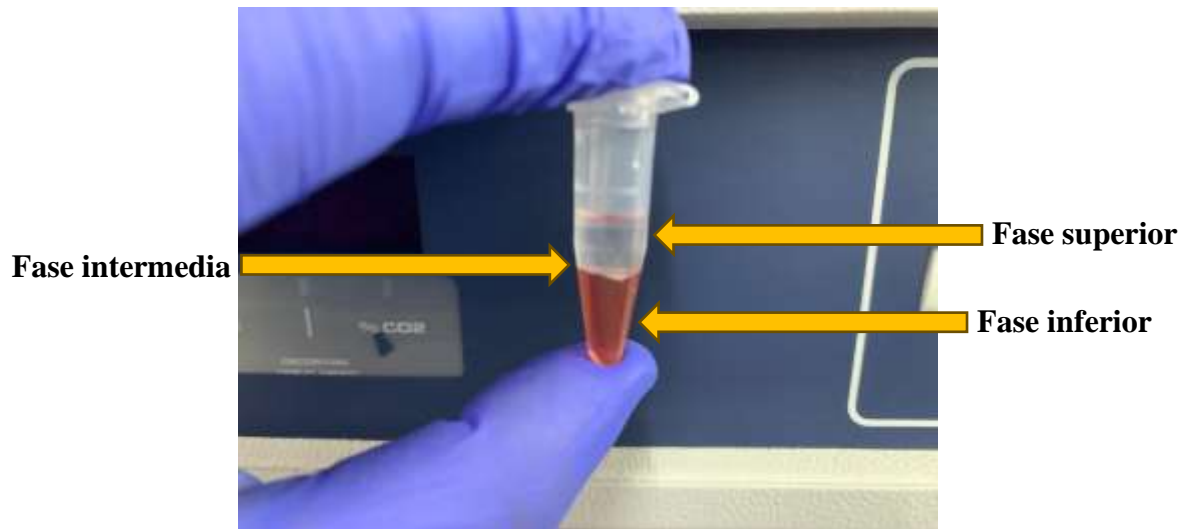
Apéndice 3

FICHA DE REGISTRO DE DATOS sobre el
análisis microbiológico de los aislamientos de las cepas de *Candida* spp

N°

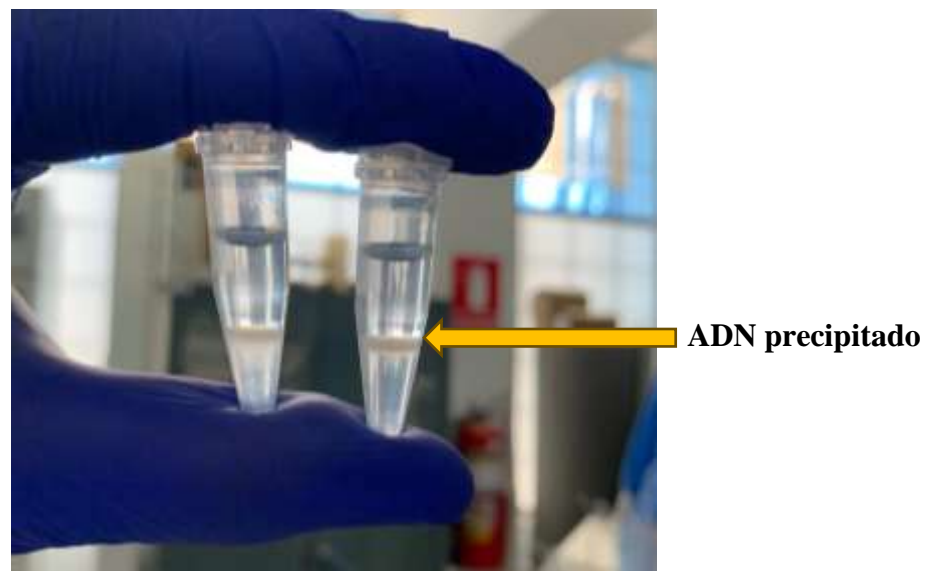
N°	Código	Tipo de muestra	Análisis microbiológico					
			Agar Sabouraud	Examen KOH	Tubo germinal	ChromAgar <i>Candida</i>	Formación de velo	Prueba opacidad
			Colonia Tiempo Cr.: Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Otros:			Tiempo Cr.: Color: Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Otros:	C. T.	C.D.
			Colonia Tiempo Cr.: Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Otros:			Tiempo Cr.: Color: Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Otros:	C. T.	C.D.
			Colonia Tiempo Cr.: Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Otros:			Tiempo Cr.: Color: Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Otros:	C. T.	C.D.
			Colonia Tiempo Cr.: Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Otros:			Tiempo Cr.: Color: Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Otros:	C. T.	C.D.

Apéndice 4. Separación de fases por el método de extracción Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico.

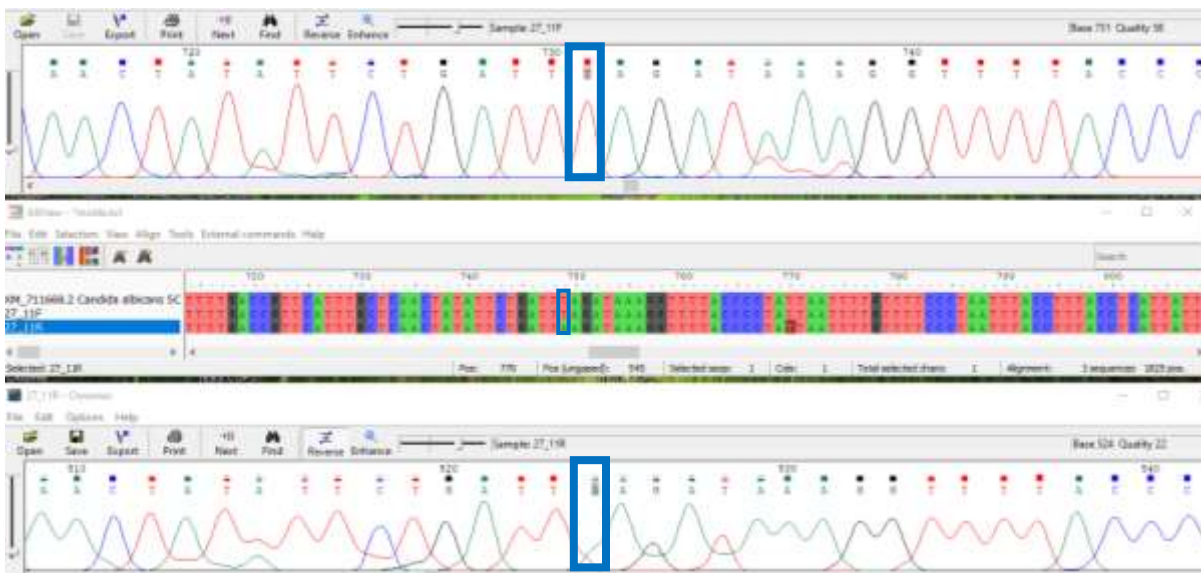


En el tubo deben separarse dos fases y formar una interfase que los divide. La fase acuosa superior contiene el ADN, mientras que las proteínas se encuentran en la fase hidrofóbica inferior.

Apéndice 5. Precipitación del ADN extraído



Apéndice 6. Revisión y edición del cromatograma de los productos secuenciados.



Revisión: En el cromatograma se analizan los nucleótidos (picos y calidad) tanto en las secuencias forward como reverse. En caso de encontrar discrepancias, se verifica la alineación en Aliview.



Edición: Cuando se identifican diferencias, se prioriza el nucleótido de la secuencia molde considerando la calidad de los picos. Se reemplaza el nucleótido por aquel con mejor calidad.



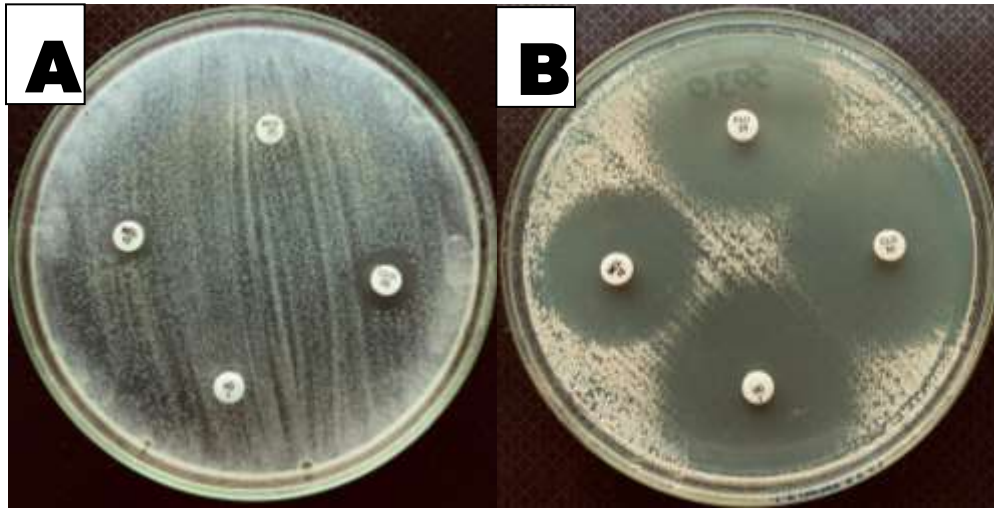
Por ejemplo, en la primera parte, los nucleótidos T (secuencia Forward) y A (secuencia Reverse) presentan calidades de 58 y 22, respectivamente. Además, en el cromatograma, el nucleótido T muestra un pico más definido. De manera similar, en la alineación de la secuencia molde con las secuencias Forward y Reverse, se observa que en la posición donde ocurre la variación, el nucleótido original es T. Por lo tanto, en la segunda parte, se reemplaza el nucleótido A por T.

Apéndice 7. Obtención de secuencia consenso en base de las secuencias Forward y Reverse.



Después de revisar y editar las secuencias utilizando el cromatograma y la alineación en Aliview, se completaron los extremos de cada secuencia, tanto para la secuencia Forward como para la Reverse, asegurando su concordancia con la secuencia de la base de datos. Este proceso permitió obtener secuencias idénticas y generar la secuencia consenso, la cual será utilizada en los análisis bioinformáticos posteriores.

Apéndice 8. Método de difusión en disco para evaluar la sensibilidad a antifúngicos: triazoles (fluconazol y voriconazol) e imidazoles (miconazol y clotrimazol).

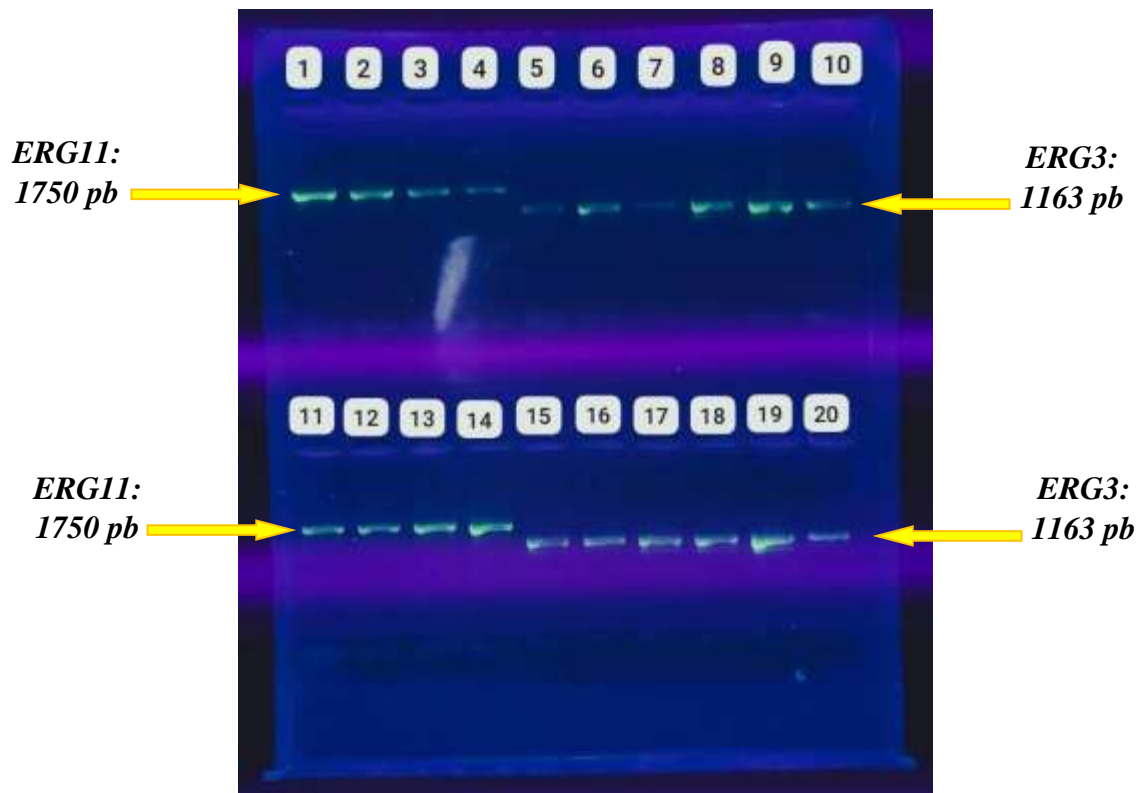


Se evalúa la sensibilidad antifúngica de los aislamientos mediante el método de difusión en disco. En la placa (A), el aislamiento analizado muestra resistencia a todos los antifúngicos: no se observa halo de inhibición para fluconazol ni voriconazol, y los halos correspondientes a miconazol y clotrimazol son pequeños y poco definidos. En contraste, en la placa (B), el aislamiento presenta sensibilidad total a los antifúngicos evaluados, evidenciada por halos de inhibición amplios y bien definidos, lo que indica una alta eficacia de estos compuestos frente al aislamiento.

Apéndice 9. Cuantificaciones y calidad de las muestras de ADN extraído de las cepas de *C. albicans* con un perfil de resistencia a todos los azoles (PR1) y perfil de sensibilidad.

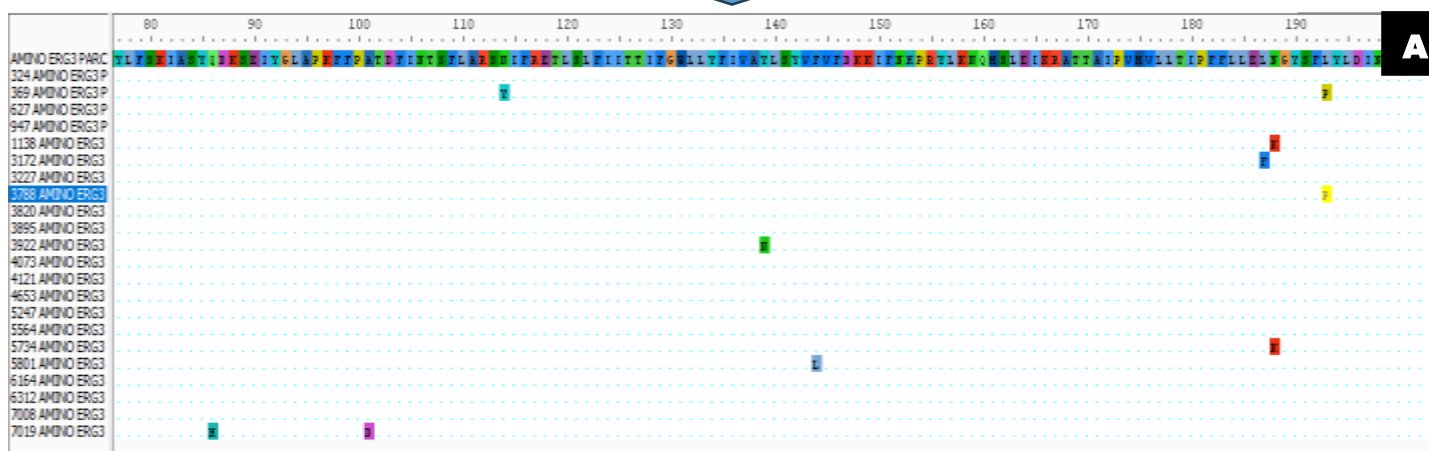
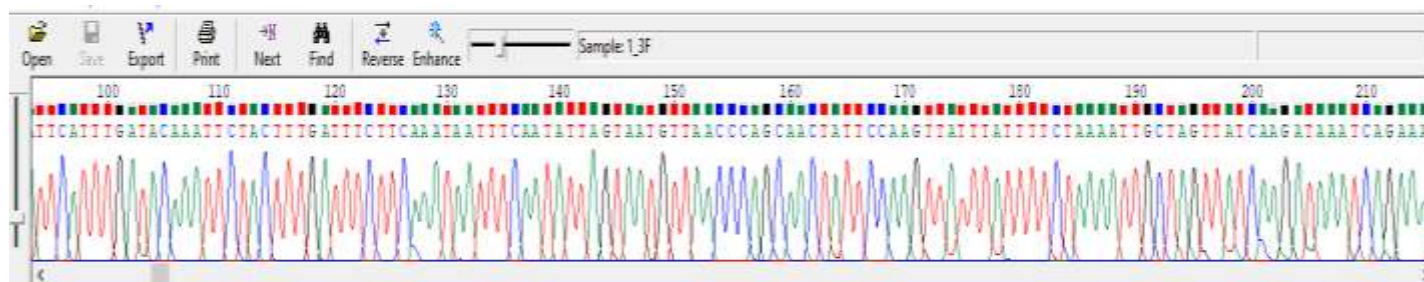
Aislamientos resistentes (PR1)			
Aislamiento	Cantidad de ADN	Relación	
	ng/ul	260/280	260/230
324	126.80	2.07	2.13
369	139.00	2.08	2.19
627	121.00	2.01	2.10
947	111.90	2.00	2.14
1138	116.10	2.08	2.15
3172	101.90	2.00	2.12
3227	141.80	2.09	2.19
3788	154.20	2.07	2.17
3820	121.70	1.96	2.04
2922	151.50	2.03	2.15
4073	141.70	2.06	2.16
4653	143.60	2.08	2.19
5247	158.90	2.09	2.18
5564	155.50	1.97	2.15
5734	154.10	2.04	2.18
5801	137.20	1.96	2.05
6164	139.20	1.93	2.03
6312	153.90	2.02	2.11
7008	148.10	2.00	2.10
7019	145.30	1.96	2.03
Aislamientos sensibles (controles)			
3895	133.60	2.05	2.17
4121	144.40	2.09	2.19

Apéndice 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados del PR1 mediante PCR convencional para los genes *ERG3* y *ERG11*.



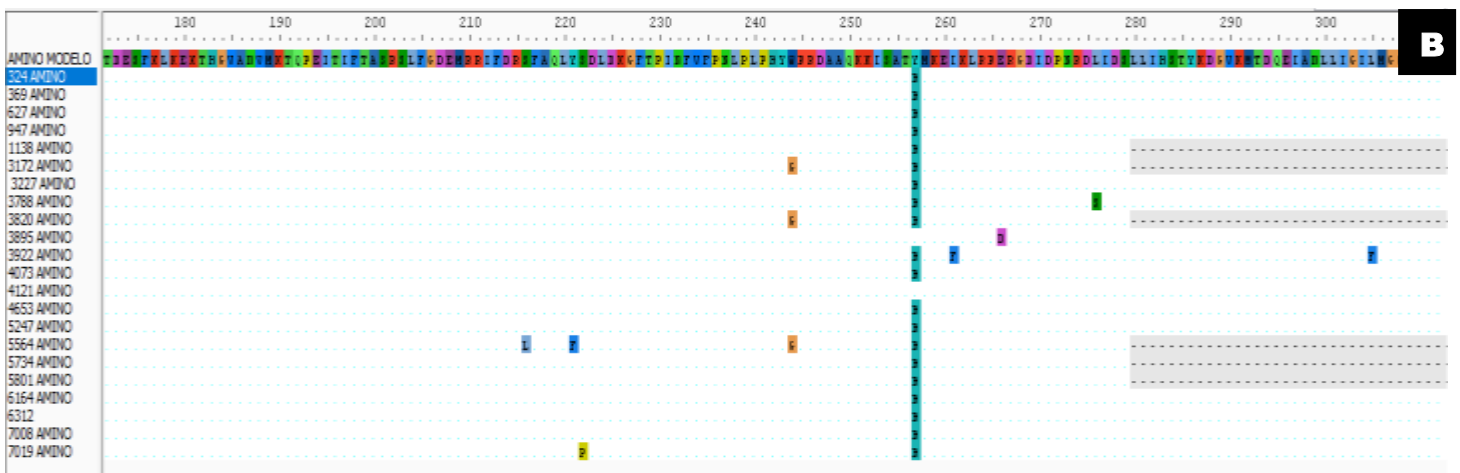
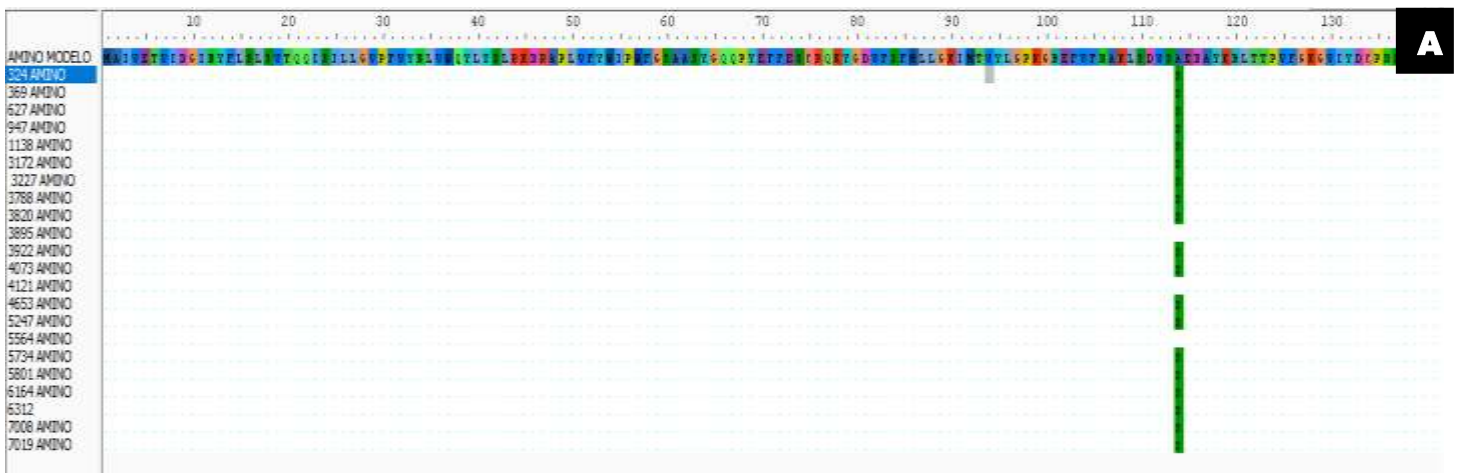
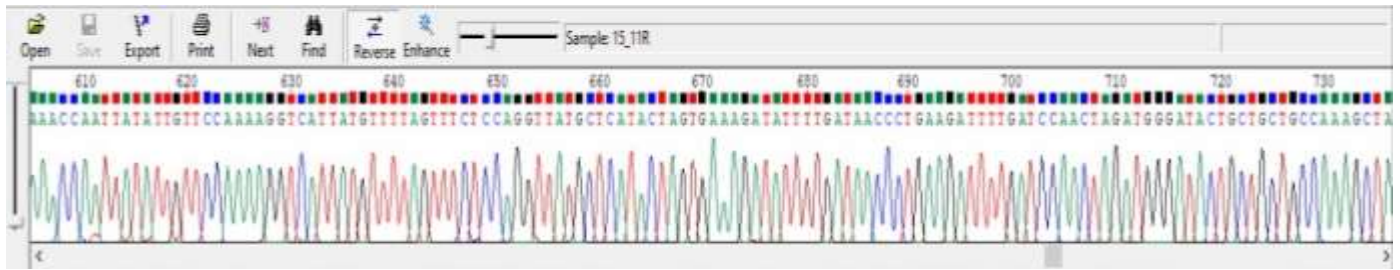
En los Carriles 1 al 4 y 11 al 14: presencia del gen *ERG11*, con un tamaño aproximado de 1750 pb, y en los Carriles 5 al 10 y 15 al 20: presencia del gen *ERG3*, con un tamaño aproximado de 1163 pb.

Apéndice 11. Cromatograma y alineación de una de las secuencias del gen *ERG3*, visualizada en el programa Chromas y Aliview, respectivamente.



Alineación de las secuencias de aminoácidos del *ERG3* de los aislamientos con perfil de resistencia a todos los azoles usados. (A) Primer fragmento de aminoácidos del *ERG3*, se observa varias mutaciones con cambio de sentido diferentes, (B) Segundo fragmento de aminoácidos del *ERG3*, se observa algunas mutaciones con cambio de sentido. Las mutaciones están resaltadas en colores únicos según el aminoácido cambiado.

Apéndice 12. Cromatograma y alineación de una de las secuencias del gen *ERG11*, visualizada en el programa Chromas y Aliview, respectivamente.



Alineación de las secuencias de aminoácidos del *ERG11* de los aislamientos con perfil de resistencia a todos los azoles usados. (A) Primer fragmento de aminoácidos del *ERG11*, se observa mutaciones con cambio de sentido siendo la común A114S en casi todas las muestras secuenciadas, (B) Segundo fragmento de aminoácidos del *ERG11*, se observa varias mutaciones con cambio de sentido, prevaleciendo en la mayor proporción de muestras secuenciadas, Y257H; también se observa una mutación sin sentido en varias muestras (L280Stop), lo cual genera un codón de terminación.

ANEXOS

Anexo 1

Medio Modificado: Agar Muller-Hinton

Es una modificación del medio Muller-Hinton con mayor sensibilidad en especies fúngicas. Este medio se complementa con glucosa a una concentración final del 2%, lo cual proporciona un crecimiento fúngico adecuado. La adición de colorante azul de metileno a una concentración final de 0,5 µg/mL mejora la definición del borde de la zona

- Preparación del inóculo: SDA (cultivo de 24 horas)
- Medio de prueba: suspensión de inóculo madre

0,5 estándar de McFarland

1X10⁶ a 5X10⁶ UFC/ml



A1. Preparación del agar Mueller-Hinton suplementado:

- (1) El agar Mueller-Hinton debe prepararse a partir de una base de agar Mueller-Hinton deshidratada comercialmente disponible de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- (2) Disuelva 0,1 gramos de colorante azul de metileno en 20 ml de agua destilada y caliente suavemente para disolver. No sobrecalentar. Agregar 100 µL de esta solución por litro de suspensión de agar.
- (3) Añadir 20 gramos de glucosa por litro de suspensión de agar.
- (4) Esterilice en autoclave según las instrucciones del fabricante.
- (5) Inmediatamente después de la esterilización en autoclave, deje que la solución de agar se enfríe en un baño de agua a una temperatura de 45 a 50 °C.
- (6) Vierta el medio recién preparado y enfriado en placas de Petri de fondo plano de plástico sobre una superficie horizontal nivelada para obtener una profundidad uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 67 a 70 mL de medio para placas de 150 mm de diámetro y de 28 a 30 mL para placas de 100 mm de diámetro.
- (7) Debe dejarse enfriar a temperatura ambiente y, a menos que la placa se use el mismo día de la preparación, almacenarse a temperatura de refrigeración (2 a 8 °C). El medio de agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Las placas deben usarse dentro de los siete días posteriores a la preparación, a menos que se hayan tomado las precauciones adecuadas, como envolverlas en plástico, para minimizar el secado del agar. Las placas deben someterse a pruebas de control de calidad.

Anexo 2

BUFFER DE LISIS PARA EXTRACCIÓN DE ADN (FENOL/CLOROFORMO/ALCOHOL ISOAMÍLICO)

Concentraciones:				
PREPARACION DE BUFFER DE LISIS PARA FENOL CLOROFORMO				
Buffer lisis	inicial	final	1 ejemplar	30 ejemplar
AGUA MILLI Q	-	-	1.275 mL	38.25 mL
TRIS-HCL pH 7.5	1M	10mM	15 uL	450 uL
EDTA pH 8.0	0.5M	10mM	30 uL	900 uL
NaCl	5M	50mM	15 uL	450 uL
SDS	20%	2%	165 uL	4.95 mL
			1.5 mL	45 mL
Buffer lisis	PM	inicial (M)	g	VOLUMEN F
AGUA MILLI Q	-	-	-	-
TRIS-HCL pH 7.5	121.15	1	2.423	20
EDTA pH 8.0	372.24	0.5	3.7224	20
NaCl	58.44	5	5.844	20
SDS	288.38	20%	4	20

Todos los componentes se mezclan utilizando un agitador magnético, hasta que la solución se vea transparente. Los volúmenes de los reactivos varían de acorde al volumen final que se desea obtener. Se guarda a temperatura ambiente, por motivo que uno de sus componentes es SDS y en refrigeración se poder cristalizar y dañar el buffer.