



# Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*

Marisol Fuentes, Germán Hermosilla, Claudio Alburquenque, Mary A. Falconer, José Amaro y Cecilia Tapia

## Characterization of azole resistance mechanisms in Chilean clinical isolates of *Candida albicans*

**Introduction:** The commensal yeast *Candida albicans*, can cause superficial or systemic candidiasis in susceptible hosts. In Chile, azole antifungals are the most widely used drugs in the treatment of candidiasis. In a previous study performed at our center, 2.1 and 1.6% of clinical isolates of *C. albicans* were found to be resistant to fluconazole and voriconazole, respectively. **Objective:** To characterize the resistance mechanisms involved in azoles resistance in Chilean clinical isolates. **Methodology:** Eight resistant, nine susceptible-dose dependent (SDD) and 10 susceptible strains (n: 27) were selected according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-S3 criteria, from vaginal and urine samples. Mutations in the 408-488 region of the ERG11 gene were studied by sequencing, and the relative expression of ERG11 gene and efflux pump genes CDR1, CDR2 and MDR1, was evaluated by quantitative real-time PCR (q-PCR). **Results:** No mutations were detected in the ERG11 gene and its overexpression was found only in 12.5% of the resistant strains (1/8). The most prevalent mechanism of resistance was the over-expression of efflux pumps (62.5%; 5/8). **Conclusion:** The study of the expression of efflux pumps by q-PCR could be a useful diagnostic tool for early detection of azole resistance in *C. albicans*.

**Key words:** *Candida albicans*, resistance, azole, efflux pump, ERG11, CDR1, CDR2, MDR1.

**Palabras clave:** *Candida albicans*, resistencia, azoles, bombas de eflujo, ERG11, CDR1, CDR2, MDR1.

Universidad de Chile.

Facultad de Medicina.

Programa de Microbiología y

Micología, Instituto de Ciencias

Biomédicas.

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Fuentes de financiamiento: Proyecto

Fondecyt de Iniciación 11110160 y

Proyecto UCH 0717.

Recibido: 2 de octubre de 2013

Aceptado: 8 de julio de 2014

**Correspondencia a:**

Cecilia Tapia Paredes

cetapia@med.uchile.cl

## Introducción

Las micosis son infecciones producidas por hongos patógenos u oportunistas, siendo los agentes más comúnmente aislados en todo el mundo las levaduras del género *Candida* (72,8 casos/millón de habitantes cada año)<sup>1</sup>. Las especies de *Candida* son hongos comensales que colonizan el tracto gastrointestinal y génito-urinario en 30 a 60% de los seres humanos; sin embargo, bajo condiciones de inmunosupresión pueden causar infecciones oportunistas denominadas candidiasis<sup>2,3</sup>. Se ha descrito que la candidiasis sistémica alcanza una mortalidad en Chile de 35% y una incidencia en América Latina de 0,37 casos cada 1.000 pacientes-día<sup>4,5</sup>. Si bien se han descrito más de 200 especies de *Candida* asociadas a infecciones en el ser humano, la especie más común es *Candida albicans*, que representa en Chile hasta 44,6% de las infecciones fúngicas causadas por levaduras<sup>3,6-8</sup>.

Los antifúngicos son compuestos, naturales o sintéticos, que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad<sup>9</sup>. Actualmente, existen varias familias de antifúngicos disponibles en el mercado siendo una de las más comunes los azoles, que inhiben la enzima 14 $\alpha$ -lanosterol-desmetilasa, afectando la biosíntesis de ergosterol, un importante componente de la membrana

plasmática fúngica<sup>9</sup>. En nuestro país, el tratamiento antifúngico de primera línea indicado para las infecciones fúngicas superficiales y sistémicas es fluconazol, un triazol de primera generación; en el último tiempo, se han ido incorporando las equinocandinas, principalmente para el tratamiento de candidiasis sistémica<sup>10-13</sup>.

Con el incremento paulatino de población de riesgo y el mayor uso de antifúngicos, se ha observado un aumento en las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de las cepas de *Candida* spp, lo cual podría asociarse a falla terapéutica<sup>14-17</sup>. En Chile se han encontrado cepas con susceptibilidad disminuida a azoles, especialmente de pacientes ambulatorios, probablemente asociado al uso frecuente de antifúngicos para el tratamiento de infecciones superficiales, como la candidiasis vulvo-vaginal<sup>18,19</sup>. Al menos 75% de las mujeres adultas ha experimentado un episodio de candidiasis vulvo-vaginal y 5 a 8% presenta un cuadro denominado candidiasis vulvo-vaginal recurrente, el cual se ha asociado a falla terapéutica, condición clínica en la que pueden aislarse cepas resistentes<sup>20</sup>.

A nivel molecular, diversos mecanismos de resistencia a azoles han sido descritos en *C. albicans*, como mutaciones puntuales en la región 405-488 del gen que codifica para la enzima "blanco" del fármaco ERG11, como por ejemplo G464S, R467K y I471T, y/o sobre-expresión de este gen<sup>21-23</sup>.



Otros mecanismos estudiados son la sobre-expresión de bombas de eflujo como CDR1, CDR2 y MDR1<sup>21,24-26</sup>. Las bombas CDR1 y CDR2 son transportadores del tipo ABC y MDR1 es una bomba del tipo MFS anti-porte (transporta dos solutos hacia distintos lados de la mem-

brana plasmática de la célula fúngica), que utiliza un gradiente de protones (H<sup>+</sup>) para translocar moléculas. Estos mecanismos podrían estar involucrados en la resistencia, tanto a azoles como a otros antifúngicos, ya que la sobre-expresión de estas bombas no permite la acumulación del fármaco en el compartimiento intracelular.

Dado que en Chile se desconoce la prevalencia de los mecanismos moleculares de resistencia a azoles, el objetivo de este trabajo es de caracterizar los mecanismos de resistencia a fluconazol y voriconazol.

## Materiales y Métodos

### Cepas clínicas

En este estudio se utilizaron cepas de *C. albicans* de origen génito-urinario (flujo vaginal y orina), obtenidas de pacientes ambulatorios de Clínica Dávila (Santiago, Chile). Los aislados fueron identificados por métodos convencionales como tubo germinal, microcultivo, agar cromogénico (CHRO Magar *Candida*) y API 32C (Biomérieux), según fuera requerido.

Las pruebas de susceptibilidad antifúngica a fluconazol y voriconazol se realizaron según el estándar establecido por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M27-A3<sup>27</sup>. Para el estudio se seleccionó un total de 27 cepas, de las cuales ocho eran resistentes, nueve cepas sensibles dosis dependiente (SDD) y 10 cepas sensibles, según puntos de corte clínicos del CLSI (Tabla 1). Como control se utilizó la cepa de referencia de *C. albicans* ATCC SC5314 la que es sensible a todos los antifúngicos testados. El uso de estas cepas fue aprobado por el Comité de Ética de Clínica Dávila.

### Secuenciación de la región 405-488 del gen *ERG11*

Las levaduras fueron sembradas en medio de YPD a 37°C con agitación, hasta alcanzar la fase exponencial y se realizó la extracción de ADN genómico mediante el sistema comercial High Pure PCR Template Preparation Kit® (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego se amplificó por reacción de polimerasa en cadena (RPC) la región 405-488 del gen *ERG11* (Gene ID: 3641571). Cada reacción estuvo compuesta por tampón de RPC 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 0,2 mM, Taq polimerasa Biolas (Bioline®) 5 U y partidores 0,2 μM (Tabla 2), 10 μL de templado de ADN genómico y se completó el volumen a 50 μL con agua bidestilada.

La amplificación se realizó usando un programa con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min y 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 seg, apareamiento a 56°C durante 30 seg y extensión 72°C durante 30 seg. Finalmente, se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. Los productos de RPC se purificaron usando el sistema comercial High Pure PCR Product Purification

Tabla 1. Caracterización de las cepas de *Candida albicans* utilizadas en este estudio

Cepa	Categoría de susceptibilidad*	Origen	Procedencia	CIM (μg/mL)	
				Fluconazol	Voriconazol
1A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	> 64	> 16
2A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	> 64	> 16
3A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
4A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
5A	R	Orina	Hospitalizado	64	16
6A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
7A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
8A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
9A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,25
10A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	2	0,25
11A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,25
12A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,5
13A	SDD	Orina	Hospitalizado	4	0,5
14A	SDD	Orina	Hospitalizado	4	0,5
15A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,25
16A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,5
17A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,25
18A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03
19A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,5	0,03
20A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03
21A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,5	0,03
22A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03
23A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,125
24A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,5	0,06
25A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	1	0,06
26A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03
27A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03

\*Puntos de corte clínicos según Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), third informational supplement" (M27-S3). CIM: concentración inhibitoria mínima. R: Resistente, SDD: Sensible Dosis Dependiente, S: Sensible.

Tabla 2. Partidores utilizados para la amplificación de la región 405-488 del gen *ERG11* mediante RPC

Gen	Secuencia partidores 5' → 3'	Tamaño del producto	Tm (°C)
<i>ERG11</i>	erg11-for: GGGTGGTCAACATACTTCTGC erg11-rev: TCCCAAATGATTCTGCTGGT	644 pb	56 °C

pb: pares de bases, Tm: temperatura de "melting".



Kit® (Roche) y se enviaron a secuenciar a la empresa especializada MacroGen® (Corea del Sur).

Una vez secuenciadas las muestras, se depuraron las secuencias usando el programa Contig Express de Vector NTI® Advance 11.0 (Invitrogen) y se alinearon usando Clustal W, tomando como gen de referencia *ERG11* de *C. albicans* ATCC SC5314 (Gene ID: 3641571) con el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) 5.1.

#### Extracción de ácido ribonucleico de *C. albicans*

Las cepas fueron crecidas en medio YPD a 37°C con agitación constante durante 4 h. La extracción de ARN se realizó usando el sistema comercial RNeasy Mini Kit® (Qiagen) previa lisis con perlas de vidrio. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa I (Fermentas) para evitar contaminación con ADN genómico. La reacción de retro-transcripción se realizó usando ImPromII Reverse Transcription System® (Promega) de acuerdo instrucciones del fabricante para 1 µg de ARN.

#### Expresión transcripcional de genes por RPC en tiempo real cuantitativa (en inglés q-PCR)

El diseño de los partidores se realizó utilizando el programa Primer Express® (Applied Biosystem). Los partidores utilizados para evaluar la expresión de *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* se detallan en la Tabla 3. Se utilizó como gen de referencia *ACT1*.

Los ensayos de q-PCR se llevaron a cabo en un equipo StepOne® (Applied Biosystem) con el sistema Fast SYBR Master Mix® (Applied Biosystem). Cada reacción de q-PCR contenía Fast SYBR Green Mix® 1x, partidores 0,5 µM, 2 µL de ADNc y se completó el volumen a 20 µL con agua bidestilada.

El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 20 seg y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 2 seg, apareamiento a 55°C durante 30 seg y una extensión 60°C durante 30 seg con colección de datos. La expresión relativa de los genes se determinó usando el método del delta-delta CT (*cycle threshold*) o  $\Delta\Delta CT$ .

#### Análisis estadístico

Los datos obtenidos para las cepas resistentes y susceptibles se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar y se analizaron mediante test t-student para datos no pareados, considerando una significancia  $p < 0,05$ . Los gráficos se realizaron con el programa Graph Pad Prism® 5 y con la asesoría de un estadístico.

## Resultados

#### Mutaciones en la región 405-488 del gen *ERG11*

No se encontraron sustituciones aminoacídicas en las cepas testeadas. Se detectaron 10 mutaciones sinónimas

Tabla 3. Partidores utilizados para la cuantificación relativa de los genes *ERG11*, *CDR2* y *MDR1* mediante q-PCR

Gen	Secuencia partidores 5' → 3'	Tamaño del producto	Tm (°C)
<i>ERG11</i>	erg11RT-for: TACTGCTGCTGCCAAAGCTA erg11RT-rev: GCAAATTGTTCCCAATACA	144 pb	55°C
<i>CDR1</i>	CDR1-for: GAAAGAGAACCATACCAGG CDR1-rev: AGGAATCGACGGATCAC	288 pb	53°C
<i>CDR2</i>	CDR2-for: GAATTTGCCGCTAGATTAAGAA CDR2-rev: ACCACGCACAAAATCGTTAC	150 pb	54°C
<i>MDR1</i>	MDR1-for: CAAATTCCTGCTTTGGT MDR2-rev: CGGCTAACCCAACGGTAAA	148 pb	56°C
<i>ACT1</i>	ACT1-for: CCAGCTTCTACGTTTCC ACT1-rev: CTGTAACCACGTTTCAGAC	209 pb	53°C

pb: pares de base. Tm: temperatura de "melting".

en la región secuenciadas; sin embargo, éstas se encontraron distribuidas tanto en las cepas resistentes como susceptibles, descartándose una posible relación con la resistencia a los azoles (dato no publicado).

#### Expresión transcripcional relativa del gen *ERG11* y bombas de eflujo

La cuantificación de la expresión relativa del gen *ERG11* en las cepas clínicas mostró que en las cepas resistentes la expresión promedio fue de  $1,7 \pm 0,7$  veces, mientras que en las cepas susceptibles fue de  $1,4 \pm 0,3$  respecto al control ATCC. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión de *ERG11* ( $p: 0,621$ ) (Figura 1).

También se cuantificó la expresión relativa de los genes que codifican para las bombas de eflujo *CDR1*, *CDR2* y *MDR1*. En la expresión de *CDR1* se encontró una expresión relativa de  $3,0 \pm 1,0$  veces en cepas resistentes, mientras que en las cepas susceptibles fue de  $0,4 \pm 0,1$  veces, encontrándose diferencia estadísticamente significativa ( $p: 0,016$ ) (Figura 2A-B).

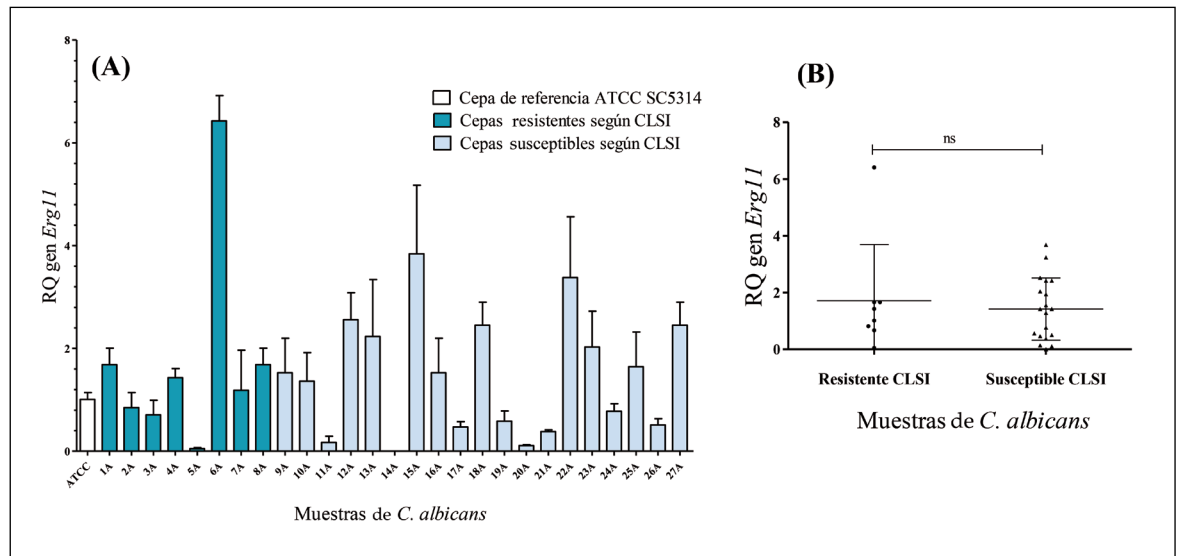
En el estudio de *CDR2* encontramos que el grupo resistente presentaba una expresión promedio de  $26 \pm 9$  veces, mientras que el grupo susceptible  $7 \pm 2$  veces. Si bien se observó un alta variabilidad en la cuantificación de este gen en los grupos estudiados (sensible versus resistente), esta diferencia era estadísticamente significativa entre los dos grupos ( $p: 0,021$ ) (Figura 2C-D).

Finalmente, en la expresión de *MDR1* se observó que, en las cepas resistentes al antifúngico, la expresión fue de  $2,0 \pm 0,6$  veces y en cepas sensibles fue de  $0,7 \pm 0,1$  veces, encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ambos ( $p: 0,006$ ) (Figura 2 E-F).

La sobre-expresión de *ERG11* se encontró sólo en 12,5% (1/8) de las cepas resistentes, mientras que la sobre-expresión de bombas de eflujo estuvo presente en



**Figura 1.** Expresión relativa del gen *ERG11* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a azoles. **(A)** Expresión relativa (RQ) de *ERG11* en cepas resistentes (azul) y susceptibles (celeste) a azoles. Cepa de referencia ATCC SC5314 (blanco) ( $n = 3$ ). **(B)** Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión transcripcional relativa de *ERG11* en el grupo de cepas resistente y susceptible a azoles. ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.



62,5% (5/8) de las cepas resistentes. No hubo diferencia en la expresión de estos genes entre cepas SDD y cepas susceptibles (dato no publicado).

## Discusión

Se ha descrito con anterioridad que la resistencia a azoles es un fenómeno multifactorial, donde están involucrados varios mecanismos de resistencia operando de manera única o en conjunto<sup>15,28,29</sup>. La prevalencia real de cada uno de éstos no es completamente conocida.

En este trabajo, la secuenciación de la región 405-488 del gen *ERG11* no mostró sustituciones a nivel de aminoácidos en las cepas testeadas; sin embargo, no podemos descartar la presencia de mutaciones en otras regiones como 105-165 y 266-287<sup>30,31</sup> que pudiesen estar involucradas en la resistencia de las cepas analizadas, para lo cual, se requiere la secuenciación del gen *ERG11* completo.

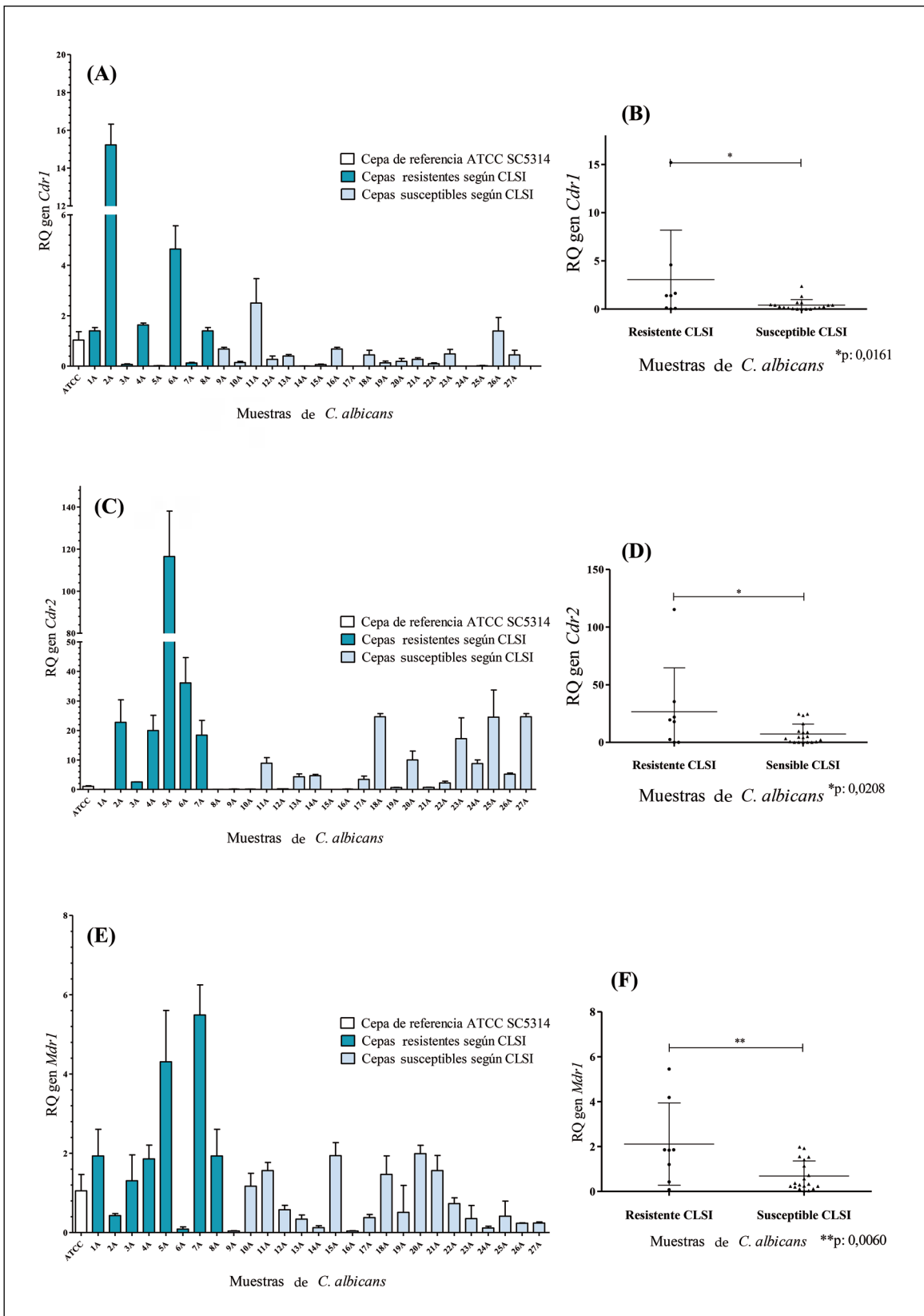
En relación a la cuantificación del gen *ERG11*, se observó que sólo en una de las cepas resistentes, la cepa 6A, aislada de flujo vaginal de una paciente (Tabla 1), hubo un aumento considerable de la expresión del gen en comparación a las demás cepas. En general, el grupo de cepas resistentes no presentó un aumento en la expresión de este gen en relación al grupo de cepas sensibles, por lo cual, este no es el mecanismo predominante en cepas resistentes. Algunos autores han descrito una sobre-expresión inducida del gen *ERG11*, donde la exposición previa de *Candida* a fluconazol produce este fenómeno; en este caso, la sobre-regulación de este gen sería un mecanismo de resistencia adaptativo presente sólo cuando

la célula está en presencia de azoles<sup>32,33</sup>. No podemos descartar el uso de fluconazol, en la paciente de la cual fue aislada la cepa.

Respecto a la cuantificación de bombas de eflujo, a pesar de la variabilidad de expresión entre los grupos, se observaron diferencias significativas en todas las bombas testeadas entre las cepas resistentes y aquellas sensibles a los azoles. Se observó sobre-expresión de las bombas testeadas en más de la mitad de las cepas resistentes, lo que se correlaciona con la resistencia fenotípica de las cepas testeadas (Figura 2).

Estos resultados son coherentes con estudios previos que han descrito que uno de los mecanismos principalmente detectados en cepas resistentes a azoles son las bombas de eflujo<sup>15,34,35</sup>. Cabe señalar que la mayoría de los trabajos citados corresponden a estudios de aislados orofaríngeos de paciente inmunosuprimidos lo que difiere de nuestro trabajo en que las cepas testeadas provienen de muestras de flujo vaginal y orina en pacientes ambulatorios (Tabla 1), con lo que se puede inferir que los mecanismos de resistencia no se relacionarían con el origen del aislado y que pueden encontrarse en cepas resistentes en la comunidad<sup>18</sup>.

En *C. albicans*, la resistencia es un proceso multifactorial, lo cual se refleja en la cepa 6A, altamente resistente a azoles que, además de presentar una sobre-expresión de *ERG11*, presenta una sobre-expresión de los genes de bombas de eflujo *CDR1* y *CDR2*. En este proceso, una presión selectiva como la presencia del antifúngico, permite que las células adquieran un fenotipo resistente en el cual varios mecanismos pueden contribuir<sup>35,36</sup>. Este estudio muestra que en cepas locales de *C. albicans*, el mecanismo predominante sería la sobre-expresión de



**Figura 2.** Expresión relativa (RQ) y comparación de medias de la expresión transcripcional de bombas de eflujo en el grupo de cepas resistente (azul) y susceptible (celeste) a azoles. Cepa de referencia ATCC SC5314 (blanco) (n = 3). **(A)** *CDR1* **(B)** *CDR2* y **(C)** *MDR1*. \*nivel significancia p < 0,05, \*\*nivel de significancia p < 0,005.





bombas de eflujo; sin embargo, se requiere un mayor número de cepas para validar estos resultados preliminares, permitiendo establecer puntos de corte para diferenciar cepas sensibles de resistentes y detectar de manera precoz la resistencia a azoles. La cuantificación de la expresión de estos genes constituye una herramienta diagnóstica útil para detectar resistencia a azoles a nivel molecular.

*Agradecimientos:* A Paula Daza N., Directora de Docencia, Desarrollo y Comunicaciones de Clínica Dávila, por fomentar el desarrollo de trabajos científicos en dicha institución. Al proyecto UCH 0717, de la Universidad de Chile, por permitir la compra de equipamiento necesario para este estudio y al proyecto Fondecyt 11110160.

## Resumen

*Introducción:* *Candida albicans* es una levadura comensal capaz de causar una infección oportunista en hospederos susceptibles denominada candidiasis, que puede ser superficial o sistémica. En Chile, los antifúngicos más utilizados para el tratamiento de las

candidiasis son los azoles. En un estudio previo en nuestro centro, se detectó que 2,1 y 1,6% de cepas clínicas de *C. albicans* fueron resistentes a fluconazol y voriconazol, respectivamente. *Objetivo:* Caracterizar los mecanismos de resistencia involucrados en la resistencia a azoles en cepas clínicas chilenas. *Metodología:* Según los criterios del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-S3, se seleccionaron ocho cepas resistentes, nueve cepas susceptibles dosis dependiente (SDD) y 10 cepas sensibles (n: 27), aisladas de flujo vaginal y orina. Se evaluó la presencia de mutaciones en la región 408-488 del gen *ERG11* por secuenciación y la expresión relativa del gen *ERG11* y de los genes de bombas de eflujo *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* por RPC en tiempo real cuantitativa (q-PCR). *Resultados:* No se encontraron mutaciones en el gen *ERG11* y la sobre-expresión de éste sólo se presentó en 12,5% de las cepas resistentes (1/8). El mecanismo prevalente en la cepas resistentes fue la sobre-expresión de bombas de eflujo encontrándose en 62,5% de las cepas resistentes (5/8). *Conclusión:* El estudio de la expresión bombas de eflujo por q-PCR podría ser una herramienta diagnóstica útil para la detección temprana de resistencia a azoles en *C. albicans*.

## Referencias bibliográficas

- 1.- Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20 (1): 133-63. Epub 2007/01/16.
- 2.- Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* 2011; 49 (2): 171-7. Epub 2011/05/04.
- 3.- Lim C, Rosli R, Seow H, Chong P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31 (1): 21-31. Epub 2011/05/06.
- 4.- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon A, Restrepo A, Colombo A. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 2010; 51 (5): 561-70. Epub 2010/07/28.
- 5.- Tobar E, Silva F, Olivares R, Gaete P, Luppi M. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Rev Chilena Infectol* 2011; 28: 41-9. Epub 2010/02/23.
- 6.- Miceli M, Díaz J, Lee S. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011; 11 (2): 142-51. Epub 2011/01/29.
- 7.- Silva V, Díaz M, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Med Chile* 2002; 19: 149-56. Epub 2002/12/21.
- 8.- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 36 (2): 288-305. Epub 2011/05/17.
- 9.- Odds F, Brown A, Gow N. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; 11 (6): 272-9. Epub 2003/06/26.
- 10.- Ajenjo H, Aquevedo S, Guzmán D, Poggi M, Calvo A, Castillo V, et al. Perfil epidemiológico de la candidiasis invasora en unidades de pacientes críticos en un hospital universitario. *Rev Chilena Infectol* 2010; 28 (2): 118-22. Epub 2011/07/02.
- 11.- Diomedí A. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev Chilena Infectol* 2004; 21: 89-101. Epub 1999/12/22.
- 12.- Pappas P, Kauffman C, Andes D, Benjamin D, Calandra T, Edwards J, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48 (5): 503-35. Epub 2009/02/05.
- 13.- Neoh C F, Slavín M, Chen S C, Stewart K, Kong D C. Echinocandins in the treatment of candidaemia and invasive candidiasis: clinical and economic perspectives. *Intern J Antimicrob Agents* 2014; 43 (3): 207-14. Epub 2014/03/29.
- 14.- Cortés J, Concha M, Cediel T, Castillo J. Métodos de diagnóstico en candidemia: una revisión sistemática de la literatura con meta-análisis. *Rev Chilena Infectol* 2011; 28 (5): 423-8. Epub 2011/11/05.
- 15.- Park S, Perlin D. Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb Drug Resist* 2005; 11 (3): 232-8.
- 16.- Warnock D W. Azole drug resistance in *Candida* species. *J Med Microbiol* 1992; 37 (4): 225-6. Epub 1992/10/01.
- 17.- Watamoto T, Samaranyake L P, Egusa H, Yatani H, Seneviratne C J. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. *J Med Microbiol* 2011; 60 (Pt 9): 1241-7. Epub 2011/04/09.
- 18.- Albuquerque C, Beltrán S, Olivares R, Falconer M A, Amaro J, Fuentes M, et al. Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30 (3): 244-51. Epub 2013/07/24.
- 19.- Albuquerque C, Hermosilla G, Tapia C. Distribución y susceptibilidad a fluconazol de levaduras del género *Candida* aisladas en pacientes hospitalizados y ambulatorios. *Rev Chilena Infectol* 2009; 26 (5): 435-9. Epub 2009/11/17.
- 20.- Sobel J D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369 (9577): 1961-71. Epub 2007/06/15.
- 21.- Morschhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587 (2-3): 240-8. Epub 2002/06/27.
- 22.- 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* 2003; 47 (8): 2404-12. Epub 2003/07/25.
- 23.- Xu J, Ramos A, Vilgalys R, Mitchell T. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (3): 1214-20. Epub 2000/03/04.
- 24.- Akins R. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 2005; 43 (4): 285-318. Epub 2005/08/23.
- 25.- Pfaller M, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema D, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (6): 2040-6. Epub 2012/03/31.
- 26.- White T, Holleman S, Dy F, Mirels L, Stevens D. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46 (6): 1704-13. Epub 2002/05/23.
- 27.- CLSI. NCCLS, Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard (Second Edition). NCCL document M27-A2 (ISB 1-56238-469-4) 2008.
- 28.- Franz R, Kelly S L, Lamb D C, Kelly D E, Ruhnke M, Morschhauser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42 (12): 3065-72. Epub 1998/12/03.
- 29.- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Micheli M, Bille J. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resist Updat* 1998; 1 (4): 255-65. Epub 2006/08/15.
- 30.- White T C, Holleman S, Dy F, Mirels L F, Stevens D A. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46 (6): 1704-13. Epub 2002/05/23.
- 31.- Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* 1999; 145 (Pt 10): 2701-13. Epub 1999/10/28.
- 32.- Ribeiro M A, Paula C R. Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated *in vitro*: is there any clinical implication? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57 (1): 71-5. Epub 2006/07/15.
- 33.- Henry K W, Nickels J T, Edlind T D. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (10): 2693-700. Epub 2000/09/19.
- 34.- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani J L, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39 (11): 2378-86. Epub 1995/11/01.
- 35.- White T C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41 (7): 1482-7. Epub 1997/07/01.
- 36.- Perea S, López J, Kirkpatrick W, McTee R, Santilla R, Martínez M, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 45 (10): 2676-84.