



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
INSTITUTO DE CIENCIAS CENTRO DE  
INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**Caracterización molecular de *Candida auris* de un brote en el estado de Tabasco, México**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Biol. Liset Candelaria Pérez Vázquez**

**DIRECTORA DE TESIS  
D. C. Rebeca D. Martínez Contreras**

**ASESORA EXTERNA  
D. C. Elizabeth González Durán**



Puebla, Puebla

Febrero, 2024



**BUAP**

Puebla, Pue. a 23 de enero 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

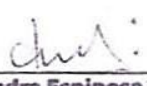
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría de la alumna **Liset Candelaria Pérez Vázquez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Caracterización molecular de *Candida auris* de un brote en el estado de Tabasco, México”**

A nuestro juicio, la alumna **Liset Candelaria Pérez Vázquez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

  
M.C. Alejandra Espinosa Texis

  
D.C. Margarita María de la Faz Arenas Hernández

  
D.C. Luis Javier Martínez Morales

  
D.C. Vianey Marín Cevada

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

## DEDICATORIAS

### **A mi amor eterno**

Francisca Molina Ozuna

Por el gran amor que me brindó, por presumirme con sus conocidos y estar muy orgullosa de mí, nos vemos en la otra vida mi amor eterno. La vida no me permitió cumplir mi promesa, pero espero que coincidamos en nuestras siguientes vidas.

**Te amo**



### **A mi**

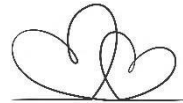
Por ser valiente y a no rendirme en mi camino ninja.

### **A mis padres**

Eloísa Vázquez Molina y Pedro Pérez Fernández

Por la vida, su gran amor, apoyo, comprensión y por estar siempre conmigo apoyándome en mis decisiones.

Los amo



### **A mi hermana**

Lizsandi Anel Pérez Vázquez

Por soportarme cuando me estresaba, por estar al pendiente de mí, por ser mi confidente, por sus consejos y su ayuda incondicional.

Te amo

### **A mi sobrino**

Isaac Efraín Cortés Pérez

A mi pequeño Efraín, que me ha dado el título de tía, por tener a alguien a quien darle cariño y transmitir mi conocimiento.

Te amo

**A mi mejor amiga**

Diana Marcela Girón Juárez

Por su hermosa amistad, por haberme apoyado en esta nueva etapa fuera de casa, por haberme brindado su hogar y estar conmigo en todo momento.

Saranghae

A Cheems

Por apoyarme a seguir con mi camino ninja, por ayudarme a estudiar, por confiar en mí, por su cariño y por estar siempre ahí apoyándome.

## AGRADECIMIENTOS

**Agradezco a Dios**, por la vida de mis padres y permitirme culminar otra etapa muy importante en mi vida.

**A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por permitirme ser parte de ella, por el apoyo que me dio para realizar mi estancia en el Instituto de Diagnóstico Referencia y Epidemiología (InDRE), a mis docentes que me brindaron su apoyo y conocimiento durante el posgrado.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis “Caracterización molecular de *Candida auris* de un brote en el estado de Tabasco, México.

**A mi directora la Dra. Rebeca Débora Martínez contreras**, por darme la oportunidad de ser su alumna y el apoyo que me brindo durante mi estancia.

**A mi asesora la Dra. Elizabeth González Durán**, por todo su conocimiento, sus enseñanzas, por la amistad y la atención que me brindó. Es una excelente Investigadora.

**Al Químico Cudberto Contreras Pérez**, por haber iniciado con el proyecto de *Candia auris*, por su conocimiento, ayuda y su amistad brindada.

**A la Biol. Patricia Gutiérrez**, por enseñarme a identificar algunos hongos y por confiar en mi

**Al Instituto de Diagnóstico Referencia y Epidemiología (InDRE)**, por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia para realizar mi proyecto de tesis y por el apoyo.

**A la Dra. Josefina Gómez Gómez**, por haberme brindado la oportunidad de vivir en su hogar y la confianza depositada.

**Al Químico Jesús Tenorio y a la Química Alejandra Moreno**, por apoyarme, enseñarme y brindarme su amistad.

**A la Química Lolita y a la Química Normita**, por apoyarme, brindarme su amistad y por sus consejos

**A la técnica Gabriela Judith Barrios**, por haberme confiado a Víctor, fui feliz mientras ambos crecíamos y por tus conocimientos brindado.



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bacteriología Molecular (BAMO) y el laboratorio de Micología del departamento de Bacteriología del Instituto de Diagnóstico y referencias Epidemiológico (InDRE) de la Secretaría de Salud de México; bajo la dirección de la Dra. Rebeca D. Martínez Contreras catedrática del Instituto de Ciencias (ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la asesoría de la Dra. Elizabeth González Durán, jefa del Laboratorio de Biología Molecular (BAMO) del InDRE.

## Lista de abreviaturas

**EFI.** Enfermedad fúngica invasiva

**MDR.** Multidrogorresistente

**XDR.** Extremadamente resistente

**CDC.** Centro para el control y prevención de enfermedades (por sus siglas en inglés)

***ERG11.*** Gen que codifica para la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa

***FKSI HS1.*** Gen que codifica para la enzima 1,3 Beta glucano sintetasa

**ADNg.** ADN genómico

**ITS.** Espaciador transcrito interno (por sus siglas en inglés)

**PCR.** Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés)

**MLST.** Tipificación multilocus de secuencias (por sus siglas en inglés )

**PFGE.** Electroforesis de Campos pulsados (por sus siglas en inglés)

**UCI.** Unidad de Cuidados Intensivos (por sus siglas en inglés)

**NCBI.** Centro Nacional para la Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés)

**ATCC.** Colección Americana de Cepas Tipo (por sus siglas en inglés)

**SNP.** Polimorfismo de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés)

**WGS.** Secuenciación completa del genoma (por sus siglas en inglés)

**SRA.** Archivo de lectura de secuencia (por sus siglas en inglés)

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	ii
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	iii
RESUMEN .....	iv
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Epidemiología de <i>Candida auris</i> .....	1
1.3. Característica de <i>C. auris</i> .....	4
1.4. Genoma de <i>C. auris</i> .....	5
1.5. Colonización.....	6
1.6. Patogenicidad y factores de virulencia .....	6
1.7. Identificación de <i>C. auris</i> en el laboratorio .....	7
1.8. Confirmación molecular de los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	8
1.9. Tratamiento para las fungemias.....	10
1.10. Mecanismos de acción de los antifúngicos.....	10
1.11. <i>C. auris</i> especie resistente los antifúngicos .....	11
1.12. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos .....	12
1.13. Determinación del perfil de susceptibilidad por métodos estándar .....	14
1.14. Prevención y control de <i>C. auris</i> .....	14
1.15. Antecedentes.....	15
2.1. Justificación .....	19
2.2. Hipótesis .....	19
2.3. Objetivo general .....	20
2.4. Objetivos particulares .....	20

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
3.1. Diagrama de flujo experimental .....	21
3.2. Selección de muestras.....	21
3.3. Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	24
3.4. Caracterización microscópica de los de <i>C. auris</i> .....	24
3.4.1. Producción de clamidosporas .....	24
3.4.2. Prueba de tubo germinativo .....	25
3.4.3. Perfil bioquímico .....	25
3.5. Determinación del perfil de susceptibilidad a los antifúngicos .....	26
3.6. Caracterización de <i>C. auris</i> mediante biología molecular.....	28
3.7. Lisis celular.....	28
3.8. Extracción de ADN genómico.....	28
3.9. Identificación molecular .....	29
3.9.1. Amplificación de la región de ITS1-ITS2 .....	30
3.9.2. Amplificación de región de dominios D1/D2 de <i>C. auris</i> .....	31
3.9.3. Secuenciación de la región ITS1-ITS2 y D1/D2 del gen 26S.....	31
3.10. Análisis filogenético para la identificación de los clados de <i>C. auris</i> .....	33
3.10.1. Análisis filogenético de la región de ITS .....	33
3.10.2. Análisis filogenético de la región de dominios D1/D2 .....	34
3.11. Identificación de resistencia a los antifúngicos mediante PCR-Secuenciación.....	34
3.11.1. Amplificación del gen <i>ERG11</i> .....	35
3.11.2. Amplificación de la región parcial del gen <i>FKS1</i> HS1 .....	36
3.12. Determinación de la clonalidad de <i>C. auris</i> mediante PFGE .....	37
3.12.1 Determinación de la clonalidad por WGS y análisis de SNPs .....	39
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	41

4.1. Identificación del universo de muestras .....	41
4.2. Caracterización macroscópica de <i>C. auris</i> .....	43
4.3 Caracterización microscópica.....	45
4.4. Identificación fenotípica con el sistema VITEK.....	47
4.5. Determinación del perfil susceptibilidad de <i>C. auris</i> mediante microdilución .....	48
4.6. Confirmación de <i>Candida</i> spp mediante PCR-Secuenciación de la región de ITS.....	49
4.7. Confirmación de <i>C. auris</i> mediante PCR-Secuenciación de la región de dominios D1/D2 del gen 26S del ADNr .....	53
4.8. Análisis filogenético de la región de ITS del universo de muestras .....	53
4.9. Análisis filogenético de la región de ITS de los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	55
4.10. Análisis filogenético de la región de D1/D2.....	56
4.11. Detección de mutaciones puntuales que confieren resistencia a fluconazol .....	57
4.11.1. Detección de mutación puntual que confiere resistencia a equinocandinas .....	61
4.12 Determinación de la clonalidad de los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	63
4.13. Secuenciación completa del genoma de aislados de <i>C.auris</i> .....	64
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES .....	78
CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS .....	79
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de <i>C. auris</i> .....	2
Figura 2. Distribución de <i>C. auris</i> a nivel mundial .....	3
Figura 3. Crecimiento de <i>C. auris</i> en medio CHROMagar .....	4
Figura 4. Representación esquemática de la región de ITS y D1/D2 del ADNr .....	9
Figura 5. Mecanismo de acción de las tres clases de antifúngicos.....	11
Figura 6. Mecanismos de resistencia a las tres clases de antifúngicos.....	13
Figura 7. Microdilución en caldo para la evaluación antifúngica de los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	27
Figura 8. Caracterización macroscópica de los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	44
Figura 9. Caracterización microscópica de <i>C.auris</i> .....	45
Figura 10. Prueba de tubo germinal en los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	46
Figura 11. Amplificación de la región ITS del universo de muestras .....	50
Figura 12. PCR específico de <i>C. auris</i> .....	51
Figura 13. Análisis filogenético del universo de muestras .....	54
Figura 14. Análisis filogenético de <i>C. auris</i> (ITS) .....	56
Figura 15. Análisis filogenético de <i>C. auris</i> (D1/D2) .....	57
Figura 16. Amplificación del gen <i>ERG11</i> .....	58
Figura 17. Identificación de mutaciones relacionadas con resistencia en el gen <i>ERG11</i> de los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	59
Figura 18. Amplificación de una región parcial del gen <i>FKSI</i> .....	61
Figura 19. Marcadores moleculares en aislamientos del clado IV .....	62
Figura 20. Identificación de mutaciones en el gen <i>FKSI</i> de los aislamientos de <i>C. auris</i> .....	63
Figura 21. Árbol filogenómico de <i>C. auris</i> .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Datos epidemiológicos del universo de muestras</i> .....	23
Tabla 2. <i>Concentración de los antifúngicos empleados</i> .....	26
Tabla 3. <i>Datos de los aislamientos de C. auris</i> .....	43
Tabla 4. <i>Perfil bioquímico de los aislamientos de C. auris</i> .....	48
Tabla 5. <i>Concentración mínima inhibitoria de los seis aislamientos de C. auris</i> .....	49
Tabla 6. <i>Secuencias de la región de ITS de los 20 aislamientos depositadas en el GenBank</i> .....	52
Tabla 7. <i>Mutaciones encontradas en las secuencias del gen ERG11 de los seis aislamientos</i> .....	60
Tabla 8. <i>Posición de SNPs en el genoma de los aislamientos de Tabasco</i> .....	67

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Universo de muestras sospechosas de <i>C. auris</i> .....	41
Gráfica 2. Fuente de muestra de donde se obtuvieron los aislamientos .....	42
Gráfica 3. Hospitales de donde se aisló a <i>C. auris</i> .....	42

## RESUMEN

*Candida auris* representa un problema de salud pública debido a la resistencia que presenta a los antifúngicos y del potencial de causar brotes nosocomiales. Este estudio tuvo como finalidad identificar y caracterizar los aislamientos de *C. auris* de Tabasco. Para ello, se realizó la identificación de *C. auris* por métodos microbiológicos y se confirmó por PCR-Secuenciación. La susceptibilidad a los antifúngicos se determinó por el método de dilución en caldo y se confirmó por búsqueda de mutaciones en los genes *ERG11* y *FKS1* HS1. La diversidad genética se determinó mediante el análisis filogenético de la región ITS y D1/D2 del gen 18S y 26S del ADNr, respectivamente, además del análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNP).

En conjunto, estos resultados mostraron que la mayoría de los aislamientos pertenecieron a otras especies de *Candida* y únicamente, seis aislamientos resultaron ser *C. auris*. Para éstos, se observaron dos morfologías diferentes: células individuales formando blastoconidios y células con pseudohifas y abundantes blastoconidios, correspondientes al clado I (Sur de Asia) y al clado IV (Sudamericano), respectivamente; lo que confirmó la circulación de dos clados distintos en la entidad. Contrario a lo esperado, cinco aislamientos fueron sensibles a los tres tipos de antifúngicos y no se encontraron mutaciones relacionadas con resistencia en los genes *ERG11* y *FSK1* HS1, con excepción del aislamiento MYC-97-22 que resultó resistente a fluconazol (CMI  $\geq$  64  $\mu$ g/mL) pero no se observó mutaciones en el gen *ERG11*. El análisis de SNP sugiere que los aislamientos están genéticamente relacionados entre sí; sin embargo, no se puede aseverar que derivaron de un brote. Finalmente, se requiere realizar secuenciación de genoma completo para definir el origen de las introducciones de *C. auris* en Tabasco.

# CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. Introducción

En la última década las infecciones fúngicas invasivas (EFI por sus siglas en inglés), han ido en aumento dichas infecciones son causadas por hongos oportunistas afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos y las especies del género *Candida* están asociadas a dichas infecciones. El género *Candida* está compuesto por 108 especies aproximadamente, pero alrededor de 18 son de importancia clínica (Turner y Butler, 2014).

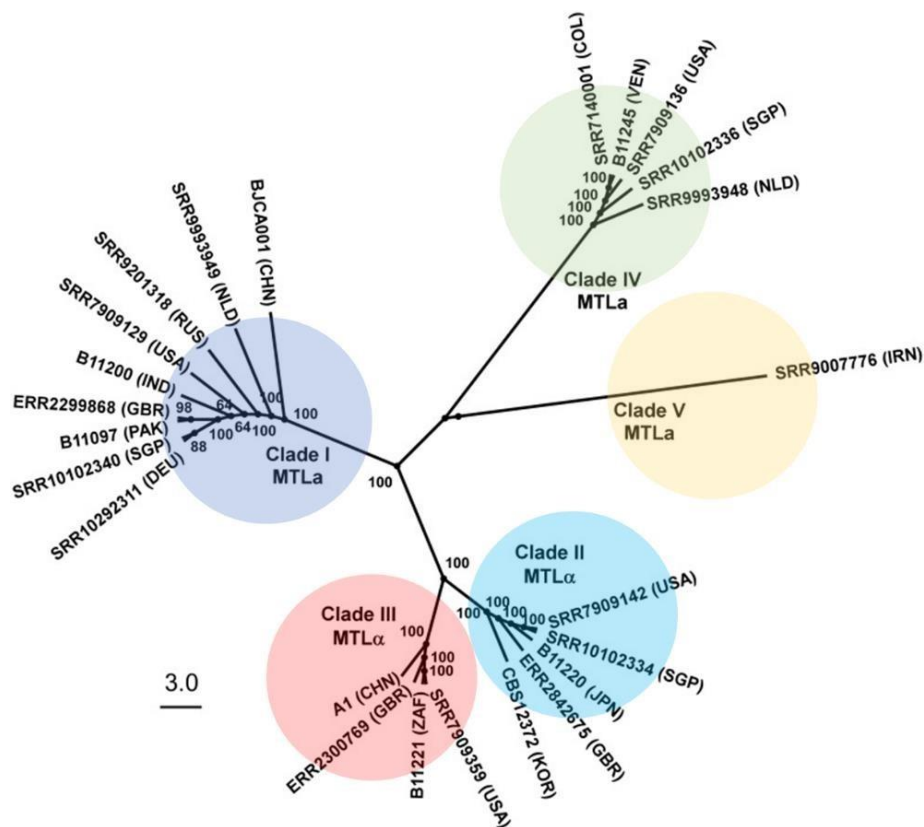
Una de las especies de este género que ha tenido una gran relevancia en los últimos años es *Candida auris* esta levadura nosocomial emergente, representa un problema de salud pública a nivel mundial, debido a que a diferencia de las otras especies del género presenta dificultades en su identificación, presenta resistencia a las tres clases principales de antimicóticos, tiene la capacidad de persistir en el ambiente hospitalario y de diseminarse entre los pacientes con gran facilidad (Pathirana *et al.*, 2018). Esta especie está asociada con brotes en entornos intrahospitalarios, siendo causante de candidemia invasiva, candidiasis, infecciones del torrente sanguíneo e incluso provoca la muerte (Chow *et al.*, 2020).

## 1.2. Epidemiología de *Candida auris*

*C. auris* fue descrita por primera vez en 2009, se aisló a partir de la secreción de oído externo de una paciente japonesa, de ahí deriva su nombre “*auris*” que significa oído. Se tiene el primer registro de esta especie en 1996 en Corea del Sur, pero fue identificada erróneamente como *Candida haemulonii* (Lee *et al.*, 2011; Satoh *et al.*, 2009). Las infecciones invasivas por *C. auris* en los últimos años han presentado cambios drásticos, debido a que actualmente se están reportando brotes nosocomiales con mayor frecuencia y parecen involucrar a un número cada

vez mayor de pacientes. Estudios han demostrado que una vez que esta levadura nosocomial se introduce en un centro de atención médica, se propaga rápidamente entre los pacientes susceptibles (Ahmad y Alfouzan, 2021).

El genoma completo de 304 aislamientos de *C. auris* de diferentes países dieron lugar a su agrupación en cuatro clados geográficamente distintos: clado I (Sur de Asia), clado II (este de Asia), clado III (Sudáfrica), clado IV (Sudamérica) y en el año 2018 se describió un nuevo clado V (Irán) (figura 1) (Chow *et al.*, 2019).



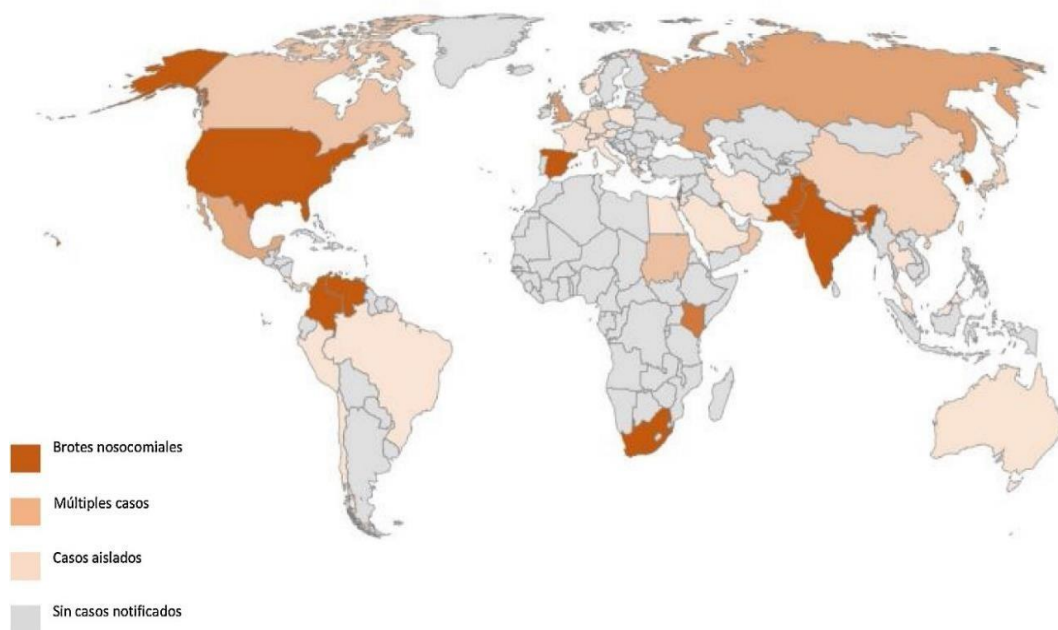
**Figura 1. Árbol filogenético de *C. auris***

Filogenia de los cinco clados de *C. auris*. Círculo lila clado I (Sur de Asia), círculo celeste clado II (Este de Asia), círculo rosa clado III (Sudáfrica), círculo verde clado IV (Sudamericano) y círculo beige clado V (Irán). Tomado de (Du *et al.*, 2020).

Desde que se describió por primera vez, se han reportado infecciones y colonizaciones por esta especie en 46 países de los cinco continentes convirtiéndose en una de las causas más frecuentes

de candidemia en algunos hospitales de la India, Sudáfrica, Venezuela y España, reportándose desde casos aislados, hasta brotes nosocomiales, superando incluso a *Candida glabrata* o *Candida tropicalis* en algunos centros de atención médica (figura 2) (Ruiz-Gaitán y Luis Del Pozo, 2021).

Los aislamientos del clado I y III han causado varios brotes nosocomiales importantes en el Reino Unido, así como en sus continentes de origen, mientras que los aislamientos de clado II causan infecciones de oído. El aislado clado V recientemente descrito también se recuperó inicialmente de un caso de otomicosis (Szekely *et al.*, 2019; Abastabar *et al.*, 2019).



**Figura 2. Distribución de *C. auris* a nivel mundial**

Distribución actual de *C. auris* a nivel mundial. Tomado de (Ruiz-Gaitán y Del Pozo, 2021).

### 1.3. Característica de *C. auris*

*C. auris* es una levadura unicelular, mide de  $2,0-3,0 \times 2,5-5,0 \mu\text{m}$ , pertenece a la familia Metschnikowiaceae del orden *Saccharomycetales* y al género *Candida* (Satoh *et al.*, 2009). *C. auris* desarrolla colonias de color blanco a crema en agar dextrosa Sabouraud (SDA), habitualmente desarrolla colonias rosadas, moradas o blancas en CHROMagar (figura 3), se ha reportado que no desarrolla hifas, tubo germinativo y clamidosporas (García *et al.*, 2020; Borman *et al.*, 2016). Esta levadura emergente es capaz de tolerar altas concentraciones de cloruro de sodio ( $>10\%$  p/v), es termo tolerante, presenta un desarrollo óptimo a  $37^\circ\text{C}$ , pero se mantiene viable hasta  $42^\circ\text{C}$  (Kordalewska y Perlin, 2019; Kathuria *et al.*, 2015).



**Figura 3. Crecimiento de *C. auris* en medio CHROMagar**

Imagen donde se aprecia las transiciones morfológicas entre fenotipos de color de colonias de *C. auris*. Tomado de (CDC, 2022).

Microscópicamente se han reportado dos fenotipos de *C. auris* basadas en la agregación celular, células agregativas y células no agregativas (Borman *et al.*, 2016). Dentro de los distintos clados, se ha reportado que el fenotipo agregativo se observa en aislamientos de los clados (II y III) y la forma no agregativa, se observa en aislamientos del clado I y IV. Se ha reportado que los aislamientos de los clados II, III y IV son incapaces de desarrollar pseudohifas y solo los aislamientos del clado I son capaces de presentar esta morfología (Forgács *et al.*, 2020; Szekely *et al.*, 2019).

Con base al perfil bioquímico, *C. auris* tiene la capacidad de asimilar N-acetil glucosamina, succinato y gluconato como fuentes de carbono, tiene la capacidad de fermentar glucosa y sacarosa, además, utiliza como fuentes de nitrógeno sulfato de amonio, cadaverina y L-lisina. Los azúcares que no asimila esta levadura son la D- Xilosa y galactosa (Usca *et al.*, 202; Du *et al.*, 2021).

#### **1.4. Genoma de *C. auris***

Por otra parte, *C. auris* posee un genoma haploide, cuyo tamaño oscila entre 12.3-12.5 Mb, organizado en siete cromosomas, alrededor de 6500 genes los emplea para su metabolismo. Tiene un contenido de G+C entre el 44,5 % y 44,8 %, *C. auris* presenta una gran plasticidad de cariotipo (Chatterjee *et al.*, 2015). Existen diferencias entre los cuatro clados principales (I, II, III y IV) dichos clados difieren en al menos diez mil polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y el quinto clado está separado por más de 200.000 SNP de los otros clados encontrados (Lockhart *et al.* , 2017)

El análisis comparativo del contenido genético de un aislado de *C. auris* con *Candida albicans* demostró que algunos genes ortólogos asociados con la resistencia a los antifúngicos están presentes en *C. auris*, incluidos transportadores de fármacos, proteasas secretadas y manosil transferasas (Íbidem *et al.*, 2015).

Además, los estudios genómicos mostraron que los objetivos de varias clases de fármacos antifúngicos se conservan en *C. auris*, tales como la lanosterol 14-alfa-desmetilasa, es una enzima codificada por el gen *ERG11*, la cual es clave de la vía de biosíntesis del ergosterol y el objetivo principal de los fármacos azoles. Así como también el objetivo de las equinocandinas, la 1,3-beta-glucano sintasa enzima codificada por el gen *FKSI*, dicha enzima se encarga de la

biosíntesis del glucano, componente de la pared celular (Chowdhary *et al.* 2018).

### **1.5. Colonización**

Esta levadura se considera un patógeno emergente que puede causar infecciones graves, se transmite de un paciente a otro, los pacientes pueden estar colonizados y portar a esta levadura en alguna parte del cuerpo y no desarrollar una infección grave. *C. auris* es capaz de colonizar diversas áreas anatómicas como: fosas nasales, boca, conducto auditivo, inglés, axilas y recto (Zuluaga-Rodríguez, 2020).

También puede encontrarse colonizando una variedad de superficies y objetos, incluyendo material quirúrgico, equipos médicos, colchones y almohadas debido a que esta levadura es capaz de formar biopelículas la cual le confiere la capacidad para colonizar la piel, persistir en el ambiente hospitalario, resistir la terapia antimicrobiana y causar enfermedades invasivas (Horton y Nett, 2020).

### **1.6. Patogenicidad y factores de virulencia**

*C. auris* comparte factores de virulencia con la especie *Candida albicans*, como son la producción de proteasas, fosfolipasas y hemolisina, cuyos factores de virulencia cumplen funciones especializadas durante el proceso infeccioso. Dichas enzimas se encargan de la digestión y/o degradación de las células del hospedero favoreciendo así el proceso de adhesión e invasión de los tejidos (Hernando-Ortiz *et al.*, 2021; Castrillón *et al.*, 2005).

Esta levadura es capaz de formar biopelículas, la cual le confiere la capacidad para colonizar la piel, persistir en el ambiente hospitalario, la resistencia a los antifúngicos y causar enfermedades invasivas. El análisis de esta matriz extracelular reveló la presencia de polisacáridos, como los complejos de mananoglucano, involucrado con el secuestro de

antifúngicos, evitando que estos puedan alcanzar sus dianas celulares (Du *et al.*, 2020; Horton y Nett, 2020).

La producción de matriz extracelular confiere mayor protección frente los antifúngicos, logrando atrapar entre el 50 y 90% del antifúngico, especialmente el fluconazol. Además, la biopelícula producida por *C. auris* le permite mejor establecimiento y persistencia en ambientes bióticos y abióticos por largo tiempo (Welsh *et al.*, 2017).

Se ha reportado que los aislamientos con fenotipo agregativo son menos virulentos que los que presentan el fenotipo no agregativo. Los fenotipos agregativos de *C. auris* se han aislado predominantemente de pacientes colonizados y tienen una mayor capacidad de formación de biopelículas que los fenotipos no agregativos (Ahmad y Alfouzan, 2021).

### **1.7. Identificación de *C. auris* en el laboratorio**

El primoaislamiento de *C. auris* se realiza a partir de muestra clínica en medios como agar Sabouraud (SDA) a 30-37 °C durante 24-72 h. También se pueden emplear otros medios selectivos como CHROMagar, sin embargo, es difícil de diferenciar a *C. auris* empleando este medio, debido a que no se puede distinguir de otras especies como de *Candida glabrata*, miembros del complejo *Candida haemulonii*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii* y *Candida famata* las cuales también forman colonias de color rosa (Khan *et al.*, 2017). Por lo que la identificación microbiológica de esta especie debe realizarse mediante pruebas moleculares como la PCR-Secuenciación (Welsh *et al.*, 2017).

Los sistemas automatizados como VITEK 2, BD Phoenix y API 20, los cuales emplean tarjetas desechables que permiten determinar la asimilación de azúcares y aminoácidos por el patógeno

en cuestión, lo que permite la identificación de *C. auris*. Sin embargo, si estos sistemas no cuentan con versiones más recientes existe una alta probabilidad de que el equipo confunda a *C. auris* con otra especie del género con están genéticamente relacionadas (Ambaraghassi *et al.*, 2019). En la actualidad, las técnicas más eficientes para confirmar la identidad de *C. auris* son basadas en espectrometría de masas MALDI-TOF MS y métodos moleculares (Du *et al.*, 2020).

### **1.8. Confirmación molecular de los aislamientos de *C. auris***

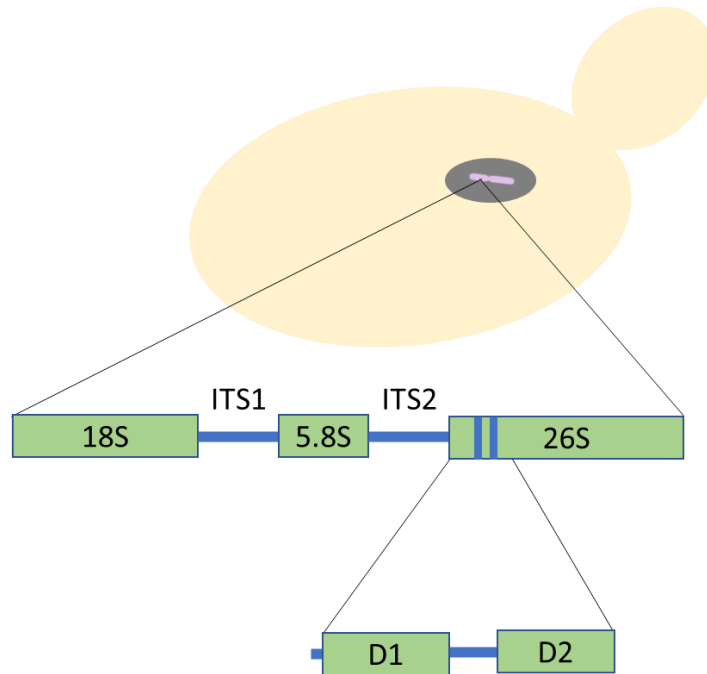
Actualmente, para identificar de manera correcta a esta levadura, se recomiendan complementar las pruebas de microbiología clásica con métodos moleculares, o bien, el uso de la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) que arroja resultados confiables (Carvajal-Valencia *et al.*, 2020).

Dentro de las técnicas para identificación molecular, las más socorridas es la PCR-Secuenciación de la región del espaciador transcrito interno ITS1-ITS2 “*Internal Transcribed Spacers*” (ITS, por sus siglas en inglés), estas regiones forman parte de la matriz de ADN<sub>r</sub> y se encuentra entre las regiones codificantes de ADN<sub>r</sub>. El cistrón del ADN ribosómico nuclear (ADN<sub>r</sub>) codifica los ARN<sub>r</sub> de las subunidades ribosómicas pequeñas (ARN<sub>r</sub> 18S) y grandes (ARN<sub>r</sub> 5.8S y 26S) (Peña *et al.*, 2017).

La región ADN<sub>r</sub> contiene dos espaciadores, el espaciador transcrito interno ITS1, el cual se encuentra entre los genes 18S y 5.8S e ITS2, el cual reside entre los genes 5.8S y 26S. Dichas regiones están dispuestos en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma de las levaduras entre 100 y 200 veces (Vásquez *et al.*, 2016).

También se emplea la región de dominio D1/D2 de la subunidad grande ribosomal “*Large*

*Subunit Ribosomal*” (LSU, por sus siglas en inglés), tanto las regiones de ITS y la región D1/D2 contienen mosaicos de regiones conservativas con suficiente variabilidad para definir la especie (figura 4) (Arbefeville *et al.*, 2017).



**Figura 4. Representación esquemática de la región de ITS y D1/D2 del ADNr**

Estructura genética del ADNr. La región de ITS se encuentra flanqueado por los genes 18S, 5.8S y 26S. Pérez Vázquez, autoría propia.

Otros métodos para la caracterización molecular de *C. auris* son la electroforesis de campo pulsado, “*Pulse Field Gel Electrophoresis*” (PFGE por sus siglas en inglés), la tipificación multilocus de secuencia “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST, por sus siglas en inglés), la determinación de polimorfismos en longitud del fragmento amplificado “*Amplified Fragment Length Polymorphism*” (AFLP, por sus siglas en inglés) (Girard *et al.*, 2016).

Actualmente la secuenciación de genoma completo “*Whole Genome Sequencing*” (WGS, por sus siglas en inglés), se emplea para caracterizar, detectar introducciones, mezcla filogeográfica y la dinámica de transmisión de *C. auris* (Chow *et al.*, 2020).

## **1.9. Tratamiento para las fungemias**

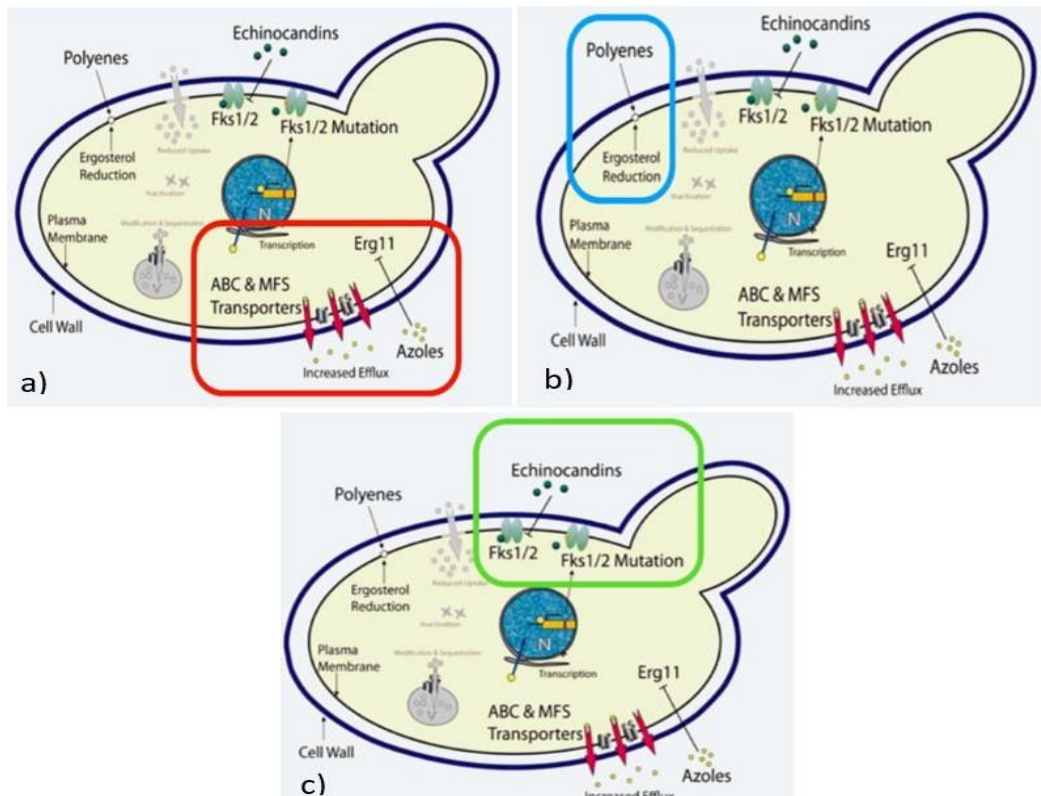
Actualmente existe distintas clases de antifúngicos que ayudan a combatir las infecciones fúngicas invasivas. El tratamiento de primera línea consiste en administrar derivados de azoles, el fluconazol es el azol más empleado y se emplea de (200-800 mg/día, por vía oral o intravenosa). Cuando la terapia por azoles falla, debido a que haya resistencia se emplean, los polienos como la anfotericina B en dosis de se emplean dosis de 0,2–1,5 mg/kg/día, si la terapia con este antifúngico falla, por última instancia se emplean los fármacos de tercera línea como las equinocandinas (anidulafungina) y se recomienda usar dosis de (100 mg/día o 2 mg/kg/día) (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009; Pachón *et al.*, 2006).

## **1.10. Mecanismos de acción de los antifúngicos**

Los azoles fármacos de primera elección actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol, componente principal de las membranas fúngicas. actúan inhibiendo la actividad enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa, enzima codificada por el gen *ERG11*, lo cual conduce a la formación de una membrana con una alteración estructural y funcional (figura 5a) (Nocua-Báez *et al.*, 2020).

Por otra parte, la anfotericina B actúa uniéndose al ergosterol generando la formación de canales en la membrana, alterando así la permeabilidad de la membrana provocando la salida de iones y moléculas carbonadas (figura 5b) (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

Por su parte, las equinocandinas inhiben a la enzima b-1,3-D-glucano sintasa, estos fármacos se une a la subunidad activadora (FKS) evitando así la formación del glucano, componente principal de la pared celular, provocando lisis celular (figura 5c) (Barker *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2020).



**Figura 5. Mecanismo de acción de las tres clases de antifúngicos**

Representación esquemática del mecanismo de acción de las tres clases de antifúngicos. A) en el recuadro rojo, se señala el mecanismo de los azoles, los cuales inhiben la síntesis del ergosterol. b) en el recuadro celeste se encierra cómo actúan los polienos, se unen al ergosterol en la membrana. c) en el recuadro verde se encierra el mecanismo de las equinocandinas, estos fármacos inhiben la síntesis de glucano. Tomado de (Organización Panamericana de la Salud, 2019).

### 1.11. *C. auris* especie resistente los antifúngicos

*C. auris* es una levadura multidrogresistente (MDR), el 90 % de los aislamientos son resistentes a fluconazol, en un 35 % a anfotericina B y en menor proporción 5% equinocandinas. Dicha resistencia tiene un gran impacto en el manejo terapéutico, debido a que está relacionado con una tasa alta de mortalidad (30-60 %) lo que ha generado alertas sanitarias a nivel mundial (Chowdhary *et al.*, 2018; Pathirana *et al.*, 2018).

Los aislamientos de *C. auris* que presentan resistencia a dos clases de antifúngicos se les consideran multidrogresistentes (MDR) y aquellos que presentan resistencia a las tres clases se les denominan extremadamente resistente (XDR) (Du *et al.*, 2020).

La resistencia a los antifúngicos está muy extendida en los aislamientos de clado I (Sur de Asia), estos son abrumadoramente resistentes al fluconazol, presentan resistencia variable a la anfotericina B y adquieren resistencia a las equinocandinas, la mayoría de los aislamientos son MDR y pocos aislamientos XDR. Los aislamientos del clado II (Este de Asia), son sensible a las tres clases de antifúngicos, los aislamientos del clado III (Sudáfrica) presentan resistencia a los azoles, anfotericina B e inclusive a las equinocandinas, los aislamientos del clado IV (Sudamericano) presentan resistencia variable a la anfotericina B y al fluconazol (Jacobs *et al.*, 2022; Escandón *et al.*, 2019).

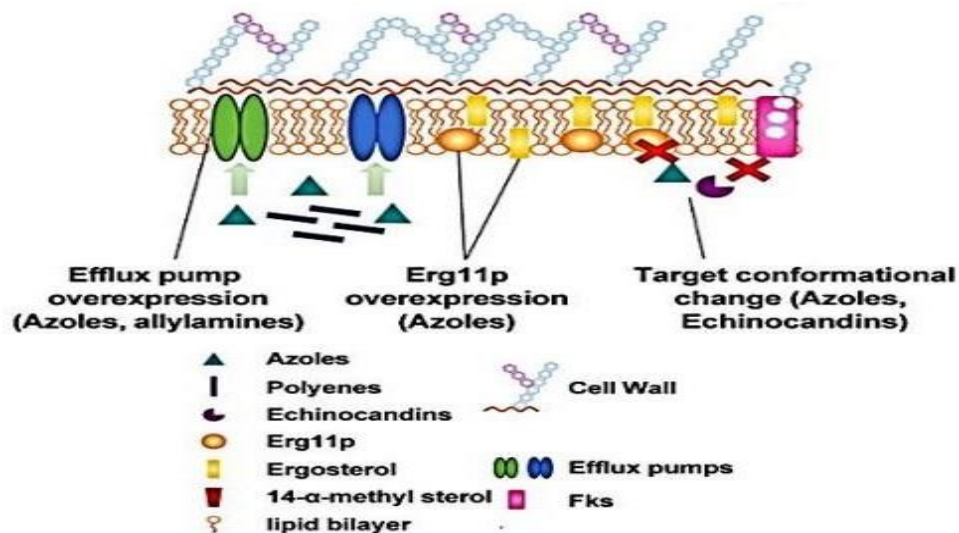
Actualmente no se ha determinado el punto de corte para *C. auris*, debido a que esta especie, presenta una alta diversidad genética, intra e inter clado, pues se ha observado que entre diferentes aislamientos de este muestran perfiles de susceptibilidad variables (Zhu *et al.*, 2020).

### **1.12. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos**

*C. auris*, se caracteriza principalmente por ser resistente a fluconazol, esta resistencia está generalmente relacionada con mutaciones en *ERG11*, dicho gen codifica para la lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa enzima necesaria para la síntesis del ergosterol, esterol importante de la membrana, estas mutaciones alteran los sitios catalíticos de la enzima impidiendo que los azoles ejerzan su acción (Chaabane *et al.*, 2019).

Se han reportado tres mutaciones en dicho gen (F126T, Y132F y K143R). Dichas mutaciones están fuertemente asociadas con los clados de *C. auris*, la mutación F126T se encuentra únicamente entre los aislamientos clínicos del clado III (Sudáfrica), la mutación Y132F y K143R se encuentra entre los aislamientos clínicos del clado I y IV (Sur de Asia y Sudamericano, respectivamente) (Chowdhary *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2018).

Ben-Ami *et al.*, 2017, ha reportado que la resistencia a los azoles puede deberse en parte a una sobre expresión de bombas de flujo del tipo ABC, estas bombas son uno de los principales mecanismos de resistencia a los azoles en especies patógenas de *Candida* (figura 6).



**Figura 6. Mecanismos de resistencia a las tres clases de antifúngicos**

Figura representativa de los mecanismos de resistencia a las tres clases de fármacos. Tomado de (Barker *et al.*, 2020).

La resistencia a los polienos a un no está bien definida, pero se ha reportado que se debe a distintos mecanismos como la disminución de las cantidades de ergosterol en la membrana o un recambio de esteroides de menor afinidad por los polienos como fecosterol, también se ha relacionado con mutaciones en *ERG2*, *ERG3* y *ERG6* (Rhodes *et al.*, 2018).

Actualmente hay cepas de *C. auris* que presentan resistencia a las equinocandinas, esta resistencia está relacionada con mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2*, los cuales codifican para subunidades catalíticas de la enzima beta (1,3) D-glucano sintasa cuya proteína está encargada de la de la síntesis del D- glucano, componente principal de la pared de celular las levaduras. Las equinocandinas inhiben esta enzima, disminuyendo la cantidad de glucanos en la pared. Dichas mutaciones, se ubican en dos regiones (puntos calientes 1 y 2 o HS1 y HS2) la mutación que se ha reportado para aislamientos de *C. auris* resistente es S639F, la cual se encuentra en el gen *FKS1* HS1, dicha mutación conduce a un cambio conformacional en la

proteína evitando así la unión de las equinocandinas a su blanco diana (Hirayama *et al.*, 2023; Hou *et al.*, 2019).

### **1.13. Determinación del perfil de susceptibilidad por métodos estándar**

Actualmente para determinar la susceptibilidad a los antifúngicos para *C. auris* se emplean varias pruebas estandarizadas, incluidos los métodos de microdilución en caldo del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) y del Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST, por sus siglas en inglés), el método de difusión en gradiente E-test y el sistema de susceptibilidad antifúngica VITEK 2 (Arendrup *et al.*, 2017).

Actualmente no existen puntos de cortes para *C. auris*, debido a que los aislamientos exhiben una susceptibilidad variable (Zhu *et al.*, 2020). Por lo que los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, (CDC por sus siglas en inglés), propuso puntos de corte clínicos tentativos de los cuales se considerará a un aislamiento resistente, y cuando presenten CIMs  $\geq 2$  mg/L para anfotericina B;  $\geq 4$  mg/L para anidulafungina y micafungina, para caspofungina  $\geq 2$  mg/L y para fluconazol  $\geq 32$  mg/L (CDC, 2020).

### **1.14. Prevención y control de *C. auris***

Dado que *C. auris* presenta una tasa alta de transmisión nosocomial, distintos estudios han demostrado que esta levadura perdura por semanas en el ambiente hospitalario, por lo que la limpieza correcta, así como el aislamiento de los pacientes infectados es la clave para evitar la propagación de los brotes (Horton y Nett, 2020).

Los Centros para el Control y prevención de Enfermedades (CDC), recomiendan que se debe realizar la desinfección y limpieza exhaustivas de las habitaciones de los pacientes, así como también se deben limpiar y desinfectar los equipos que se comparten antes de que se empleen en otros pacientes. Así como también un adecuado lavado de manos del personal de salud (Cáceres *et al.*, 2019).

Esta levadura presenta no solo presenta resistencia a los fármacos, sino que también a desinfectantes que se usan comúnmente en los hospitales, por ejemplo, el ácido peracético, el hipoclorito de sodio e incluso los compuestos de amonio cuaternario. Por lo que se recomienda emplear desinfectantes que se encuentren registrados ante *Environmental Protection Agency* (EPA, por sus siglas en inglés) los cuales son eficaces contra *Clostridium difficile* como lo es (*Oxivir 1*) limpiador a base de peróxido de hidrógeno (Zuluaga-Rodríguez, 2020).

### **1.15. Antecedentes**

Calvo y cols, reportaron el primer brote de *C. auris* en América, sucedió en Venezuela durante el 2012. Se recuperaron 18 aislamientos a partir de hemocultivo, 13 fueron de origen pediátrico y cinco pertenecieron a adultos, todos ellos se encontraban en UCI. Además, corroboraron que el sistema VITEK 2 identificó erróneamente a los 18 aislamiento como *C. haemulonii* y la identidad de *C. auris* fue confirmada por PCR-secuenciación de la región TS1-ITS2 y análisis de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés). Todos los aislamientos fueron resistentes a fluconazol (Calvo *et al.*, 2016).

Ayala-Gaytán y cols., fueron los primeros en identificar un caso de *C. auris* en México, a partir de una muestra de hemocultivo obtenida de una paciente con endometriosis severa. Del aislamiento, se identificó *C. auris* y *C. parapsilosis* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y PCR-Secuenciación del espaciador del transcrito interno ITS1-ITS2, así como de la

región de dominio D1/D2 de la subunidad 26S del ADNr. El análisis de las secuencias reveló que dicho aislado perteneció al clado IV (sudamericano), el cual fue resistente a dos fármacos de primera y segunda elección: fluconazol y a la anfotericina B (Ayala-Gaytán *et al.*, 2021).

Villanueva-Lozano y cols., describieron el brote de *C. auris*, derivado del primer caso en México. Los autores identificaron tres meses después del primer caso 12 aislamientos provenientes de pacientes que se encontraban internados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del mismo hospital y que cursaron, con la COVID 19; asimismo, recuperaron tres aislamientos de esta levadura a partir de material inerte dentro de las habitaciones de dichos pacientes. Del mismo modo, la identificación de *C. auris* la hicieron mediante MALDI-TOF y el resultado se corroboró mediante PCR-secuenciación del espaciador transcrito interno ITS1-ITS2, la región de los dominios D1/D2 del ADNr y los genes *RPB1* y *RPB2*, éstos último codifican para las subunidades de la ARN polimerasa II. Todos los aislamientos pertenecieron al clado IV (Sudamericano) y de igual forma resultaron resistentes al fluconazol y a anfotericina B (Villanueva-Lozano *et al.*, 2021).

González-Durán y cols., describieron el papel del laboratorio de referencia nacional InDRE para la identificación y caracterización de *C. auris* mediante técnicas microbiológicas clásicas de laboratorio, incluyendo el crecimiento en medios especiales y la evaluación de la morfología de los aislamientos. Además, confirmaron, la identidad de la especie mediante una PCR, específica de *C. auris*; Así mismo, identificaron el clado involucrado mediante PCR-secuenciación de la región de ITS. El algoritmo de diagnóstico propuesto permitió diferenciar cuatro aislamientos como *C. auris* de otras especies fúngicas presentes en las muestras. Los autores observaron dos morfologías diferentes entre los cuatro aislamientos, donde tres aislamientos se observaron células esféricas con blastoconidios, sin presencia de hifas y

pseudohifas, el cuarto aislamiento se observó célula esférica con presencia de pseudohifas rudimentarias.

El análisis filogenético de la región de ITS reveló la presencia de dos clados diferentes de *C. auris* circulando en México, el clado I (sur de Asia) y el clado IV (Sudamericano), los cuales fueron consistentes con las dos morfologías encontradas. Todos los aislamientos de *C. auris* fueron resistentes a fluconazol. (González-Durán *et al.*, 2022).

Healey y cols., realizaron la identificación del perfil resistente al fluconazol y equinocandinas por métodos moleculares, los estudios realizados por mediante PCR-Secuenciación permitieron identificar las mutaciones puntuales en el gen *ERG11*, mutaciones relacionadas con la resistencia a fluconazol) en 40 aislamientos originarios de India (clado I) y 56 aislamientos de Colombia (clado IV). El 99% de los aislamientos del clado I (Sur de Asia) fueron resistentes tanto al fluconazol como al voriconazol, dichos aislamientos contenían una sustitución Y132F o K143R en dicho gen, solo un aislamiento presentó un perfil de susceptibilidad y genotipo silvestre. por otro lado, los aislamientos del clado IV (Sudamericano), fueron más susceptibles a los azoles que los aislamientos del clado I (Healey *et al.*, 2018).

Al-jindan y cols., describieron seis nuevos casos de *C. auris* en Arabia Saudita. La identidad de los seis aislamientos la realizaron mediante MALDIT-OF, el perfil de resistencia lo determinaron utilizando el sistema VITEK, confirmaron la identidad de los aislamientos mediante PCR- Secuenciación del espaciador transcrito interno ITS1-ITS2 y detectaron genes asociados con la resistencia a los antifúngicos, *ERG11* y *FKS1*. Los seis aislamientos se ubicaron dentro del clado I (Sur de Asia), el análisis del gen *ERG11* reveló la presencia de dos mutaciones asociadas a la resistencia (F132Y y K143R) y no se detectaron mutaciones en los

genes *FKS1*. Todos los aislamientos eran resistentes al fluconazol y tres fueron resistentes a anfotericina B (Al-jindan *et al.*, 2021).

de Almeida y cols identificaron los primeros casos de *C. auris* clado I (Sur de Asia) en Brasil, los cuales fueron recuperados a partir de la punta de catéter de pacientes que cursaban con COVID-19. Los autores confirmaron la identidad de los aislamientos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y PCR-Secuenciación del espaciador del transcrito interno ITS1- ITS2. Además, determinaron la clonalidad de los aislamientos mediante la técnica de repeticiones cortas en tándem (Short Tandem Repeats STR, por sus siglas en inglés) y buscaron mutaciones asociadas a la resistencia a fluconazol y equinocandinas mediante PCR-Secuenciación de genes *ERG11* y *FKS*. Los dos aislamientos estudiados resultaron ser clonales y están estrechamente relacionados con el clado I, los cuales fueron susceptibles a las tres clases de antifúngicos, además no se evidenciaron mutaciones en los genes *ERG11* y *FKS1*. Este es el primer reporte de *C. auris* del clado I en América Latina (de Almeida *et al.*, 2021).

Lockhart y cols, realizaron un análisis epidemiológico de 54 aislamientos provenientes de Pakistán, India, Sudáfrica y Venezuela durante 2012-2015. Dicho análisis lo realizaron mediante secuenciación completa del genoma (WGS) en colaboración con Los Centros para el Control y Prevención de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés). Los autores reportaron que el 93% de los aislamientos fueron resistentes al fluconazol, el 35% a la anfotericina B y el 7% a las equinocandinas. Además, el 41% de ellos fue resistente a dos clases de antifúngicos, mientras que el 4% presentó resistencia a tres clases de antifúngicos. Tras realizar un análisis completo del genoma de los 54 aislamientos, se observó que estos se agrupaban en clados. Al igual reportaron diferentes mutaciones en *ERG11*, las cuales están asociadas con resistencia a los azoles en cada clado geográfico (Lockhart *et al.*, 2017).

## **CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **2.1. Justificación**

Previo a la contingencia sanitaria del SARS-CoV-2 *C. auris* no se había detectado en México, es posible que este virus, haya contribuido en la emergencia de este patógeno en el país. Actualmente en México, circulan dos clados de *C. auris* (I y IV) responsables de fungemias, evidencia científica muestra que aislamientos pertenecientes al clado I en general son multirresistentes. Por tal razón, resulta de interés la caracterización microbiológica y molecular de estos aislamientos con el fin de contribuir en la vigilancia epidemiológica de este patógeno emergente.

### **2.2. Hipótesis**

En el estado de Tabasco, se identificó a *C. auris* perteneciente al clado I. Dada las características de este patógeno, se espera encontrar en el periodo de estudio comprendido (junio 2021 a junio 2022) predomine únicamente aislamientos pertenecientes a este clado y presenten un perfil de multirresistencia.

### **2.3. Objetivo general**

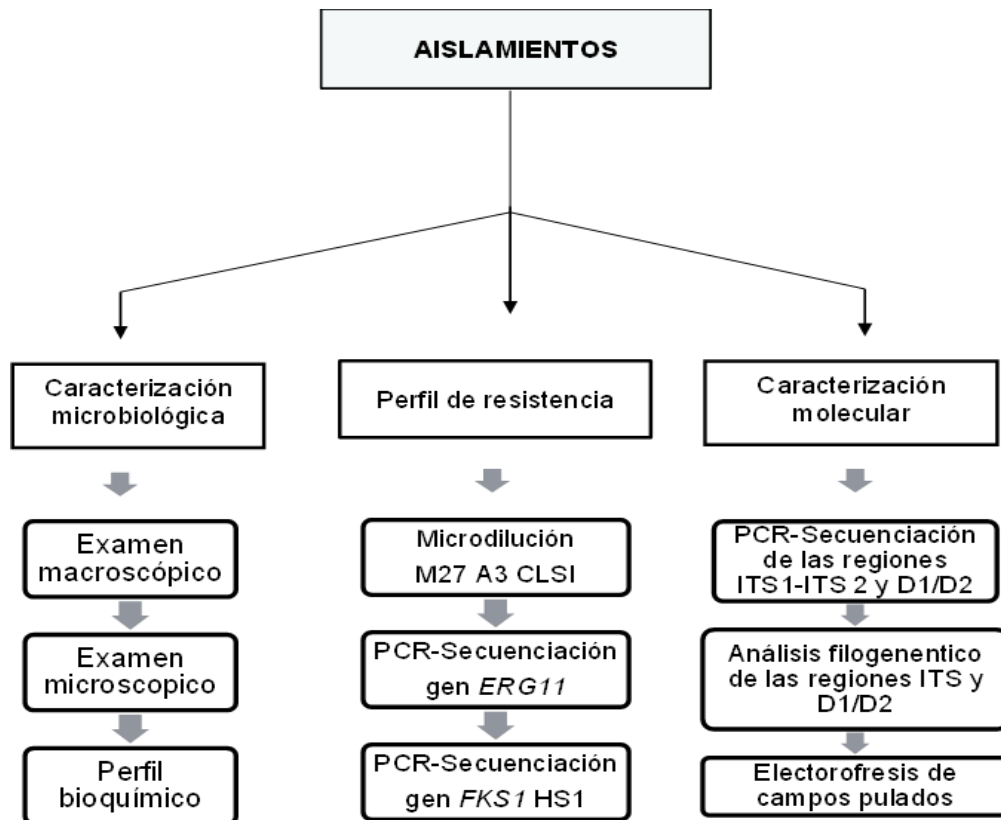
Caracterización molecular de los aislamientos de *C. auris* en el estado de Tabasco.

### **2.4. Objetivos particulares**

1. Caracterización macro y microscópica de los aislamientos de *C. auris* mediante pruebas microbiológicas.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria para fluconazol, anfotericina B y caspofungina.
3. Confirmar la identidad de *C. auris* mediante PCR universal y específica.
4. Identificar el clado de los aislamientos mediante la región ITS1-ITS2 y la región de dominio D1/D2 del gen 26S del ADN ribosomal.
5. Detección de mutaciones puntuales en los genes *ERG11* y *FKSI* involucrados en la resistencia a fluconazol y equinocandinas.
6. Determinar la clonalidad de las cepas de *C. auris* causantes del brote.

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Diagrama de flujo experimental



### 3.2. Selección de muestras

Se trabajaron 20 aislamientos de *Candida* spp provenientes del municipio de Villahermosa Tabasco, los cuales se obtuvieron de la colección del Laboratorio del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), perteneciente a la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México. Estos aislamientos fueron recolectados por el laboratorio de Micología del mismo instituto para su identificación y descartar la presencia de *C. auris* en el periodo de junio 2021 a junio de 2022.

Los 20 aislamientos provinieron de diversas fuentes humanas, que incluyeron muestras de secreción bronquial, urocultivos y solo uno a partir de superficie (punta de catéter). En la tabla 1, se indica la clave interna del aislamiento, la fuente de aislamiento, el hospital de donde se recuperó la muestra sospechosa de *C. auris* e identificación previa.

**Tabla 1. Datos epidemiológicos del universo de muestras**

CEPA	HOSPITAL	FUENTE	SEXO	EDAD	COMORBILIDAD	Identificación previa SISTEMA VITEK
MYC 43-21	Dr. Juan Graham Casasús	Secreción bronquial	F	54	COVID-19	<i>C. auris</i>
MYC 67-21	Dr. Juan Graham Casasús	Urocultivo	F	53	COVID-19	<i>C. auris</i>
MYC 82-21	Dr. Juan Graham Casasús	Urocultivo	F	59	COVID-19	<i>C. auris</i>
MYC101-21	Dr. Juan Graham Casasús	Hemocultivo	M	47	COVID-19	<i>C. auris</i>
MYC 57-22	Dr. Gustavo A Roviroso Pérez	Hemocultivo	F	31	Quemaduras de tercer grado	<i>C. haemulonii</i>
MYC 97- 22	Dr. Juan Graham Casasús	Hemocultivo	M	54	COVID-19	<i>C. auris</i>
MYC 68-21	Dr. Juan Graham Casasús	Hemocultivo	M	43	COVID-19	<i>C. duobushaemulonii</i>
MYC 23-22	Dr. Juan Graham Casasús	Hemocultivo	M	40	COVID-19	<i>C. duobushaemulonii</i>
MYC 80-21	Dr. Juan Graham Casasús	Urocultivo	M	54	COVID-19	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 81-21	Dr. Juan Graham Casasús	Secreción bronquial	M	57	COVID-19	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 122-21	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	F	R/N	Atresia intestinal	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 1-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	F	2 meses	Gastrosquisis	<i>C. duobushaemulonii</i>
MYC 21-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	F	19	Puerperio tardío	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 22-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	F	19	Puerperio tardío	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 45-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	M	76	COVID-19	<i>C. glabrata</i>
MYC 65-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	M	1 mes	Distrés respiratorio	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 66-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	M	19 días	Distrés respiratorio	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 67-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Punta de catéter	M	19 días	Distrés respiratorio	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 96-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	M	24 días	Síndrome de dificultad respiratoria	<i>C. parapsilosis</i>
MYC 109-22	Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer	Hemocultivo	F	1 mes	Síndrome de dificultad respiratoria	<i>C. parapsilosis</i>

### **3.3. Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos de *C. auris***

Inicialmente se realizó un primo aislamiento en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) a 37 °C por 48 h. Una vez verificada la pureza de los aislamientos, la caracterización macroscópica se realizó mediante la resiembra en los medios selectivos de CHROMagar y Agar Biggy a 30 °C a por 48 h.

La identificación macroscópica de los aislamientos se hizo a partir del cultivo en Agar Dextrosa Sabouraud (BD Bioxon), describiendo el color de las colonias, borde y consistencia. Colonias sospechosas de *C. auris* en CHROMagar Candida (Becton Dickson) suelen aparecer de color blancas o rosadas, pero algunas colonias pueden verse rojas o moradas y en agar Biggy (MCD Lab), se observan color café claro.

### **3.4. Caracterización microscópica de los de *C. auris***

La caracterización microbiológica de los aislamientos de *C. auris* se realizó mediante las siguientes pruebas: producción de clamidosporas, prueba de tubo germinal y el perfil bioquímico.

#### **3.4.1. Producción de clamidosporas**

Esta prueba se basa en estimular la filamentación y la producción de clamidosporas en levaduras del género *Candida*, empleando un medio pobre en nutrientes, exento de glucosa, pero con la cantidad mínima de nutrientes necesaria para el desarrollo fúngico. Para esta prueba, se empleó la técnica de Dalmau, la cual consistió en sembrar una colonia con estrías en paralelo en agar harina de maíz (Sigma) se colocó un cubreobjetos estéril sobre la siembra y se incubó a 30 °C por 72 h. Para la lectura se colocó la caja Petri al microscopio y sin retirar el cubreobjeto, se

observó el crecimiento con los objetivos de 10X y 40x para la identificación de clamidosporas.

### **3.4.2. Prueba de tubo germinativo**

La prueba del tubo germinativo consiste en incubar la levadura en suero humano o de caballo en tiempo de 2 horas con el fin de estimular el brote del micelio (tubo germinativo). Dicha prueba se realizó inoculando una colonia de los aislamientos de *C. auris* en 0.5 ml de suero de humano y se incubó a 37 °C durante 2-4 horas. Posterior al tiempo de incubación, se colocó 2 gotas de la suspensión en un portaobjeto y se cubrió y se observó al microscopio con objetivo de 40X en búsqueda de dicha estructura.

### **3.4.3. Perfil bioquímico**

El sistema VITEK® 2 (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO, EE. UU.) es un equipo que identifica y establece el patrón de sensibilidad de diversos microorganismos. La tarjeta YST permite identificar levaduras de importancia clínica y organismos relacionados a través de pruebas bioquímicas, las cuales incluyen asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos y detección de oxidasas.

La identificación se realizó a partir del crecimiento en (SDA) de 48 h a 37 °C se seleccionaron colonias aisladas y se colocaron en 2.5 ml de NaCl al 0.45%. Se ajustó a una turbidez en un rango de 1.8 a 2.0 unidades en la escala McFarland empleando el densitómetro DensiChek™ Plus de VITEK® 2. Se colocó el tubo de ensayo con la suspensión en la tarjeta de identificación dentro en el casete, se colocó el casete con las muestras en el sistema VITEK 2 YST v 8.01 acorde con las instrucciones del fabricante. Se revisó la lectura a las 24 h y se registró el nivel de confianza para cada aislamiento.

### 3.5. Determinación del perfil de susceptibilidad a los antifúngicos

La prueba de susceptibilidad antifúngica, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se realizó mediante el método de microdilución en caldo empleando RPMI 1640, siguiendo documento de El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) M27-A3 4ª edición, noviembre de 2017.

Los antifúngicos evaluados fueron anfotericina B (Sigma Aldrich), fluconazol (Sigma Aldrich) y caspofungina (Sigma Aldrich) (tabla 2). Los fármacos caspofungina y fluconazol se disolvieron en agua estéril, mientras que la anfotericina B se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO).

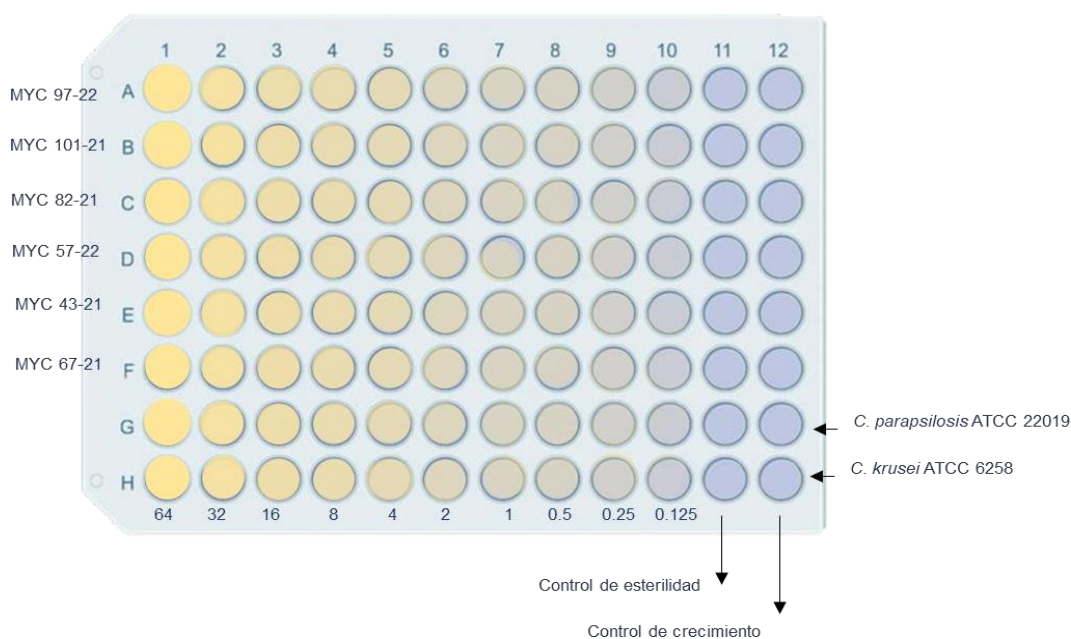
**Tabla 2. Concentración de los antifúngicos empleados**

Antifúngico	Potencia (µg/mg)	Concentración del antifúngico	Solvente	Concentraciones por determinar (µg/mL)
Fluconazol	980	1200	Agua	0.125 – 64 µg
Anfotericina B	970	1200	DMSO	0.015 – 8 µg
Caspofungina	750	1600	Agua	0.03 – 16 µg

Inicialmente, se preparó una suspensión celular de cada aislamiento a probar a una turbidez de 0.5 unidades en la escala McFarland, a partir de un cultivo de 48 h, incubado a 37°C en medio Sabouraud. Para la realización de la microdilución se empleó una placa de 96 pozos, fondo en U, la cual se preparó acorde con la (figura 7) en la que se indican los controles de la reacción y las diluciones del inóculo. Para las diluciones, en la primera columna se agregó 200 µl del fármaco y se realizó diluciones seriadas desde las columnas 2-10, cada columna con un volumen de 100 µl, de medio RPMI 1640 M (Gibco®) con glutamina sin bicarbonato con 2%

de glucosa ajustado a pH 7 con MOPS 0,165. La columna 11 se empleó de control de esterilidad y se usó medio RPMI 1640, la columna 12 se empleó como control de crecimiento de cada una de las cepas analizadas. La placa se inoculó a partir de la fila A hasta la F con 100 µl del inóculo de cada aislamiento a una concentración final de  $1 \times 10^3$ - $5 \times 10^3$  UFC/ml. se usaron cepas de referencia *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como cepa sensible *Candida krusei* ATCC 6258 como cepa resistente inocularon en las filas G y H, respectivamente.

Se hizo una placa por cada antifúngico a estudiar (fluconazol, anfotericina B y caspofungina), las placas de microtitulación se incubaron a 35 °C y se leyeron visualmente después de 24 h y 48 h. La prueba se realizó por duplicado por cada antifúngico.



**Figura 7. Microdilución en caldo para la evaluación antifúngica de los aislamientos de *C. auris***  
Representación gráfica de la evolución de la concentración mínima inhibitoria, mediante microdilución en caldo. Pérez Vázquez, autoría propia.

La lectura de las placas se validó con base al control de esterilidad, se comparó el desarrollo obtenido en el pozo control de cada cepa con la presencia o ausencia del crecimiento en cada pozo con las concentraciones del fármaco, esta lectura se hizo bajo iluminación normal del laboratorio.

La CMI para la anfotericina B se definió como la concentración más baja donde no hay crecimiento. Mientras que para el fluconazol y caspofungina la CMI se definió como la concentración más baja a la que hubo una disminución del 50 % en el crecimiento.

### **3.6. Caracterización de *C. auris* mediante biología molecular**

La caracterización molecular se llevó a cabo mediante PCR-Secuenciación de dos regiones ITS1-ITS2 y Dominio D1/D2, el análisis filogenético de ambas regiones para conocer el clado al que pertenecieron los aislamientos.

### **3.7. Lisis celular**

A partir de un cultivo puro en agar Sabouraud incubado a 37 ° C por 48 h, se seleccionaron dos colonias aisladas y se colocaron en 1.5 ml de solución salina al 0.85%. se ajustó a una turbidez en un rango de 1.8 a 2.0 unidades en la escala McFarland empleando el densitómetro Densichek posteriormente se extrajo el ADN por choque térmico, calentamiento inicial a temperatura de ebullición por 25 minutos, seguido de criotratamiento a -20 °C y se conservó a esa temperatura hasta su uso (PCR).

### **3.8. Extracción de ADN genómico**

El procedimiento de extracción del ADN genómico (ADNg) se realizó con base al protocolo modificado de Vingataramin y Frost.

Se sembraron las cepas en medio Saboraud a 37 °C por 48 h, se colocaron dos colonias en un tubo Eppendorf con medio Saboraud líquido y se incubó a 37 °C por 72 h. Posterior al crecimiento se centrifugó a 14000 rpm / 3 min y se desechó el sobrenadante, se adicionó 500 µL de PBS 1x estéril, se homogenizó con vortex 15 segundos, se centrifugó a 14000 rpm / 1 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en 100 µL de PBS 1x estéril y se adicionó 455 µL de la solución EtNa (Et: para etanol y Na: para NaOH), y se homogenizó con vortex por 15 s. Se incubó el tubo a 80 °C por 10 min y homogenizó con vortex por 15 seg, posteriormente se adicionó toda la mezcla a una columna (QIAamp® DNA BLOOD MINI KIT) y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min.

Se transfirió la columna a un tubo limpio y se desechó el filtrado. Se adicionó 500 µL del buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm/1 min, se descartó el filtrado y se pasó la columna a un tubo nuevo. Se adicionó 500 µL del buffer AW2 y se centrifugó a 12900 rpm/ por 4 min, se descartó el filtrado. Se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se adicionó 50 µL de AE, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 8000 rpm/1 min, se volvió adicionar 50 µL de AE y se centrifugó a 8000 rpm / 1 min y se conservó el ADN a -20 °C hasta su uso.

### **3.9. Identificación molecular**

La identificación *C. auris* se llevó a cabo mediante dos tipos de PCR: una PCR universal que permite identificar el género de *Candida* y una segunda PCR específica para *C. auris*, ambas permiten la amplificación de la región del espaciador transcrito interno (ITS1-ITS2) comprendida entre los genes 18S, 5.8S y una secuencia parcial del gen 26S.

### 3.9.1. Amplificación de la región de ITS1-ITS2

Para la PCR universal se emplearon los siguientes cebadores: ITS-F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Dichos cebadores amplificaron un fragmento de 380 pb para *C. auris* y un fragmento de distinto tamaño según la especie de *Candida* involucrada (Theill *et al.*, 2018).

Para la confirmación de *C. auris* se empleó una PCR específica de la especie; se emplearon los cebadores ITS1 F y Cauris R (5'-CCACCGCGAAGATTGGTG-3') los cuales amplificaron un producto de 280 pb (Theill *et al.*, 2018).

Las mezclas de reacción se prepararon a un volumen final de 25 µL, empleando 10.3 µL de H<sub>2</sub>O, 2.5 µL de Buffer 10x (Invitrogen), 2.0 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Invitrogen), 3.0 µL de dNTP'S 10 mM, 1.0 µL de los iniciadores (ITS1- F e ITS4-R 10 mM), 0.2 µL 5 U/ µL de Taq ADN Polimerasa Recombinante (Invitrogen) y 5 µL ADN. La corrida de ambas PCR se realizó en el termociclador Eppendorf (Vapo Protect) bajo las siguientes condiciones de reacción: calentamiento inicial 94 °C/ 2 min; 30 ciclos (95 °C/30s; 55 °C /30s; 72 °C/1 min); extensión final 72 °C/10 min.

Los productos de PCR (amplicones) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con 2 µL de Bromuro de etidio y se corrió a 120 V/ 30 min. Los geles se visualizaron con el equipo (BIO-RAD Gel Doc<sup>TM</sup> XR+), con ayuda del marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen), acorde con las instrucciones del fabricante.

### **3.9.2. Amplificación de región de dominios D1/D2 de *C. auris***

Con la finalidad de corroborar la identidad de *C. auris* y determinar el genotipo, se amplificó por PCR la región parcial correspondientes a los dominios D1/D2 del gen 26S de las cepas de *C. auris*. Para esta reacción se emplearon los siguientes cebadores específicos LROR F (5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC 3') y LR7 R (5'-TAC TAC CAC CAA GAT CT-3') (Wang *et al.*, 2019). Dichos cebadores amplificaron un fragmento de 1500 pb.

La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25  $\mu$ L, empleando 8.3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 2.5  $\mu$ L de Buffer 10x (Invitrogen), 4.0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Invitrogen), 3.0  $\mu$ L de dNTP'S 1 mM, 1.0  $\mu$ L de los iniciadores (LROR F y LR7 R 10 mM) 0.2  $\mu$ L 5 U/  $\mu$ L de Taq ADN Polimerasa Recombinante (Invitrogen) y 5  $\mu$ L de ADNg. La corrida e a PCR se realizó en el termociclador Eppendorf (Vapo Protect), bajo las siguientes condiciones de reacción: calentamiento inicial 94 °C/ 3 min; 30 ciclos (94°C/1 min; 55 °C /1 min; 72 °C/1.30s min); extensión final 72 °C/10 min.

La visualización de los amplicones se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con 2  $\mu$ L de Bromuro de etidio, y se corrió a 120 V/ 30 min. Los geles se visualizaron con el equipo (BIO-RAD Gel Doc<sup>TM</sup> XR+), con ayuda del marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen), acorde con las instrucciones del fabricante.

### **3.9.3. Secuenciación de la región ITS1-ITS2 y D1/D2 del gen 26S**

La secuenciación por dideoxinucleótidos (ddNTP's ) o también conocida como secuenciación de Sanger, se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos que sirven como terminadores de la reacción, que permiten generar fragmentos de ADN, cuyo extremo está delimitado por un ddNTP's marcado con un fluoróforo específico, el orden de los

fragmentos se resuelve mediante una electroforesis capilar para determinar el orden de los nucleótidos que componen los fragmentos de una secuencia dada (Sanger *et al.*, 1977).

La confirmación de la identidad de *C. auris*, previamente determinada por la PCR específica, se realizó mediante la secuenciación de los productos de la PCR universal (ITS1-ITS2) y de la PCR de la región de dominios (D1/D2) del gen 26S, de 380 y 1500 pb respectivamente, mediante el método de Sanger (Sanger *et al.*; 1977).

Se secuenció la cadena sentido y antisentido de cada producto de PCR correspondiente a cada aislamiento. El proceso de secuenciación consistió en cinco pasos, principalmente:

- a) Cuantificación de los productos de PCR.
- b) Purificación de los productos de PCR con ExoSAP-IT
- c) Reacción de secuenciación: Inicialmente se llevó a cabo una PCR lineal por duplicado (cadena sentido y antisentido) de cada producto de PCR para incorporar los ddNTP's marcados con el estuche de secuenciación BigDye Terminador 3.1 y los ddNTP's marcados a una concentración de 3.2 pmol/  $\mu$ L por reacción.

Para la secuenciación de la región ITS del gen 18S-26S se emplearon los iniciadores ITS1-F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), mientras que para la secuenciación de la región de los dominios D1/D2 del gen 26S se emplearon los iniciadores LROR-F (5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC 3') y LR7-R (5'-TAC TAC CAC CAA GAT CT-3'). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 40 ciclos (96 °C/10 s, 50 °C/5 s, 60 °C/4 min).

- d) Purificación de los productos de la PCR lineal. La purificación se realizó a través de una columna de sílica gel para cada producto, para eliminar dímeros de primers y dNTP'S no incorporados.

- e) Electroforesis capilar. La separación e identificación de los fragmentos generados con los dideoxinucleótidos terminadores, se realizó en el secuenciador automático de ADN 3500 Genetic Analyzer de Applied Biosystems, acorde con las instrucciones del fabricante.
- f) Los electroferogramas obtenidos se editaron empleando el programa Chromas 1.43v. Se obtuvo la secuencia consenso (se empalmó la secuencia sentido y antisentido para obtener una única secuencia de ambos sentidos) para cada muestra en formato fasta.
- g) Las secuencias se analizaron mediante un alineamiento local múltiple con secuencias depositadas en el banco mundial de genes “National Center for Biotechnology Information” (NCBI, por sus siglas en inglés), mediante la herramienta nBLAST. Para la identificación se tomó en cuenta el porcentaje de similitud (99 %) y el valor de expectación.

### **3.10. Análisis filogenético para la identificación de los clados de *C. auris***

La genotipificación o identificación de los clados de *C. auris* se realizó mediante un análisis filogenético, tanto de la región de ITS como de la región de los dominios del gen 26S del ADNr.

#### **3.10.1. Análisis filogenético de la región de ITS**

Se generó un archivo fasta con un total de 29 secuencias de 270 pb, correspondientes a la región de ITS1-ITS2 del gen 16S, 5.8S y una región parcial del gen 26S del ADNr, en el que se incluyeron las seis secuencias de *C. auris* correspondientes a los aislamientos clínicos caracterizados en este trabajo y cinco secuencias de referencia extraídas del NCBI representativas de los cuatro clados de *C. auris*. Se indican los números de acceso del NCBI en paréntesis de las secuencias de referencia utilizadas: clado I (KC692039), clado II (LC318417 y AB375772 Japón), clado III (KJ126760 Sudáfrica), el clado IV (MH117977 Venezuela), clado V (MW019910.1 y MZ389242.1 Irán) y *Candida albicans* (NG070791) como grupo externo, todas ellas extraídas del NCBI.

Mediante un alineamiento local de las secuencias contenidas en el archivo fasta, se recortaron a 270 pb con el programa BioEdit 7.2.5 v. El análisis filogenético de *C. auris* se realizó mediante la construcción del árbol correspondiente a la región de ITS, empleando el método estadístico de Máxima Verosimilitud y el método evolutivo Kimura 2 parámetros con 1000 réplicas, dentro del programa Mega 7.0 V.

### **3.10.2. Análisis filogenético de la región de dominios D1/D2**

Se generó un archivo fasta con un total de 16 secuencias de 440 pb, correspondientes a la región de D1/D2 del gen 26S del ADNr, en el que se incluyeron las seis secuencias de *C. auris* correspondientes a los aislamientos clínicos caracterizados en este trabajo y ocho secuencias de referencia extraídas del NCBI representativas de los cuatro clados de *C. auris* para esta región analizada: clado I (LN626311 Kuwait, KC692054 India), clado II (MK308726-MK308728 Corea del Sur), clado III (AB375773-NG055302 Japón) y el clado IV ( KU886679- KU886683 Israel). Se realizó un alineamiento de las secuencias de la región del dominio D1/D2 de *C. auris* con el programa BioEdit 7.2.5v.

La identificación de los clados de *C. auris* se realizó mediante la construcción del árbol filogenético del D1/D2 empleando el método estadístico de Máxima Verosimilitud y el método evolutivo Kimura 2 parámetros con 1000 réplicas dentro del programa Mega 7.0 V.

### **3.11. Identificación de resistencia a los antifúngicos mediante PCR-Secuenciación.**

La identificación de la resistencia a fluconazol por métodos moleculares se determinó mediante la búsqueda de las mutaciones Y132F y/o A143R presentes en el gen *ERG11*, asociadas con la resistencia a fluconazol mediante PCR-Secuenciación del gen *ERG11*. Por otra parte, también se realizó la determinación del perfil de resistencia molecular a equinocandinas mediante la

búsqueda de la mutación S639F en el gen *FKSI* HS1.

### **3.11.1. Amplificación del gen *ERG11***

Se amplificó el gen *ERG11* para la detección de las mutaciones Y132F y A143R, asociadas a resistencia a fluconazol. Para el desarrollo de la PCR se emplearon los siguientes cebadores específicos: CauErg11-F (5'-GTGCCCATCGTCTACAACCT-3') y CauErg11-R (5'-TCTCCCACTCGATTTCTGCT-3') (Chowdhary *et al.*, 2018), dichos cebadores amplificaron un fragmento de 1500 pb. Las mezclas de reacción se prepararon a un volumen final de 25  $\mu$ L, empleando 8.3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 2.5  $\mu$ L de Buffer 10x (Invitrogen), 4.0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Invitrogen), 3.0  $\mu$ L de dNTP'S 1 mM, 1.0  $\mu$ L de los iniciadores (CauErg11F y CauEr11R 10 mM), 0.2  $\mu$ L 5 U/  $\mu$ L de Taq ADN Polimerasa Recombinante (Invitrogen) y 5  $\mu$ L del ADNg de cada aislamiento.

La corrida de PCR se realizó en el termociclador Eppendorf (Vapo Protect) bajo las siguientes condiciones de reacción: calentamiento inicial 95 °C/ 3 min; 34 ciclos (95 °C/30s; 59 °C /30s; 72 °C/1.80s); extensión final 72°C/10 min. La visualización de los amplicones se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con 2  $\mu$ L de bromuro de etidio, y se corrió a 120 V/ 30 min. Los geles se visualizaron con el equipo (BIO-RAD Gel Doc<sup>TM</sup> XR+), con ayuda del marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen), acorde con las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se secuenció el fragmento de 1500 pb, correspondiente al gen *ERG11*, acorde con las condiciones del fabricante y se obtuvo la secuencia consenso en formato fasta. La identidad de las secuencias se corroboró con la herramienta nBLAST mediante un alineamiento

local múltiple con secuencias depositadas en el banco mundial de genes National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés).

Luego, se realizó un alineamiento local entre las secuencias obtenidas y la secuencia de referencia que mostraba resistencia al fluconazol, presentan las mutaciones Y132F (MK059960) y K143R (MK059961), así como la secuencia de una cepa sensible al fluconazol (MK059959). Esto se llevó a cabo mediante el programa BioEdit 7.2.5 v. El objetivo fue identificar mutaciones tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico en estas secuencias.

### **3.11.2. Amplificación de la región parcial del gen *FKSI* HS1**

La detección de la mutación S639F en la región del punto caliente número 1 (HS1, por sus siglas en inglés) del gen *FKSI* HS1, se llevó cabo mediante la amplificación parcial del gen de aproximadamente 610 pb mediante PCR-Secuenciación. Para la PCR se emplearon los siguientes cebadores específicos: Cau-HS1-F (5'-GCCATCTCGAAGTCTGCTCA-3') y Cau-HS1-R (5'-TGACAATGGCATTCCACACCT-3') (Sharma *et al.*, 2022) dichos cebadores amplifican un fragmento de 610 pb.

La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25  $\mu$ L, empleando 10.3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 2.5  $\mu$ L de Buffer 10x (Invitrogen), 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Invitrogen), 2  $\mu$ L de dNTP'S 10 mM, 1  $\mu$ L de los iniciadores (Cau-HS1-F y Cau-HS1-R 10 mM), 0.2  $\mu$ L 5 U/  $\mu$ L de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) y 5  $\mu$ L de ADNg de cada aislamiento. La corrida de PCR se realizó en el termociclador Eppendorf (Vapo Protect) bajo las siguientes condiciones de reacción: calentamiento inicial 95 °C/ 3 min; 45 ciclos (94 °C/15s; 60 °C /30s; 68 °C/1 min); extensión final 72°C/10 min.

La visualización de los amplicones de aproximadamente 610 pb, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con 2  $\mu$ L de Bromuro de etidio, y se corrió a 120 V/ 30 min. Los geles se visualizaron con el equipo (BIO-RAD Gel Doc<sup>TM</sup> XR+), con ayuda del marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen), acorde con las instrucciones del fabricante.

Para la secuenciación de los amplicones del gen *FKSI* HSI, se realizó bajo el método Sanger, en el que se emplearon los iniciadores de amplificación (Cau-HS1-F y Cau-HS1-R) en el secuenciador 3500 Genetic Analyzer de Applied Biosystems, acorde con las instrucciones del fabricante.

Los electroferogramas obtenidos se editaron empleando el programa Chromas 1.43 v. La identidad de las secuencias se corroboró con la herramienta nBLAST mediante un alineamiento local múltiple con secuencias depositadas en el NCBI.

Posteriormente se llevó a cabo el alineamiento local de las secuencias obtenidas junto con una secuencia de referencia resistente a equinocandinas que contiene la mutación S639F (MK059974) y la secuencia correspondiente a una cepa sensible (MK059967). En el programa BioEdit 7.2.5 v. Se buscó la mutación en secuencia nucleotídica y aminoacídica

### **3.12. Determinación de la clonalidad de *C. auris* mediante PFGE**

La electroforesis de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) es una técnica para el fraccionamiento de ADN de alto peso molecular entre 10 Kb a 10 Mb por electroforesis en gel de agarosa en el cual se emplea un campo eléctrico alterno en dos direcciones. Esta técnica tiene varias utilidades en la investigación, seguimiento de brotes y nos permite llevar a cabo la caracterización genética de aislamientos microbianos, siendo idóneo para estudios

epidemiológicos (Cardozo-Bernal *et al.*, 2013).

A partir del medio de Sabouraud se tomó una colonia y se incubó en 4 ml de caldo YPD (glucosa, 2 %; extracto de levadura, 1 %; bactopectona, 2 %) por 48 h a 30 °C. Posteriormente, se tomó una alícuota de 200 µl de la suspensión celular y se mezcló uniformemente con 40 U de liticasa (Sigma Aldrich) y 200 µl de agarosa de baja temperatura de fusión. Las alícuotas se colocaron en moldes de policarbonato y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. Enseguida, los bloques de agarosa se colocaron en 2.5 ml de una solución de liticasa y EDTA 50 mM y 100 U de liticasa/ml durante 2 h para llevarse a cabo la lisis celular.

Al término, se lavaron bloques de agarosa 5 ml de agua destilada estéril, posteriormente se incubaron con 2.5 ml de una solución de proteinasa K (EDTA 50 mM y 100 µg de proteinasa K) durante 18 h 50 °C y finalmente se lavaron cuatro veces con EDTA sódico 50 mM (pH 8,0) a 40 °C y el quinto lavado con EDTA sódico 50 mM (pH 8,0) a 4 °C.

Los bloques de agarosa se cortaron a 2 mm con un grosor de 1 mm, se procedió a la digestión enzimática con 120 U de *Not I* y se incubó a 37 °C por 16 h. Se empleó como estándar de la reacción el marcador de peso molecular de *Sacharomyces cerevisiae* (CHEF ADN Size Marker *S. cerevisiae*) de BIO-RAD. La electroforesis se realizó durante 40 h en gel de agarosa al 1,2 %, TBE 0,5x (Tris 0,1 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0), se corrió con los siguientes pulsos: a 4 V/cm con tiempos de cambio inicial y final de 5,3 y 49,9 s, respectivamente. Al término de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio 5 µg/ml por 20 min y se visualizaron con el equipo (ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad). Se comparó el patrón de bandas obtenido.

### 3.12.1 Determinación de la clonalidad por WGS y análisis de SNPs

La secuenciación de genoma completo (WGS) y el análisis de Polimorfismo de nucleótido único (SNP) de los dos primeros aislamientos de *C. auris* procedentes de Tabasco: MYC 43-21(B23017) y MYC 67-21 (B23024) fue realizada por la Unidad de Genómica, subunidad de Enfermedades Micóticas (Genomic unit - Mycotic Diseases Branch) de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta Georgia, USA por sus siglas en Inglés), dentro del marco de la colaboración internacional con el laboratorio de Micología y el laboratorio de Bacteriología Molecular, ambos pertenecientes al Departamento de Bacteriología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos y Dirección General de Epidemiología (InDRE-DGE, Ciudad de México).

El equipo de laboratorio de del CDC realizó la secuenciación de genoma completo (WGS) tipo escopeta (shotgun) de extremos pareados, utilizando la plataforma de Illumina MiSeq. Para ello, extrajeron el ADN total usando el estuche de extracción ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA) acorde con las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas genómicas se construyeron acoplando los índices al ADN fragmentado con el estuche de preparación de biblioteca genómica Ultra DNA para Illumina NEBNext (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.), según instrucciones del fabricante. Finalmente, las bibliotecas genómicas fueron secuenciadas con la plataforma Illumina MiSeq, utilizando el estuche de reactivos MiSeq v2 de 500 ciclos (Illumina). El ensamble del genoma se llevó a cabo mediante mapeo de las lecturas de secuenciación con la secuencia de referencia de *C. auris*, clado I (B11205; GB: GCA\_016772135.1).

Para el análisis de SNP, el equipo del CDC trabajó las lecturas de secuenciación de extremos pareados correspondientes a los dos aislamientos de *C. auris*, clado I (B23017 y B23024), con

al menos una cobertura de secuenciación de 50 veces (50x), junto con la secuencia de referencia del clado I (B11205; GB: GCA\_016772135.1), correspondiente a un aislamiento de Pakistán. El análisis de SNP lo realizaron con el flujo de trabajo MycoSNP-nf v 1.4 , acorde con lo descrito por Bagal y Cols. (2022) (<https://github.com/CDCgov/mycosnp-nf>) (Ver anexo A).

Inicialmente, evaluaron la calidad de las lecturas de secuenciación y realizaron el rasurado (trimming) de los extremos de baja calidad con el programa FastQC v2.10.

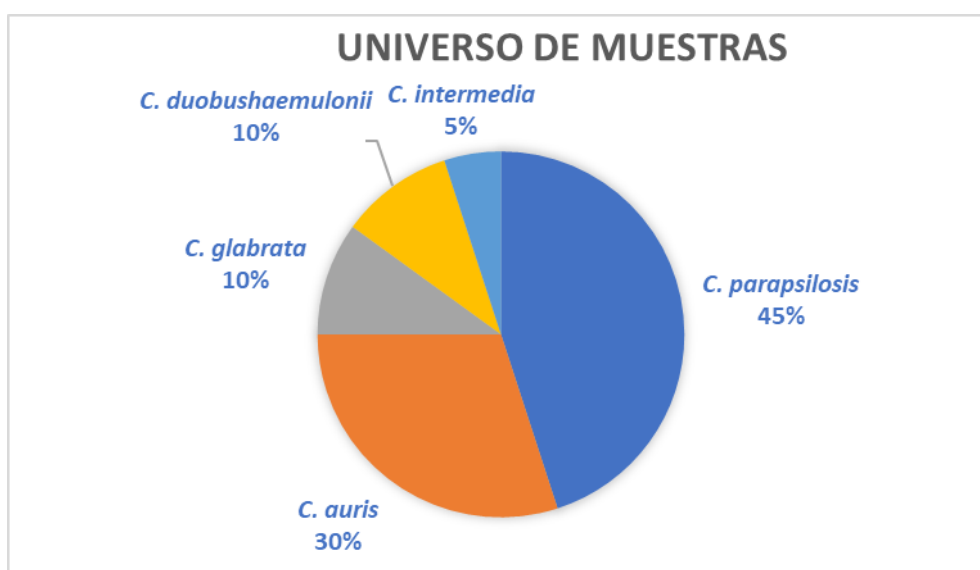
El filtrado de estas lecturas lo realizaron con el programa PRINSEQ (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas recortadas se utilizaron para la alineación mediante el comando MEM BWA (v 0.7.17). El genoma de referencia se enmascaró para repeticiones utilizando el comando nucmer de MUMmer (v 4.0) y Bedtools (v 2.29.2). El genoma de referencia se indexó para alineación de las lecturas de secuenciación utilizando el comando de índice BWA. Además, los archivos BAM alineados de cada muestra se procesaron previamente utilizando los comandos Samtools (v 1.10) y Picard para el llamado de variantes. Para el llamado de variantes de modo haploide, emplearon el estuche de herramientas bioinformáticas de genoma GATK (v 4.1.4.1). La herramienta VariantFiltration de GATK se utilizó para filtrar sitios según la expresión de filtrado [<http://broadinstitute.github.io/picard/>].

Para el análisis filogenómico, las distancias por pares y el árbol de Neighbor-Joining (NJ) se calcularon con el programa MEGA-X. Para la visualización del árbol, utilizaron la aplicación JavaScript basada en web, Microreact. La diferencia media de SNP se calculó utilizando scripts R internos y una matriz de distancias por pares calculada por MEGA-X.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación del universo de muestras

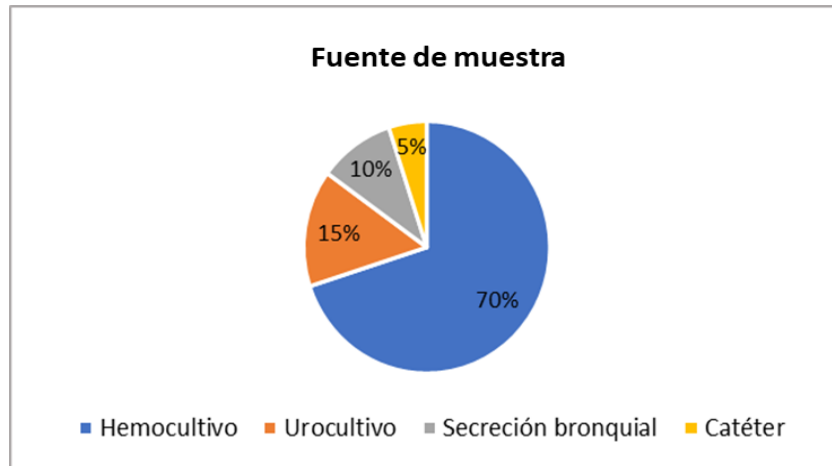
De un total de 20 muestras sospechosas de *C. auris* provenientes de la ciudad de Villahermosa, Tabasco, colectadas durante el periodo de junio de 2021 a junio de 2022, del universo de 20 muestras provenientes del Villahermosa Tabasco, nueve resultaron ser *C. parapsilosis* (45 %), seis *C. auris* (30 %), dos *C. glabrata* (10 %), dos *C. duobushaemulonii* (10 %) y un aislamiento de *C. intermedia* (5 %) (gráfica 1).



**Gráfica 1. Universo de muestras sospechosas de *C. auris***

Gráfico de pastel, representado el porcentaje de especies de *Candida* del universo de muestras, *C. parapsilosis* fue la especie que predominó (45 %), seguido de *C. auris* (30 %).

Los aislamientos provinieron de distintas fuentes: hemocultivo, urocultivo, secreción bronquial y punta de catéter (gráfica 2). Todos los pacientes a los que se les aisló *C. auris*, cursaron con COVID-19 a excepción del paciente correspondiente a la muestra MYC 57-22, el cual cursaba con quemaduras de tercer grado, todos los pacientes se encontraban en la Unidad de Cuidados intensivos.



**Gráfica 2. Fuente de muestra de donde se obtuvieron los aislamientos**

Gráfica de pastel, representando el porcentaje de las distintas fuentes de donde se recuperaron las especies de *Candida*.

Referente a las muestras positivas para *C. auris*, provinieron de dos hospitales, los aislamientos (MYC 43-21, MYC 67-21, MYC 101-21, MYC 97-22, y MYC 82-21) provinieron del hospital Dr. Juan Graham Casasús y el aislamiento (MYC 57-22) del hospital Dr. Gustavo A Roviroso Pérez (gráfica 3).



**Gráfica 3. Hospitales de donde se aisló a *C. auris***

Representación gráfica de la aparición de *C. auris* en dos hospitales de Villahermosa, Tabasco

El 67 % de las muestras se aislaron de pacientes del género femenino, la media de edad osciló entre los 49 años y el porcentaje de mortalidad fue del 17%. Tres aislamientos provinieron de hemocultivo (MYC 101-21, MYC 57-22 y MYC 97-22) dos aislamientos de urocultivo (MYC 67-21 y MYC 82-21) y un aislamiento de secreción bronquial (MYC 43-21). Dichos

aislamientos fueron previamente identificados como *C. auris* y *C. haemulonii*, con el uso del sistema VITEK (Tabla 3).

**Tabla 3. Datos de los aislamientos de *C. auris***

Aislamiento	Fecha de toma de muestra	Espécimen	Previa identificación
MYC 43-21	13/4/2021	Secreción bronquial	<i>C. auris</i>
MYC 67-21	03/6/2021	Urocultivo	<i>C. auris</i>
MYC 82-21	06/7/2021	Urocultivo	<i>C. auris</i>
MYC 101-21	16/8/2021	Hemocultivo	<i>C. auris</i>
MYC 57-22	04/4/2022	Hemocultivo	<i>C. haemulonii</i>
MYC 97-22	15/5/2022	Hemocultivo	<i>C. auris</i>

Dado que el objetivo principal de este trabajo es *C. auris* nos enfocamos en caracterizar microbiológica y molecularmente los seis aislamientos.

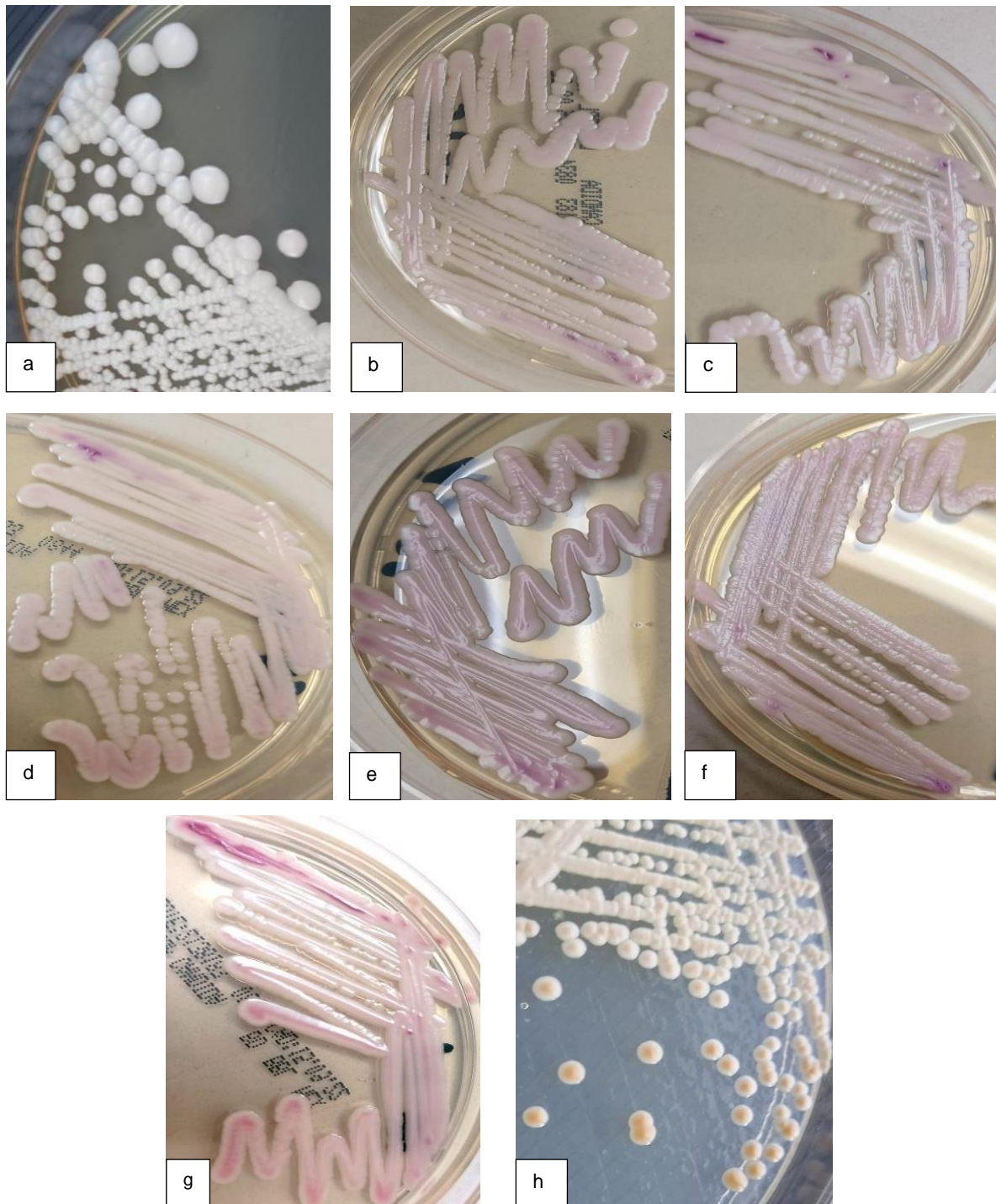
#### **4.2. Caracterización macroscópica de *C. auris***

Los aislamientos de *C. auris* en medio Sabouraud, desarrollaron colonias blancas, convexas, redondas con borde entero y aspecto cremoso con un tamaño entre 1,5 a 4 mm (figura 8a).

En el medio CHROMagar, se observaron colonias planas, redondas con aspecto cremoso de color rosado con tonalidades violáceas (MYC 82-21, MYC 57-22, MYC 67-21, MYC 43-21 y MYC 97-22) ver (figura 8b, 8c, 8d, 8e y 8f); a excepción del aislamiento MYC 101-21, en el cual se observó un crecimiento de color rosa intenso ver (figura 8g).

Mientras que en las otras especies de *Candida*, *C. parapsilosis* (MYC 80-21, MYC 122-21, MYC 21-22, MYC 22-22, MYC 65-22, MYC 66-22, MYC 67-22, MYC 96-22 y MYC 109-22), *C. glabrata* (MYC 81-22 y MYC 45-22), *C. duobushaemulonii* (MYC 23-22 y MYC 68-21) y *C. intermedia* (MYC 1-22), en este medio se observó un crecimiento de color rosado. En medio Biggy todos los aislamientos positivos a *C. auris* se observaron colonias redondas de 1,5

y 2 mm, de color colonias blancas, con un botón marrón claro en el centro, esto debido a que *C. auris* reduce débilmente el citrato de amonio y bismuto (figura 8h).



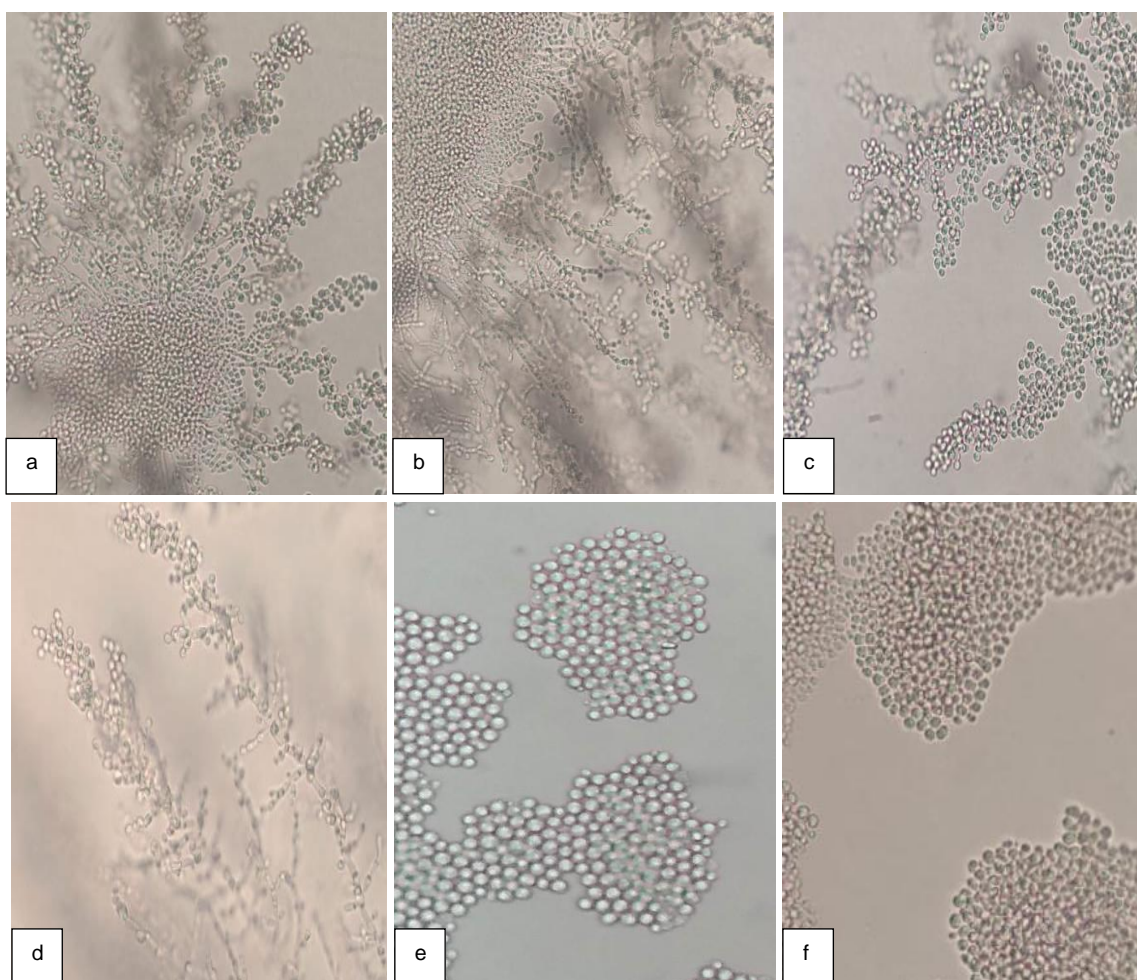
**Figura 8. Caracterización macroscópica de los aislamientos de *C. auris***

Identificación morfológica de *C. auris* en medio Sabouraud y medios selectivos CHROMagar y medio Biggy. Para los tres medios la incubación se realizó a 30 °C por 48 h. Morfología colonial en medio de Saboraud a) MYC 43-21. En medio CHROMagar, b) MYC 82-21; c) MYC-57-22; d) MYC 67-21; e) MYC 43-21; f) MYC 97-22 y g) MYC 101-21. En medio Biggy, h) MYC 43-21.

### 4.3 Caracterización microscópica

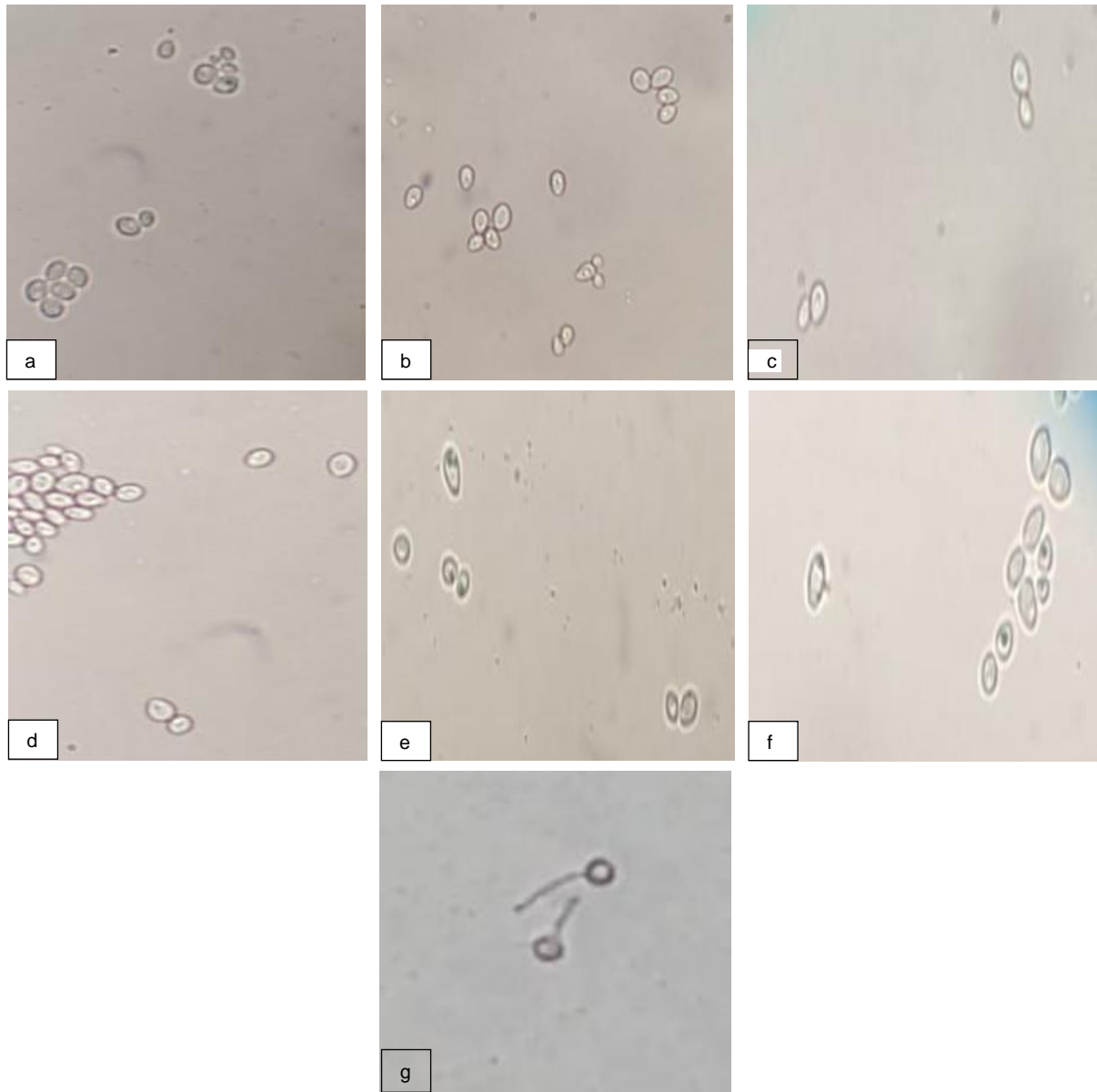
La caracterización microbiológica de *C. auris* consistió en confirmar la ausencia de clamidosporas y del tubo germinativo en agar harina de maíz y en la prueba de tubo germinativo con suero, respectivamente.

Se observó en agar harina de maíz que todos los aislamientos de *C. auris* no desarrollaron clamidosporas; sin embargo, se observaron dos morfologías microscópicas distintas. En los aislamientos MYC 43-21, MYC 67-21, MYC 101-21 y MYC 97- 22 se observó el desarrollo de pseudohifas, las cuales estaban cubiertas con abundantes blastoconidios, (figura 9a, 9b, 9c y 9d). Mientras que, en los aislamientos MYC 82-21 y MYC 57-22 se observaron células individuales, con escasos blastoconidios (figura 9e y figura 9f).



**Figura 9. Caracterización microscópica de *C.auris***  
Microcultivo en agar de harina de maíz, técnica de Dalmau. Se observan dos morfologías distintas, observación a 40X. a) MYC 43-21; b) MYC 67-21; c) MYC 101-21; d) MYC 97- 22; e) MYC 82-2 y f) MYC 57-22).

Por otra parte, la prueba de tubo germinativo resultó negativa para todos los aislamientos de *C. auris* (MYC 43-21, MYC 67-21, MYC 101-21, MYC 82-21, MYC 57-22 y MYC 97- 22), no se observó el desarrollo de tubos germinativos en los aislamientos únicamente se observaron células individuales en su mayoría, y algunas formando blastoconidios (figura 10).



**Figura 10. Prueba de tubo germinal en los aislamientos de *C. auris***

Prueba de tubo germinativo con suero humano, incubación a 37 ° C por 3 h. Observación a 40X. No se observa el desarrollo de tubo germinativo en los seis aislamientos de *C. auris*. **a)** MYC 43-21; **b)** MYC 67-21; **c)** MYC 101-21; **d)** MYC 97-22; **e)** MYC 57-22; **f)** MYC 82-21 y **g)** *C. albicans* control positivo.

#### **4.4. Identificación fenotípica con el sistema VITEK**

El sistema VITEK en su versión 8.01 permitió identificar los seis aislamientos como *C. auris* con un nivel de confianza del 94 al 97 %. En los aislamientos con clave MYC 43-21, MYC 101-21, 67-21 y 97-22 el equipo arrojó un nivel de confianza del 94 %, mientras que, para los aislamientos MYC 82-21 y 57-22 el nivel de confianza fue del 97 % para *C. auris*.

El equipo arrojó un perfil de asimilación bioquímico para los seis aislamientos de *C. auris*, los aislamientos asimilaron, los siguientes carbohidratos: glucosa, sacarosa, trealosa, rafinosa, xilosa, melocitosa, N-Acetil-Glucosamina y gluconato; sin embargo, no fueron capaz de asimilar L- Ramnosa, lactosa y galactosa. En la (tabla 2) se enlista la asimilación de los principales sustratos, así como aquellos sustratos que no fueron asimilados por *C. auris* que permitieron identificar un perfil bioquímico para este patógeno.

Se identificó una asimilación diferencial de carbohidratos para los aislamientos MYC 43-21, MYC 101-21, 67-21 y 97-22, los cuales asimilaron D- xilosa, mientras que, los aislamientos MYC 82-21 y 57-22 no la asimilaron (Tabla 4). Dichos aislamientos que asimilaron la D-xilosa, desarrollaron pseudohifas y los aislamientos que no asimilaron dicho azúcar presentaron la morfología de células individuales.

**Tabla 4. Perfil bioquímico de los aislamientos de *C. auris***

Sustrato	MYC 43-21	MYC 101-21	MYC 67-21	MYC 97-22	MYC 82-21	MYC 57-22
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Trealosa	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+	+
L-Ramnosa	-	-	-	-	-	-
Xilosa	+	+	+	+	-	-
Melocitosa	+	+	+	+	+	+
Gluconato	+	+	+	+	+	+
N-Acetil Glucosamina	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	-	-

#### **4.5. Determinación del perfil susceptibilidad de *C. auris* mediante microdilución**

*C. auris* es generalmente resistente al fluconazol (CMI > 32 mg/L). La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislamientos clínicos de *C. auris* permitió identificar dos perfiles de susceptibilidad al fluconazol.

De los cuatro aislamientos de *C. auris*, aislamiento MYC 97-22 fue el único que mostró un perfil de resistencia a fluconazol (64 µg/ml), el resto (MYC 43-21, MYC 67-21, MYC-101-21, MYC 82-21 y MYC 57-22) mostraron un perfil de susceptibilidad fluconazol con CMI < 32 µg/ml: (4 µg/ml, 2 µg/ml, 2 µg/ml, 2 µg/ml y 4 µg/ml mg/L respectivamente) (tabla 5). Mientras que los cuatro aislamientos presentaron un perfil de susceptibilidad para la anfotericina B y para caspofungina, en la que se obtuvieron valores de CMI por debajo de los valores de corte propuestos por el CDC.

Por otra parte, todos los aislamientos (MYC 82-21 y MYC 57-22) mostraron un perfil de susceptibilidad a los tres tipos de antifúngicos probados: fluconazol, anfotericina B y caspofungina (Tabla 5).

**Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de los seis aislamientos de *C. auris***

Aislamientos	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (µg/ml)		
	fluconazol	anfotericina B	caspofungina
MYC 43-21	4	1	0.5
MYC 67-21	2	0.5	0.5
MYC 101-21	2	0.125	0.25
MYC 97-22	64	0.5	1
MYC 82-21	2	0.25	0.5
MYC 57-22	4	0.25	1

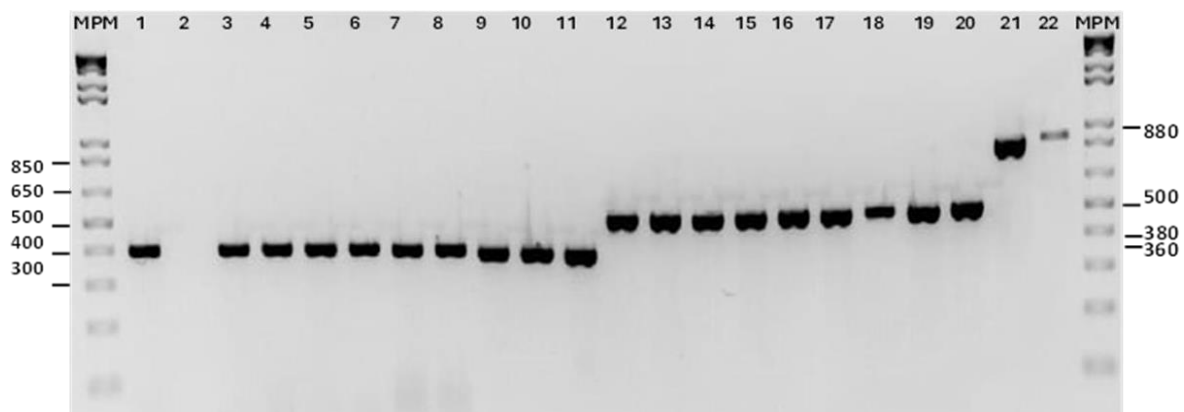
Puntos de corte: fluconazol ( $\geq 32$  µg/ml resistente); anfotericina B ( $\geq 2$  µg/ml resistente) y caspofungina ( $\geq 2$  µg/ml resistente). Todo valor de CMI por debajo del valor de corte se considera sensible (Centers for Disease Control and prevention, 2020).

#### 4.6. Confirmación de *Candida* spp mediante PCR-Secuenciación de la región de ITS

La detección de la levadura involucrada por métodos moleculares, así como la de *Candida auris* en los 20 aislamientos de Tabasco, se realizó mediante la PCR universal, en la que se amplificó la región ITS1 e IT2 del gen 26S del ARNr. La PCR universal permitió inicialmente la identificación presuntiva de seis aislamientos de *C. auris* (MYC 43-21, MYC 67-21, MYC 101-21, MYC 97-22, MYC 57-22 y MYC 82-21), en el que se detectó un amplicón de aproximadamente 380 pb.

La PCR universal permitió detectar otras especies de *Candida* involucradas en el universo de muestras; entre ellas, un aislamiento de *C. intermedia* (MYC 1-22; amplicón de aproximadamente 360 pb), dos aislamientos de *C. duobushaemulonii* (MYC 23-22 y MYC 68-

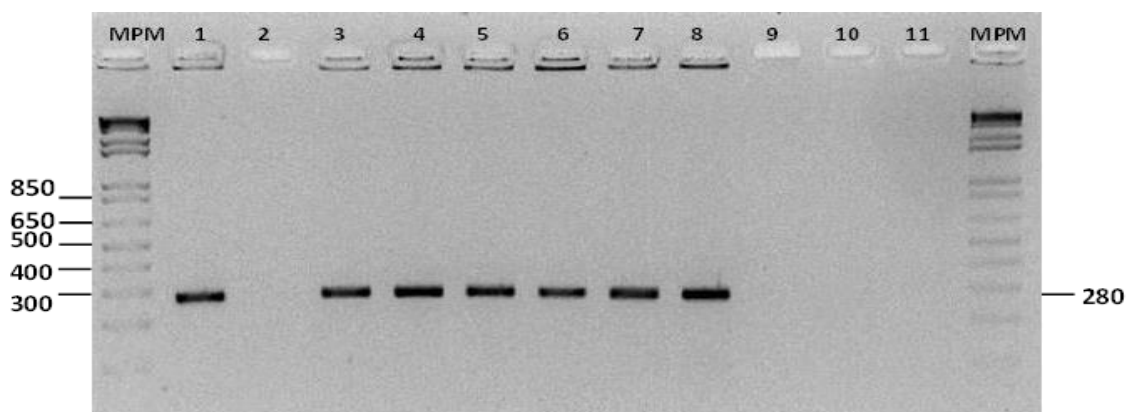
21; amplicon de aproximadamente 360 pb), nueve aislamientos de *C. parapsilosis* (MYC 80-21, MYC 122-21, MYC 21-22, MYC 22-22, MYC 65-22, MYC 66-22, MYC 67-22, MYC 96-22 y MYC 109-22; amplicón de aproximadamente 500 pb y por último, dos aislamientos de *C. glabrata* (MYC 81-22 y MYC 45-22; amplicon 880 pb (figura 11)



**Figura 11. Amplificación de la región ITS del universo de muestras**

Visualización de los productos de amplificación de la PCR Universal del universo de muestras de Tabasco. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Carril 1: Control positivo *C. auris* (MYC 30-20); carril 2 Control de reactivos; aislamientos de *C. auris*, carril 3 (MYC 43-21); carril 4 (MYC 67-21); carril 5 (MYC 101-21); carril 6 (MYC 97-22); carril 7 (MYC 57-22); carril 8 (MYC 82-21); *C. intermedia* Carril 9 (MYC 1-22); *C. duobushaemulonii*, carril 10 (MYC 23-22) y carril 11 (MYC 68-21); *C. parapsilosis* carril 12 (MYC 80-21); carril 13 (MYC 122-21); carril 14 (MYC 21-22); carril 15 (MYC 22-22); carril 16 (MYC 65-22); carril 17 (MYC 66-22); carril 18 (MYC 67-22); carril 19 (MYC 96-22); carril 20 (MYC 109-22); *C. glabrata*, carril 21 (MYC 1-22) y carril 22 (MYC45-22). En los extremos del gel Marcador de peso molecular de ADN 1 Kb Plus (MPM).

Posteriormente, se confirmó la presencia de *C. auris* mediante una PCR específica, en el que los seis aislamientos amplificaron un fragmento de aproximadamente 280 pb (MYC 43-21, MYC 67-21, MYC 101-21, MYC 97-22, MYC 57-22 y MYC 82-21), correspondiente a una región conservada de ITS2 de *C. auris* (figura 12). El resto de los aislamientos no amplificaron para esta reacción, inclusive aquellos que en la PCR universal el amplicón obtenido fue similar al obtenido para *C. auris* (MYC 1-22, MYC 23-22 y MYC 68-21) (figura 12).



**Figura 12. PCR específico de *C. auris***

Visualización de los productos de amplificación de la PCR específica para *C. auris*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1: Control positivo *C. auris* (MYC 30-20); carril 2 Control de reactivos; *C. auris*; #2 Control de reactivos; Aislamientos de *C. auris*, carril 3 (MYC 43-21); carril 4 (MYC 67-21); carril 5 (MYC 101-21); carril 6 (MYC 97-22); carril 7 (MYC 57-22); carril 8 (MYC 82-21); *C. intermedia*, Carril 9 (MYC 1-22); *C. duobushaemulonii* carril 10 (MYC 23-22) y carril 11 (MYC 68-21). En los extremos del gel MPM: Marcador de peso molecular de ADN 1 Kb Plus.

Posteriormente, se confirmó la identidad de *C. auris* y las otras especies de *Candida* detectadas en el universo de muestras, mediante la secuenciación de los amplicones obtenidos de la PCR universal y la PCR específica. La identidad de las secuencias, correspondientes a la región de ITS de los 20 aislamientos mostraron entre el 99 y 100 % similitud con secuencias depositadas en GenBank.

Los seis aislamientos (MYC 43-21, MYC 67-21, MYC 101-21, MYC 97-22, MYC 57-22 y MYC 82-21) mostraron entre 99 y 100 % de similitud con *C. auris*. Confirmando la identidad correcta del aislamiento MYC 57-22 previamente identificado como *C. haemulonii*. El aislamiento (MYC 1-22) arrojó el 100 % de similitud con *C. intermedia*, descartando la previa identificación como *C. duobushaemulonii*. Los aislamientos (MYC 23-22 y MYC 68-21) mostraron el 100% de similitud con *C. duobushaemulonii* y los aislamientos (MYC 45-22 y MYC 81-21), ambos mostraron el 100 % de similitud con *C. glabrata*. Para el aislamiento MYC 81-21 se confirma la correcta identidad, debido a que estaba previamente identificada como *C. parapsilosis*

Sin embargo, para los nueve aislamientos de *C. parapsilosis*, se pudo identificar dos poblaciones, cuatro aislamientos (MYC 80-21, MYC 122-21, MYC 21-22 y MYC 22-22), mostraron el 100 % de similitud con *C. parapsilosis* los aislamientos (MYC 65-22, MYC 66-22, MYC 67-22, MYC 96- 22 y MYC 109-22) arrojaron el 100 % de similitud con *C. orthopsilosis*. Todas las secuencias se depositaron en la base de datos del GenBank, los números de acceso se enlistan en la (tabla 6).

**Tabla 6. Secuencias de la región de ITS de los 20 aislamientos depositadas en el GenBank**

Clave de la muestra	Identificación previa	Porcentaje de similitud %	Identidad	N ° acceso
MYC 43-21	<i>C. auris</i>	100	<i>C. auris</i>	MZ648436
MYC 67-21	<i>C. auris</i>	100	<i>C. auris</i>	MZ648437
MYC 82-21	<i>C. auris</i>	100	<i>C. auris</i>	OPO94118
MYC 101-21	<i>C. auris</i>	100	<i>C. auris</i>	OPO94119
MYC 57-22	<i>C. haemulonii</i>	100	<i>C. auris</i>	OPO94117
MYC 97- 22	<i>C. auris</i>	99	<i>C. auris</i>	OP895145
MYC 68-21	<i>C. duobushaemulonii</i>	100	<i>C. duobushaemulonii</i>	MZ648438
MYC 23-22	<i>C. duobushaemulonii</i>	100	<i>C. duobushaemulonii</i>	OPO94120
MYC 45-22	<i>C. glabrata</i>	100	<i>C. glabrata</i>	OP895147
MYC 81-21	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. glabrata</i>	OP895149
MYC 1-22	<i>C. duobushaemulonii</i>	100	<i>C. intermedia</i>	OP895146
MYC 122-21	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. parapsilosis</i>	OP895157
MYC 21-22	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. parapsilosis</i>	OP895150
MYC 22-22	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. parapsilosis</i>	OP895151
MYC 80-21	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. parapsilosis</i>	OP895148
MYC 65-22	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. orthopsilosis</i>	OP895152
MYC 66-22	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. orthopsilosis</i>	OP895153
MYC 67-22	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. orthopsilosis</i>	OP895154
MYC 96-22	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. orthopsilosis</i>	OP895155
MYC 109-22	<i>C. parapsilosis</i>	100	<i>C. orthopsilosis</i>	OP895156

#### **4.7. Confirmación de *C. auris* mediante PCR-Secuenciación de la región de dominios D1/D2 del gen 26S del ADNr**

Se confirmó una la identidad de los seis aislamientos de *C. auris*, mediante la amplificación y secuenciación de la región de dominios D1/D2 del gen 26S.

Las seis secuencias correspondientes a la región de dominios D1/D2 a través de un alineamiento local múltiple con la herramienta nBLAST mostraron una similitud del 100 % con *C. auris*.

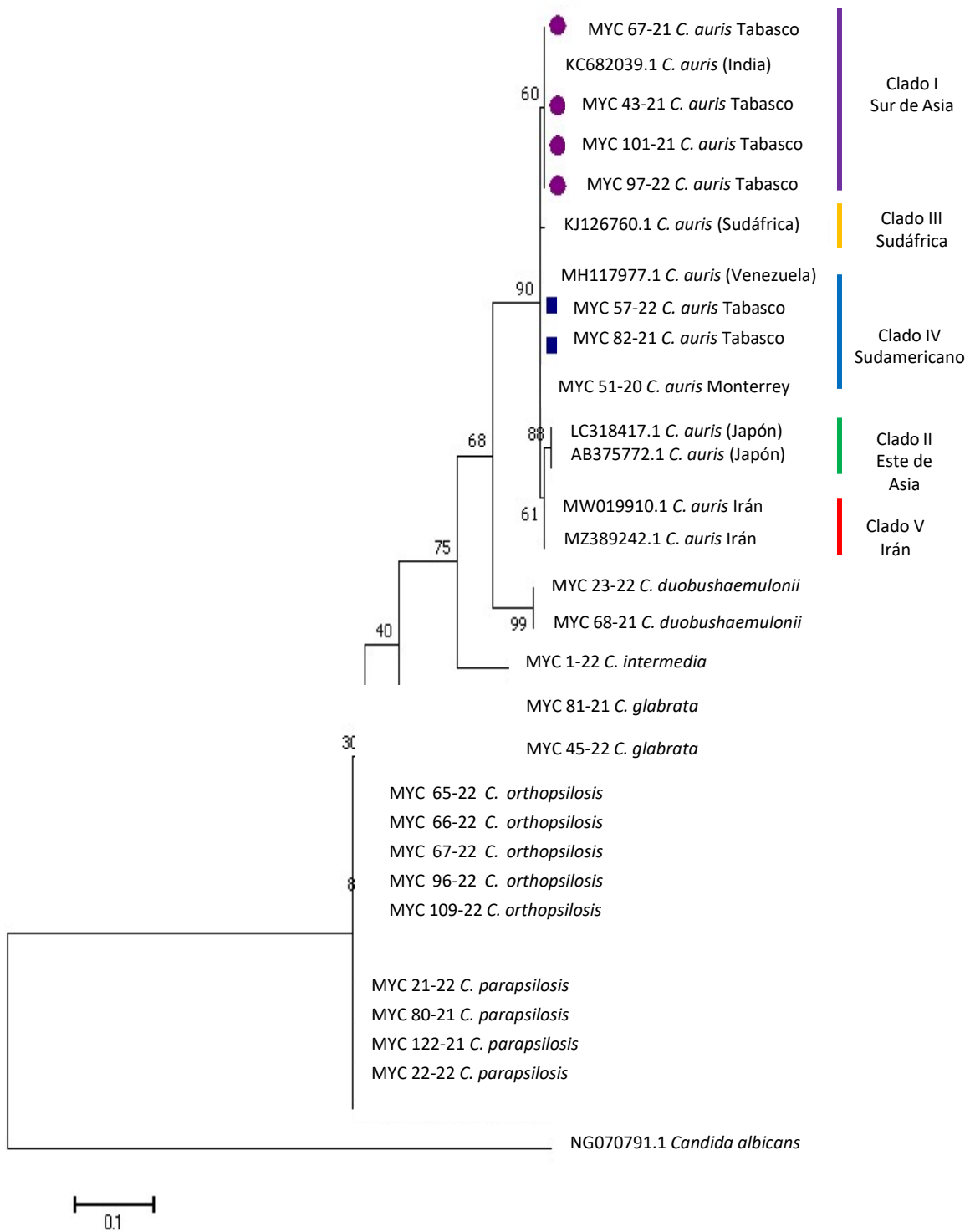
Estas secuencias se depositaron en la base de datos del GenBank con los siguientes números de acceso: MYC 101-21 (OP859125), MYC 43-21 (OP859126), MYC 97-22 (OP859127), MYC 67-21 (OP859128), MYC 82-21 (OP859129) y MYC 57-22 (OP859130).

#### **4.8. Análisis filogenético de la región de ITS del universo de muestras**

Con la finalidad de determinar la relación filogenética entre las especies detectadas de *Candida* en el universo de muestras de Villahermosa, Tabasco, se construyó el árbol filogenético de la región ITS, en el que se incluyeron las 20 secuencias obtenidas, además de secuencias extraídas del banco de genes para cada especie identificada.

El árbol filogenético agrupó las 20 secuencias pertenecientes en cinco ramas principales; en la rama inferior se agruparon las secuencias de *C. parapsilosis*, y esta rama a su vez, se subdividió en una rama interna en la que se agrupó *C. orthopsilosis* (figura 13).

Por su parte, los aislamientos de *C. intermedia*, *C. duobushaemulonii* y *C. glabrata* se agruparon, en una rama independiente, por lo que en estas tres especies no se observó variabilidad intra-génica (figura 13).



**Figura 13. Análisis filogenético del universo de muestras**

El árbol filogenético de la región de ITS de especies de *Candida* se construyó con un total de 29 secuencias (270 nt) de la región (ITS), incluyendo las secuencias de los seis aislamientos clínicos, empleando el método de Máxima Verosimilitud, con el modelo Kimura 2 Parámetros y 1000 réplicas dentro el programa Mega v 7.0. Los clados de *C. auris* se representan cada uno con una barra lateral de color. Los aislamientos clínicos pertenecientes al clado I se indican con círculo morado y los aislamientos pertenecientes al clado IV con rectángulo azul.

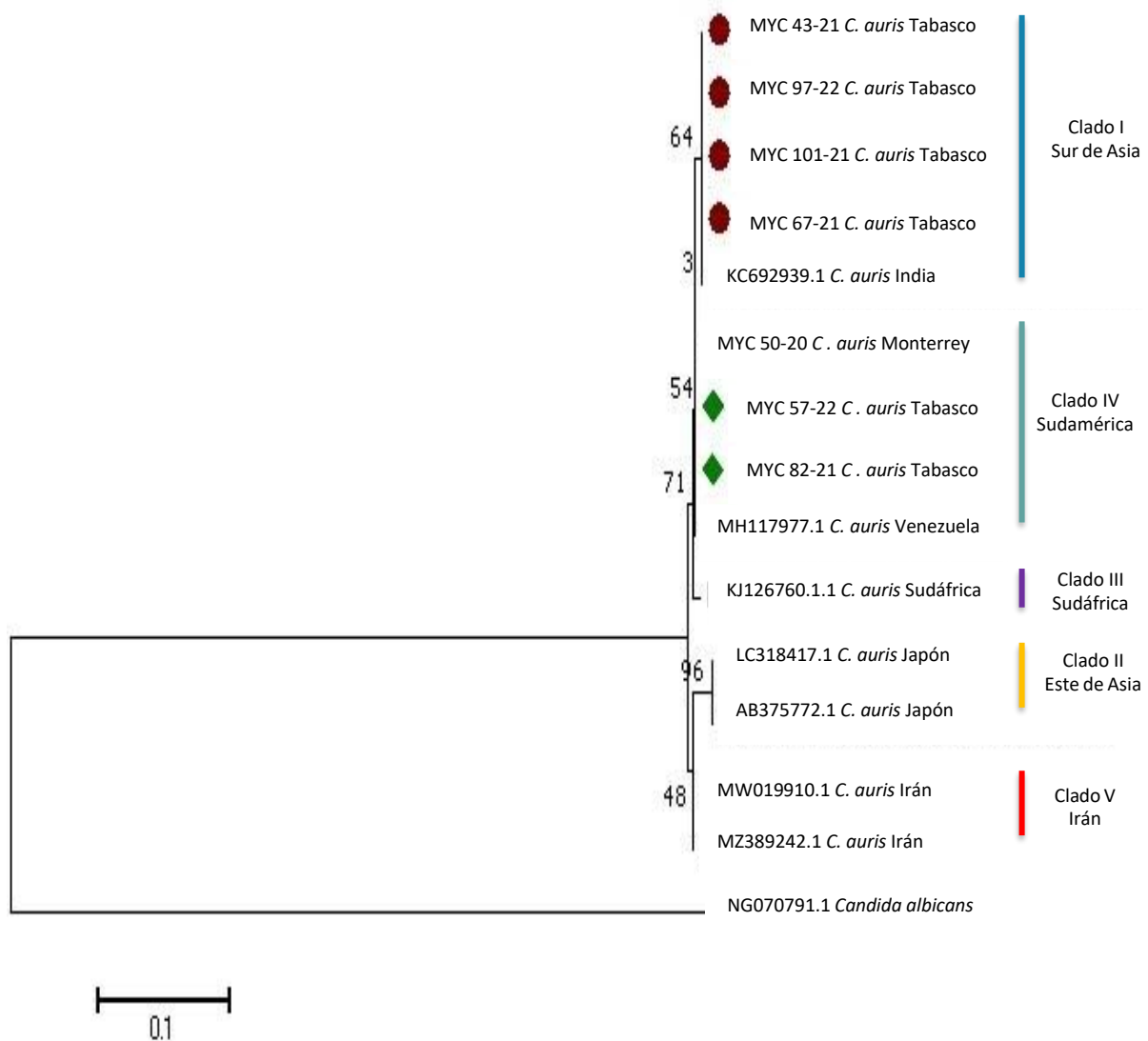
Por último, el árbol filogenético mostró que las secuencias de *C. auris* se agrupó en una rama principal y esta a su vez, se subdividió en cinco ramas correspondientes a los clados representativos reportados en la literatura clado I (Sur de Asia), clado II (Este de Asia), clado III (Sudáfrica), clado IV (Sudamericano) y clado V (Irán).

Se observó que las secuencias correspondientes a los seis aislamientos clínicos de *C. auris* se agruparon en dos clados: los aislamientos MYC 43-21, MYC 101-21, MYC 67-21 y MYC 97-22 se agruparon dentro del clado I (Sur de Asia), mientras que los aislamientos MYC 82-21 y MYC 57-22 se agruparon dentro del clado IV (Sudamericano).

En general, el árbol filogenético de la región de ITS mostró que *C. auris* y *C. duobushaemulonii*, se encuentran filogenéticamente más cercanas y están muy relacionadas entre sí, en comparación con las otras especies.

#### **4.9. Análisis filogenético de la región de ITS de los aislamientos de *C. auris***

El análisis filogenético de la región de ITS del gen 18S del ADNr permitió identificar el clado al que pertenecen los seis aislamientos de *C. auris* reflejando que en el estado de Tabasco circulan dos clados de esta especie. (figura 14)

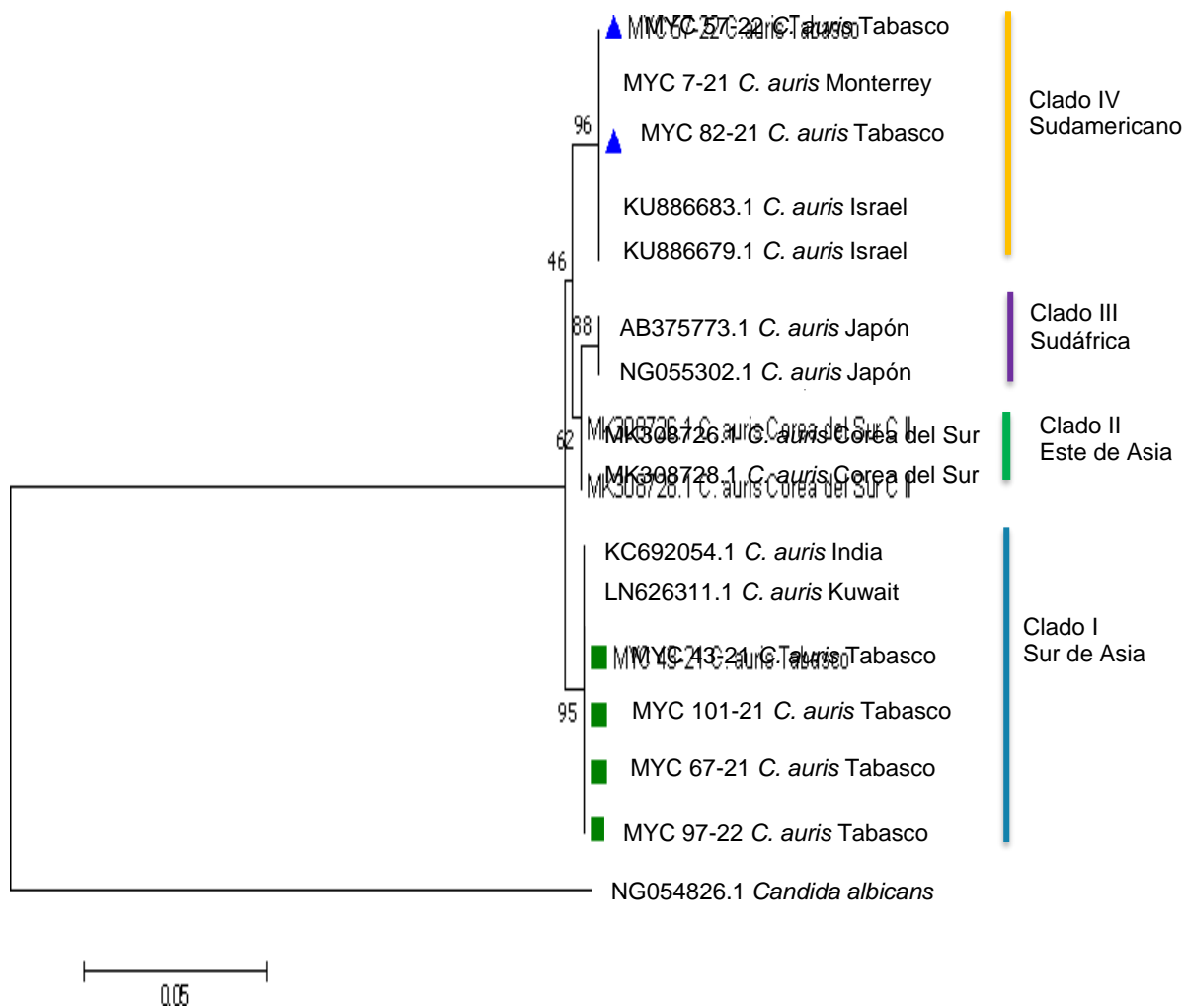


**Figura 14. Análisis filogenético de *C. auris* (ITS)**

El árbol filogenético de *C. auris*, se construyó con una región parcial de 270 nt de la región del espaciador transcrito interno (ITS) de 15 secuencias con el método estadístico de Máxima Verosimilitud y el modelo evolutivo Kimura 2 parámetros con 1000 réplicas dentro del programa Mega v 7. El árbol incluye secuencias de los seis aislamientos clínicos y secuencias representativas de los cuatro clados de *C. auris*. Los aislamientos se ubicaron dentro del clado I (elipse roja) y el clado IV (rombo verde).

#### 4.10. Análisis filogenético de la región de D1/D2

El árbol filogenético de la región D1/D2 del gen 26S del ADNr confirmó que los seis aislamientos clínicos de *C. auris* recuperados en Villahermosa Tabasco, se agruparon en dos clados distintos. Los aislamientos MYC 43-21, MYC 101-21, MYC 67-21, MYC 97-22 se ubicaron dentro del clado I (Sur de Asia) y los aislados MYC 82-21 y MYC 57-22 dentro del clado IV (Sudamericano) (figura 15).



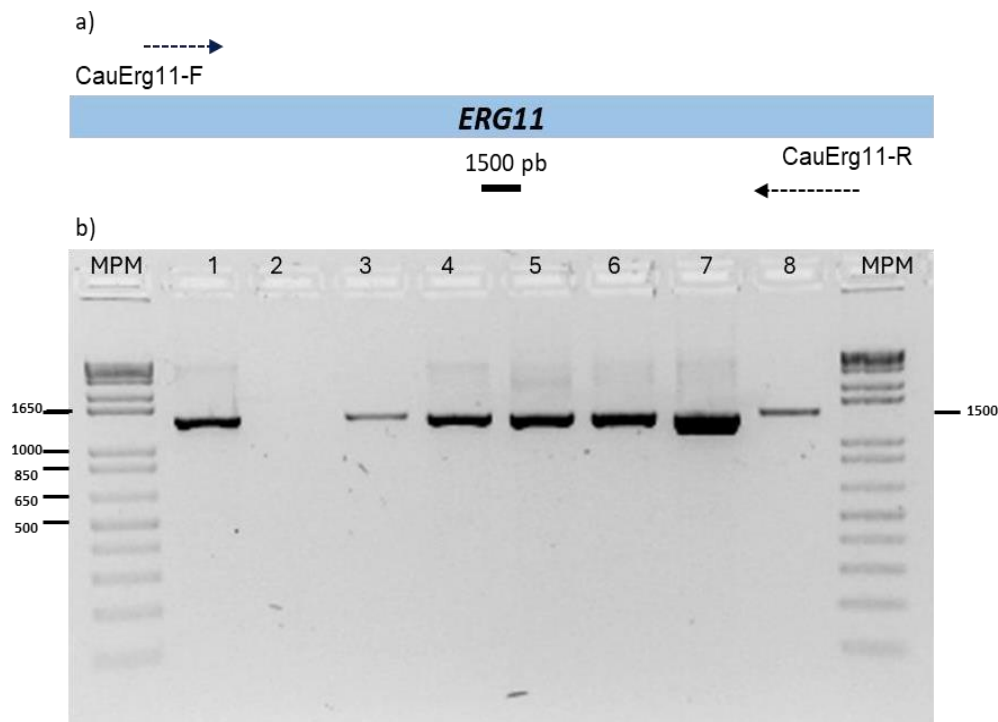
**Figura 15. Análisis filogenético de *C. auris* (D1/D2)**

El árbol filogenético de *C. auris*, se construyó con una región parcial de 440 nt de la región de dominios D1/D2 del gen 26S del ADNr, con 16 secuencias empleando el método estadístico de Máxima Verosimilitud y el modelo evolutivo de Kimura 2 parámetros con 1000 réplicas, dentro el programa Mega v 7. El árbol incluye secuencias representativas de los cuatro clados de *C. auris*, los cuales están representados por barras de colores del lado derecho del árbol. Los aislamientos clínicos agrupados dentro del clado I se indican con un cuadrado verde y los aislamientos clínicos del clado IV con triángulo azul.

#### 4.11. Detección de mutaciones puntuales que confieren resistencia a fluconazol

Se corroboró el perfil de resistencia para fluconazol observado por pruebas fenotípicas, mediante la detección de las mutaciones Y132F y K143R en el gen *ERG11* para el aislamiento MYC 97-22 perteneciente al clado I. De igual manera se corroboró el perfil de susceptibilidad a fluconazol para el resto de los aislamientos clínicos.

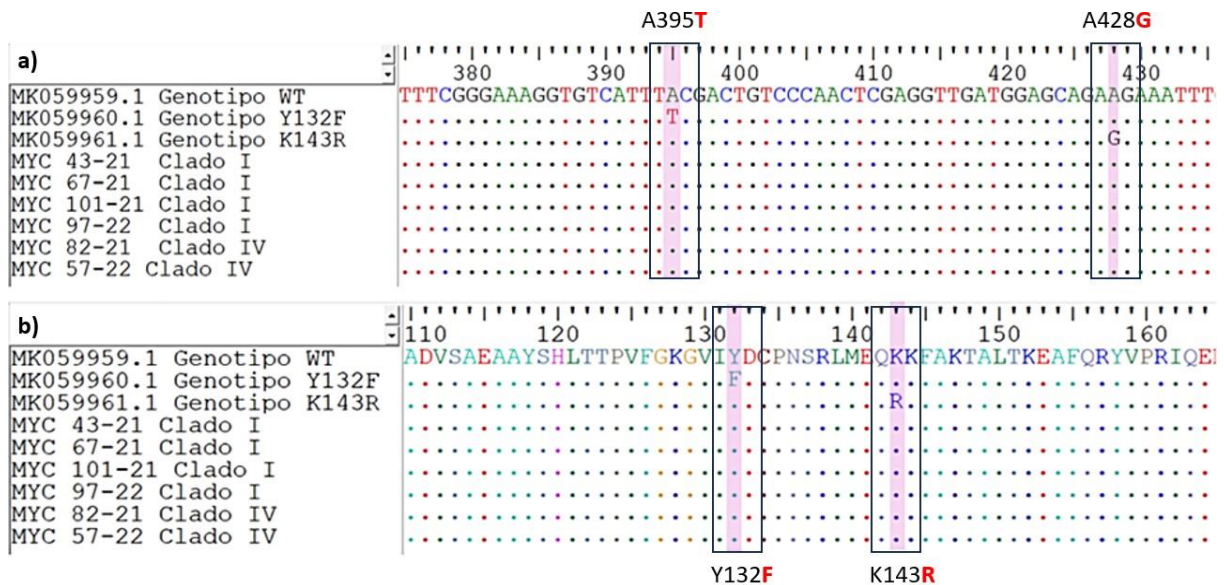
Para ello, se amplificó y secuenció un fragmento de 1500 pb correspondiente al gen *ERG11* de 1575 pb (figura 16).



**Figura 16. Amplificación del gen *ERG11***

Visualización de los productos de amplificación del gen *ERG11* de *C. auris*. **a)** Mapa del gen *ERG11*. **b)** Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1: Control positivo *C. auris* (MYC 30-20); carril 2 Control de reactivos; *C. auris*; #2 Control de reactivos; Aislamientos de *C. auris*, carril 3 (MYC 43-21); carril 4 (MYC 67-21); carril 5 (MYC 101-21); carril 6 (MYC 97-22); carril 7 (MYC 57-22); carril 8 (MYC 82-21). En los extremos del gel MPM: Marcador de peso molecular de ADN 1 Kb Plus.

El análisis de la secuencia del gen *ERG11* de los cinco aislamientos (MYC 43-21 MYC 67-21, MYC-101-21, MYC 82-21 y MYC 57-22) de *C. auris*, mostró que todos ellos presentaron un genotipo silvestre; es decir, no presentaron las mutaciones Y132F y K143R asociadas con la resistencia al fluconazol, lo cual corroboró el genotipo sensible para este fármaco (figura 17).



**Figura 17. Identificación de mutaciones relacionadas con resistencia en el gen *ERG11* de los aislamientos de *C. auris***

Imagen que muestra el alineamiento múltiple de la secuencia completa del gen *ERG11* correspondiente a los seis aislamientos de Tabasco. **a)** Alineamiento en secuencia nucleotídica. **b)** Alineamiento en secuencia aminoacídica. El alineamiento incluyó tres secuencias de referencia: genotipo silvestre (MK059959); genotipo resistente a fluconazol (MK059960 y MK059961). En el recuadro en negro se resalta la región de la mutación. Los seis aislamientos presentaron el genotipo silvestre.

Contrario a lo esperado, en el aislamiento MYC 97-22 de *C. auris*, cuyo fenotipo fue resistente a fluconazol, no se encontró en el gen *ERG11* las mutaciones relacionadas con resistencia al fármaco, por lo que genotípicamente es sensible a dicho fármaco.

Adicionalmente, en los aislamientos pertenecientes al clado IV (MYC 82-21 y MYC 57-22) se identificaron tres mutaciones a lo largo de la secuencia del gen *ERG11*: K177R, N335S y E343D, las cuales no están relacionadas con la resistencia al fluconazol; sin embargo, están presentes en todas las secuencias correspondientes al clado IV, por lo que actúan como marcadores moleculares de este clado (tabla 7).

Agregando a lo anterior, para cada clado se encontraron mutaciones sinónimas; para los aislamientos MYC 43-21 MYC 67-21, MYC-101-21 y 97-22 del clado I se encontraron tres

mutaciones: N187N, D288D y G476G (tabla 6); mientras que para los aislamientos MYC-82-21 y MYC-57-22 del clado IV se identificaron 16 mutaciones sinónimas: A107A, E153E, F155F, P160P, V166V, Q192Q, T267T, V 304V, G346G, K382K, P386P, G399G, S405S, G476G y L479L. Las secuencias correspondientes al gen *ERG11* fueron depositadas en el banco de genes GenBank del NCBI, los números de acceso se indicaron en la tabla (tabla 7).

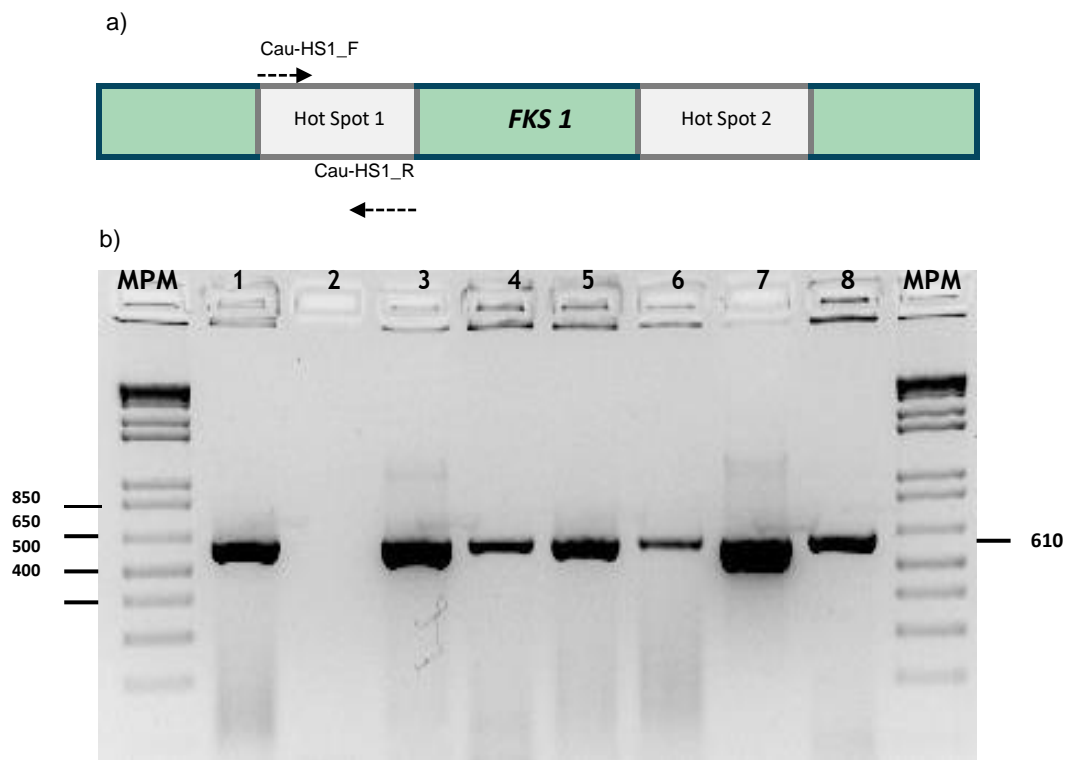
**Tabla 7. Mutaciones encontradas en las secuencias del gen *ERG11* de los seis aislamientos**

Aislamiento	Clado	Mutación en el gen <i>Erg11</i>	Relacionada con	No. acceso GenBank
MYC 43-21	I	N187N, D288D y G476G	Mutación sinónima	OQ506138
MYC 67-21	I	N187N, D288D y G476G	Mutación sinónima	OQ506139
MYC 101-21	I	N187N, D288D y G476G	Mutación sinónima	OQ506140
MYC 97-22	I	N187N, D288D y G476G	Mutación sinónima	OQ506141
MYC 82-21	IV	K177R, N335S y E343D  A107A, E153E, F155F, P160P, V166V, Q192Q, T267T, V304V, G346G, K382K, P386P, G399G, S405S, G476G y L479L.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marcador molecular de clado IV</li>   <li>• Mutación sinónima</li> </ul>	OQ506143
MYC 57-22	IV	K177R, N335S y E343D  A107A, E153E, F155F, P160P, V166V, Q192Q, T267T, V304V, G346G, K382K, P386P, G399G, S405S, G476G y L479L.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marcador molecular de clado IV.</li>   <li>• Mutación sinónima</li> </ul>	OQ506142

#### 4.11.1. Detección de mutación puntual que confiere resistencia a equinocandinas

La identificación del genotipo resistente a las equinocandinas en los aislamientos clínicos de *C. auris*, se realizó mediante la amplificación y secuenciación de una región parcial del gen *FKSI*, que abarcó la región Hot Spot 1 (HS1) donde se encuentra la S639F, relacionada con la resistencia a equinocandinas.

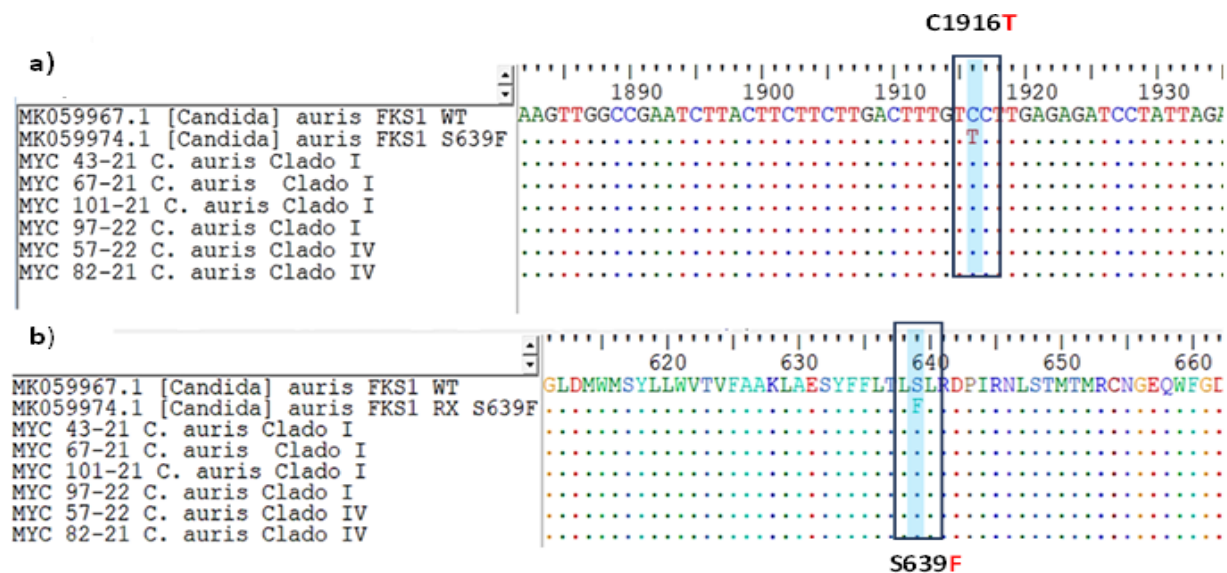
Los seis aislamientos clínicos (MYC 43-21 MYC 67-21, MYC-101-21, MYC 82-21 y MYC 57-22 ) permitieron amplificar un amplicón de aproximadamente 610 pb, correspondiente a una región parcial del gen *FKSI* HS1 (figura 18).



**Figura 18. Amplificación de una región parcial del gen *FKSI***

Visualización de los productos de la amplificación parcial del gen *FKSI* HS1 de *C. auris*. a) Mapa completo del gen *FKSI*. b) Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1: Control positivo *C. auris* (MYC 30-20); carril 2 Control de reactivos; *C. auris*; #2 Control de reactivos; Aislamientos de *C. auris*, carril 3 (MYC 43-21); carril 4 (MYC 67-21); carril 5 (MYC 101-21); carril 6 (MYC 97-22); carril 7 (MYC 57-22); carril 8 (MYC 82-21). En los extremos del gel MPM: Marcador de peso molecular de ADN 1 Kb Plus.

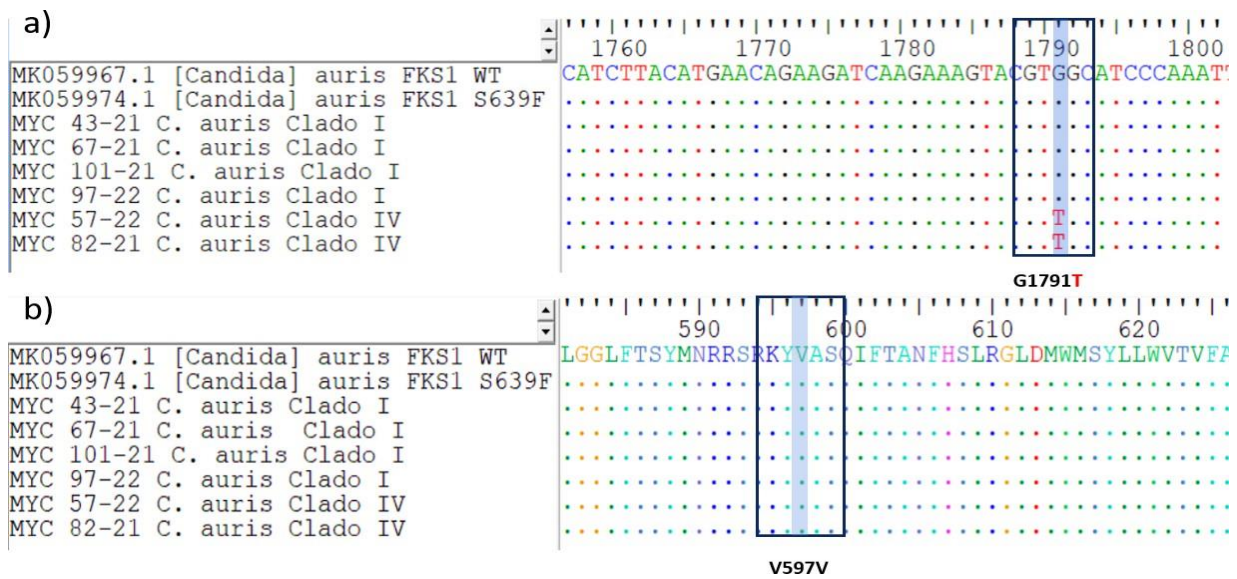
Al analizar la secuencia parcial del gen *FKS1* HS1 de los seis aislamientos no se encontró la mutación S639F asociada con resistencia a equinocandinas, por lo que, todos los aislamientos de *C. auris* de Tabasco mostraron un genotipo silvestre para equinocandinas (figura 19), lo cual es concordante con el fenotipo silvestre encontrado.



**Figura 19. Marcadores moleculares en aislamientos del clado IV**

Imagen que muestra el alineamiento múltiple de una región parcial del gen *FKS1* HS1, correspondiente a los seis aislamientos de Tabasco. **a)** Alineamiento en secuencia nucleotídica. **b)** Alineamiento en secuencia aminoacídica. El alineamiento incluyó dos secuencias de referencia: genotipo silvestre (MK059967); genotipo resistente a equinocandinas (MK059974). En el recuadro en negro se resalta la mutación en secuencia nucleotídica (G1791T) para aislamientos del clado IV.

Por otra parte, en los aislamientos del clado IV (MYC 82-21 y MYC 57-22) se identificó la mutación sinónima V597V dentro del gen *FKS1* (figura 20).



**Figura 20. Identificación de mutaciones en el gen *FKS1* de los aislamientos de *C. auris***

Imagen que muestra el alineamiento múltiple de una región parcial del gen *FKS1* HS1, correspondiente a los seis aislamientos de Tabasco. a) Alineamiento en secuencia nucleotídica. b) Alineamiento en secuencia aminoacídica. El alineamiento incluyó dos secuencias de referencia: genotipo silvestre (MK059967); genotipo resistente a equinocandinas (MK059974). En el recuadro en negro se resalta la región de la mutación. Los seis aislamientos presentaron el genotipo silvestre.

Por último, las secuencias aquí obtenidas para los seis aislamientos clínicos de *C. auris*, correspondientes a una región parcial del gen *FKS1* HS1, fueron depositadas en el GenBank bajo los siguientes números de acceso: MYC 43-21: OQ927386, MYC 67-21: OQ927387, MYC 101-21: OQ927388, MYC 97-22: OQ927389, MYC 57-22: OQ927390 y MYC 82-21: OQ927391.

#### 4.12 Determinación de la clonalidad de los aislamientos de *C. auris*

Con la finalidad de determinar si los seis aislamiento clínicos de *C. auris* fueron clonales y poder saber si derivaron de una misma cepa, se realizó la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés). Sin embargo, no se pudo determinar la huella genética de los seis aislamientos de *C. auris*, debido a que el ADN genómico no fue escindido por la enzima de restricción seleccionada (*Not I*), acorde con lo publicado con Oh *et al.*, (2011). Dado el resultado anterior, se descartó este método para la determinar la clonalidad de los aislamientos.

#### **4.13. Secuenciación completa del genoma de aislados de *C.auris***

La colaboración con la Unidad Genómica, subdivisión de Enfermedades Micóticas de los Centros para el Control y la prevención de Enfermedades (CDC), permitió contar con la secuenciación de genoma completo de los dos primeros aislamientos de *C. auris* de Tabasco. Para los aislamientos MYC 43-21 (B23017) y MYC 67-21 (B23024), el ensamble de las lecturas de secuenciación por mapeo con la secuencia de referencia de *C. auris* B11205 (GCA\_016772135.1), permitió obtener una cobertura del genoma de *C. auris* mayor al 90 % (90.52 % y 90.51%, respectivamente), cuyo contenido de GC fue mayor del 45% y la profundidad de secuenciación, es decir, el promedio del número de veces que se secuenció cada aislamiento fue de 302.9 (302x) y 631(631x) veces, respectivamente (anexo B). Las métricas de calidad indicaron que la secuenciación y el ensamble de ambos aislamientos fue adecuado.

Por otra parte, el equipo del CDC llevó a el análisis de llamado de variantes a lo largo de todo el genoma de *C. auris* de ambos aislamientos mediante el flujo de trabajo bioinformático MycoSNP , el cual permitió recuperar todas las posiciones variables en formato FASTA de los archivos VCF utilizando un script de Python “vcfSnpsToFasta.py” (<https://github.com/broadinstitute/broad-fungalgroup/tree/master/scripts/SNPs>) (Datos no proporcionados). Mientras que, para el análisis filogenético ellos determinaron las distancias por pares para generar el árbol de unión de vecinos (NJ) mediante el programa MEGA-X. Para la visualización del árbol, utilizaron la aplicación de JavaScript basada en el programa en línea Microreact. La diferencia en la mediana de SNP la calcularon utilizando scripts R internos y una matriz de distancias por pares calculada por MEGA-X (figura 21).

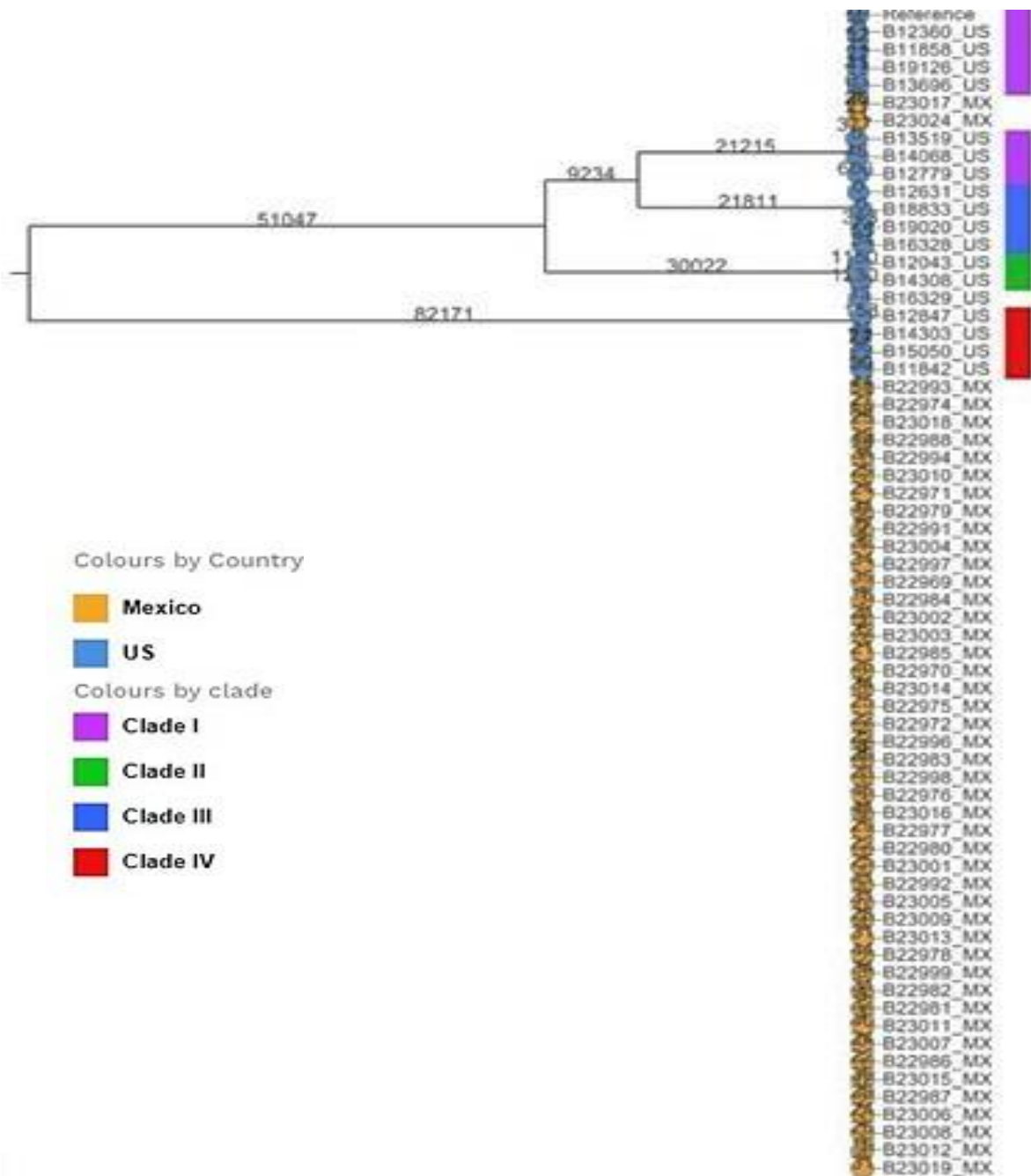
El análisis filogenómico (WGS) permitió corroborar que ambos aislamientos, MYC 43-21 (B23017) y MYC 67-21 (B23024) pertenecieron al clado I (Sur de Asia). Además, el análisis

filogenético corroboró los hallazgos previamente encontrados por PCR-Secuenciación, en los genes *ERG11* y *FKSI*, no encontraron mutaciones hecho que confirma que ambos aislamientos fueron susceptibles a fluconazol y equinocandinas.

Finalmente, el análisis de variantes, el cual se centró en asociaciones entre los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) entre las dos secuencias de mismo clado, incluyendo secuencias correspondientes a aislamientos clínicos del clado I y la secuencia de referencia del clado I, permitió definir que los dos primeros aislamientos de Tabasco están estrechamente relacionados con una distancia media de 31 SNP (figura 21). Estos 31 SNPs, se ubicaron en todo el genoma, se encontró el mayor número de cambios de un solo nucleótido en el cromosoma 4 (Tabla 8).

Por otra parte, el equipo de trabajo no pudo realizar el análisis para determinar la distancia promedio entre los aislamientos de este clado debido a que sólo se contemplaron dos aislamientos, debido a que se limitó en número de aislamientos a secuenciar. El análisis también incluyó aislamientos mexicanos pertenecientes al clado IV, en los cuales se observa mayor variabilidad genética entre ellos, con una distancia media de 69 SNPs. Sin embargo, estos aislamientos no forman parte de los objetivos de este trabajo de tesis debido a que pertenecen a otra región geográfica.

“La información incluida en este informe debe utilizarse con fines epidemiológicos únicamente para apoyar los esfuerzos de prevención de infecciones y control de la salud pública. Este informe no debe utilizarse para guiar las decisiones de tratamiento ni debe incluirse en el registro del paciente”.



**Figura 21. Árbol filogenético de *C. auris* por secuenciación completa del genoma**  
 Árbol filogenético de *C. auris* por secuenciación completa del genoma construido con el método NJ, el cual se construyó con el programa MEGA X. En las ramas se indican los SNP, los colores, corresponden a los países de origen de los especímenes (México: amarillo; Estados Unidos: azul). Los colores de los bloques de metadatos en la leyenda representan los clados de *C. auris* (I-IV). Fuente (Mycotic Diseases Branch Laboratory, CDC)

**Tabla 8. Posición de SNPs en el genoma de los aislamientos de Tabasco**

SNP	N° acceso	Cromosoma	Referencia/ Mutación	Posición	MYC 43-21	MYC 67-21
1	CP060345.1	7	A/T	156353	SI	NO
2	CP060345.1		C/A	176765	SI	NO
3	CP060345.1		G/A	756528	SI	NO
4	CP060344.1	6	G/A	27058	SI	SI
5	CP060344.1		T/C	29287	SI	SI
6	CP060344.1		A/C	41214	SI	SI
7	CP060344.1		A/C	411960	SI	SI
8	CP060344.1		T/G	444925	SI	NO
9	CP060344.1		G/C	475549	SI	SI
10	CP060344.1		T/A	916853	SI	SI
11	CP060343.1	5	T/A	45684	NO	SI
12	CP060343.1		T/A	429626	NO	SI
13	CP060343.1		G/A	195533	SI	SI
14	CP060343.1		T/C	533489	SI	SI
15	CP060343.1		A/G	659804	SI	SI
17	CP060343.1		A/G	673781	SI	SI
18	CP060343.1		T/C	812246	SI	SI
19	CP060342.1	4	G/A	81786	SI	SI
20	CP060342.1		A/G	108510	SI	SI
21	CP060342.1		A/T	245497	SI	SI
22	CP060342.1		A/G	260281	SI	SI
23	CP060342.1		C/T	429626	NO	SI
24	CP060342.1		T/G	664509	SI	SI
25	CP060342.1		C/T	820707	SI	SI
26	CP060342.1		C/A	103683	NO	SI
27	CP060342.1		T/A	1021684	SI	NO
28	CP060342.1		G/A	1113608	SI	SI
29	CP060342.1		A/T	1280723	SI	SI
30	CP060341.1	3	T/G	148406	SI	NO
31	CP060341.1		A/G	182115	SI	SI
32	CP060341.1		G/A	215757	SI	SI
33	CP060341.1		T/C	629487	NO	SI
34	CP060341.1		C/T	1311625	SI	SI
33	CP060340.1	2	T/A	88479	NO	SI
35	CP060340.1		A/G	394606	SI	SI
36	CP060340.1		T/C	1058081	SI	SI

## CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

El primer aislamiento de *Candida auris* en México fue identificado en el estado de Nuevo León en mayo de 2020, el cual perteneció al clado IV (Sudamericano) y fue recuperado de una paciente que presentaba una endometriosis severa. Este fue el primer aislamiento de *C. auris* multirresistente, mostrando disminución de la susceptibilidad al fluconazol y a anfotericina B, antifúngicos empleados en el tratamiento de las fungemias en la mayoría de los hospitales de México (Ayala-Gaytán *et al.*, 2021).

Desde el primer caso, dio origen al primer brote de *C. auris* en México, en el cual confirmaron 18 casos, sin embargo, el brote se expandió recuperando al menos 50 casos. Este brote se caracterizó porque fue causado por una levadura del clado IV (Sudamericano), resistente al fluconazol y anfotericina B, sin embargo, ningún aislamiento mostró resistencia a las equinocandinas. Interesantemente la mayoría de los pacientes cursaba con la COVID-19 y se encontraban en la Unidad de cuidados intensivos; en este brote se registró un porcentaje alto de mortalidad del 80% (Villanueva-Lozano *et al.*, 2021).

En el presente trabajo se estudiaron 20 aislamientos de *Candida spp* causantes de fungemias y sospechosos de *C. auris*, pertenecientes a la colección del InDRE, los cuales fueron recibidos por el instituto en el periodo de junio de 2021 a julio de 2022, provenientes de tres distintos hospitales de la ciudad de Villahermosa, Tabasco, con el fin de confirmar o descartar la presencia de *C. auris*.

Contrario a lo reportado por Villanueva-Lozano y cols., en este trabajo se identificaron únicamente seis aislamientos de *C. auris* como agente causal de fungemia, mientras que, en el resto de los aislamientos del universo de muestra, se encontraron al menos cinco especies de

*Candida* spp involucradas en el desarrollo de fungemias. El principal agente causal fue debido a *C. parapsilosis* (9/20 casos, 45 %), seguido de *C. auris* (6/20 casos, 30 %), *C. glabrata* (2/20 casos, 10 %), *C. duobushaemulonii* (2/20 casos, 10 %) y un aislamiento de *C. intermedia* (1/20, 5 %).

Turner y Butler, (2014) reportaron que las especies del género *Candida* son la cuarta causa de infecciones invasivas, las cuales afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos. Interesantemente, la mayoría de los aislamientos del universo de muestras de este estudio, se encontraban dentro de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de tres hospitales: Hospital Regional Dr. Juan Graham Casasús, Hospital Dr. Gustavo A. Rovirosa Pérez y el Hospital regional de Alta Especialidad de la Mujer.

El análisis filogenético de la región de ITS permitió observar la variabilidad genética entre las especies encontradas de *Candida*. *C. parapsilosis* mostró cierta variabilidad intra-genética cuando se visualizó el árbol filogenético de la región de ITS. Este análisis filogenético permitió identificar a dos subpoblaciones: *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* (5/9; 25%, y 4/9; 20 %, respectivamente). Cabe resaltar que 6/9 aislamientos se recuperaron de neonatos de la cuales, se reportaron 3/6 muertes, de los cuales se les aisló *C. orthopsilosis*. La candidemia por especies del complejo *C. parapsilosis* predominan en neonatos y lactantes, sobre todo en los recién nacidos prematuros de bajo peso que se encuentran ingresados en las UCI (Pemán y Quindós, 2016).

Por otra parte, la identificación microbiológica y molecular permitió diferenciar correctamente entre especies genéticamente cercanas con *C. auris*, como *C. duobushaemulonii* y *C. intermedia* (2/20; 10 % y 1/20; 5 %, respectivamente). Las infecciones por estas especies son poco frecuentes, generalmente están asociadas a candidiasis vulvovaginal e infecciones crónicas de

heridas en extremidades inferiores y raramente con infecciones invasivas (Ramos *et al.*, 2018).

Prosiguiendo en nuestro análisis, en el universo de muestras también se identificó a *C. glabrata* (2 /20; 10 %), especie genéticamente distintas a *C. auris*, se aislaron de pacientes adultos que cursaban con la COVID-19, *C. glabrata* es causante de candidiasis invasivas en pacientes de edad avanzada, resultado que es concordante con lo reportado por (Permán y Quindós, 2016).

Por otra parte, para los seis aislamientos de *C. auris* es importante destacar los datos epidemiológicos, de ellos dependerá si éstos estuvieron relacionados con un brote de *C. auris* en la entidad. Los seis aislamientos provinieron de dos hospitales distintos: cinco aislamientos provinieron del “Hospital Regional Dr. Juan Graham Casasús” y un aislamiento del “Hospital Dr. Gustavo A. Rovirosa Pérez”. Todos los pacientes a los que se les aisló *C. auris*, que se encontraban cursando con la COVID-19, a excepción de una paciente que sufrió quemaduras de tercer grado (MYC 57-22), dichos pacientes se encontraban en la UCI.

Se aisló a *C. auris* a partir de hemocultivo, urocultivo y lavado bronquio alveolar, el 67 % de las muestras se aislaron de pacientes del género femenino, la media de edad osciló entre los 49 años. Nuevamente, contrario a lo observado en el brote de Monterrey por Villanueva y Cols. el porcentaje de mortalidad por *C. auris* fue muy bajo (1/6), también en contraste a lo reportado por (Spivak y Hanson, 2018). No obstante, este dato es congruente con los resultados de susceptibilidad a los antifúngicos aquí encontrados, donde la mayoría de los aislamientos de *C. auris* de Tabasco fueron susceptibles a los tres tipos de antifúngicos.

De Alameida y cols y cols, reportaron que aislamientos clínicos de *C. auris*, clado I recuperados en Brasil mostraron susceptibilidad a los tres tipos de antifúngicos, contrario a las cepas del

clado I que circulan en el continente asiático, nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado por estos autores (Almeida *et al.*, 2021).

Referente a la caracterización microbiológica de los seis aislamientos de *C. auris*, en Agar Dextrosa Sabouraud, permitió confirmar la morfología característica de *C. auris*: colonias blancas, colonias redondas blancas de aspecto cremoso en medio Sabouraud, características que concuerdan con lo reportado en la literatura (Prakash *et al.*, 2016; Usca *et al.*, 2021).

En este trabajo observamos dos fenotipos coloniales diferentes en CHROMagar Candida, cinco aislamientos desarrollaron un crecimiento de color rosa claro con tonalidades violáceas, y un aislamiento desarrolló un crecimiento de color rosa intenso, esto puede deberse a que *C. auris* es una levadura que sufre transiciones morfológicas entre fenotipos de colonia que va desde un color rosa claro, y púrpura oscura cuando se cultiva en CHROMagar (Usca *et al.*, 2021; Bentz *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos indican que el medio CHROMagar no permite la correcta identificación de *C. auris* cuando se quiere diferenciar de especies filogenéticamente cercanas, como especie del complejo *C. haemulonii*, del complejo *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, también desarrollan colonias de color rosa claro (Tamura *et al.*, 2022).

En consecuencia, a esto, se han desarrollado otros medios selectivos como el medio CHROMagar<sup>TM</sup> Candida Plus (CHROMagar, París, Francia) y HiCrome<sup>TM</sup> Candida, para discriminar aún más las colonias de *C. auris* de otras especies (Ruiz-Gaitán *et al.*, 2023; Borman *et al.*, 2021). Sin embargo, este nuevo medio, no está accesible en la mayoría de los laboratorios de microbiología, por lo que se sugiere complementar el análisis microbiológico con otras pruebas como la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y técnicas moleculares como la

PCR-Secuenciación con espaciador transcrito interno y la región de dominios (ITS1-ITS2 y D1/D2, respectivamente) (Prakash *et al.*, 2016).

Con base al resultado arrojado por el sistema VITEK 2 en su versión 8.01, los seis aislamientos fueron identificados correctamente como *C. auris*, con un nivel de confianza del 94-97 %, a diferencia de versiones anteriores, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por (Carvajal-Valencia *et al.*, 2020).

Una de las aportaciones de este trabajo de investigación es que se observaron dos morfologías microscópicas diferentes en el microcultivo: en cuatro aislamientos se observó desarrolló de pseudohifas con abundantes blastoconidias laterales (MYC 43-21, MYC 67-21, MYC 101-21 y MYC 97- 22), correspondientes al clado I; mientras que dos aislamientos desarrollaron células individuales con escasos blastoconidios (MYC 82-21 y MYC 57-22), correspondientes al clado IV. Este hallazgo sugiere que los genotipos de *C. auris* clado I y clado IV son microscópica y bioquímicamente distintos. En este contexto, los aislamientos del clado I fueron capaz de asimilar la D-xilosa a través del sistema VITEK mientras que los aislamientos del clado IV no asimilaron este azúcar, contrario a lo reportado por Du y cols, donde menciona que *C. auris* es incapaz de asimilar dicho azúcar (Du *et al.*, 2021).

Esta diferencia microbiológica y bioquímica puede ser empleada para tener una idea del genotipo involucrado de *C. auris*.

Szekely *et al.*, (2019) mencionan que dichas morfologías están relacionadas con los clados, los aislamientos pertenecientes al clado I (Sur de Asia), desarrollan pseudohifas, por otro lado, los aislamientos del clado II (Este de Asia), clado III (Sudáfrica) y clado IV (Sudamericano) solo

desarrollan células individuales esto concuerda con la morfología encontrada en estos aislamientos.

Siguiendo con la caracterización microscópica, los seis aislamientos no desarrollaron clamidosporas en agar harina de maíz, acorde con lo obtenido por (Larkin *et al.*, 2017). De igual forma, no se observó desarrollo de tubo germinativo en ninguno de los aislamientos de *C. auris*, acorde con (Mahmoudi *et al.*, 2019).

Por otra parte, el análisis filogenético de secuencias de las regiones de (ITS1- ITS2 y D1/D2 del gen 26S) confirmó la variabilidad intra-génica entre *C. auris*. Los seis aislamientos se ubicaron en dos clado distintos, clado I (Sur de Asia) y clado IV (Sudamericano). Dicho resultado se confirmó mediante la secuenciación de la región de D1/D2, la cual es una región más conservada y efectivamente corroboramos la definición de los clados (I y IV). No se cumplió la hipótesis planteada en este trabajo, dado que los aislamientos se ubicaron en dos clados distintos de Tabasco del clado I (Sur de Asia), sin embargo, en el estado de Tabasco están circulando dos clados, de cuales la mayoría presenta un perfil de susceptibilidad. Kurtzman *et al.*, (2015), menciona que ambas regiones son consideradas como el estándar para la identificación de especies ascomicetas.

Considerando que *C. auris* es una especie (MDR), demostramos que tres aislamientos de *C. auris*, presentaron un perfil de susceptibilidad a las tres clases de antifúngico pertenecientes al clado I (Sur de Asia), únicamente el aislamiento MYC 97-22 fue resistencia a fluconazol con una CMI de (64 µg/ml). Cabe señalar que los seis aislamientos presentaron un perfil de susceptibilidad para anfotericina B y caspofungina, contrario a lo reportado por otros autores, donde se menciona que los aislamientos del clado I (Sur de Asia), presentan un perfil de

multirresistencia (Chowdhary *et al.*, 2018; Lockhart *et al.*, 2017).

Con respecto a los dos aislamientos pertenecientes al clado IV (Sudamericano), estos presentaron un perfil de susceptibilidad a los tres clases de antifúngicos probados, resultado que no concuerda con lo reportado para los aislamientos de este clado, ya que presentan resistencia variable a la anfotericina B y al fluconazol (Jacobs *et al.*, 2022; Escandón *et al.*, 2019).

De igual manera, se corroboró el perfil de resistencia para fluconazol observado por pruebas fenotípicas, mediante la detección de las mutaciones Y132F y K143R en el gen *ERG11*. En este estudio no se encontraron mutaciones en las secuencias de los seis aislamientos, dichas secuencias presentaron el genotipo silvestre, al igual el aislamiento resistente a fluconazol (MYC 97-22) perteneciente al clado I (Sur de Asia), con CMI de (64 µg/ml). Muchas cepas que muestran una CMI relativamente alta para fluconazol y no portan una mutación en el gen *ERG11*, la resistencia a dicho fármaco puede estar relacionado otro mecanismo, como lo es la sobre expresión de bombas de flujo del tipo ABC en la membrana plasmática, lo cual esté favoreciendo la expulsión del dicho antifúngico (Al-jindan *et al.*, 2021; Chowdhary *et al.*, 2018).

Por otra parte, la resistencia a los azoles está relacionada con la aneuploidía del cromosoma V debido a que dicho cromosoma alberga un copia extra. El cromosoma V alberga genes encargados de la biosíntesis del ergosterol (*NCP1*, *ERG9*, *ERG13* y *ZCF22*), provocando una sobreexpresión de dichos genes, que confieren resistencia a los azoles (Bing *et al.*, 2020).

de Almeida *et al.*, (2021) también reportaron aislamientos pertenecientes al clado I, los cuales eran sensibles a las tres clases de antifúngicos y no presentaron mutaciones en el gen *ERG11*,

dichos autores, notifican el primeros aislamientos de esta levadura pertenecientes al clado I en América latina que presentan un perfil de susceptibilidad. Dicho resultado es muy similar a que nosotros estamos retando para Tabasco.

Por lo consiguiente se encontraron tres mutaciones en los dos aislamientos del clado IV (Sudamericano), K177R/N335S/E343D, dichas mutaciones no están asociadas con la resistencia a los azoles, sino que son marcadores moleculares de clados, esto concuerda con lo obtenido por (Hou *et al.*, 2019; Healey *et al.*, 2018).

De igual forma, analizar las secuencias de la región parcial del gen *FKSI* HS1 de los seis aislamientos, no se encontró la mutación (S639F) asociada con resistencia a equinocandinas. Nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por Sharma *et al.*, (2022) por lo tanto, las equinocandinas siguen siendo una terapia segura para la candidemia por *C. auris*.

La electroforesis de campos pulsados es una herramienta muy útil en estudios epidemiológicos, es una técnica difícil altamente laboriosa de llevar a cabo, porque influyen factores que interfieren en el resultado. En este trabajo no logramos reproducir dicha técnica, esto pudo deberse a muchos factores uno de ellos es que pudo deberse a que no se alcanzó las concentraciones adecuadas de los reactivos, que hayan interferido proteasas, que no se haya liberación el ADN, así como también el nivel de experiencia individual tal y como lo menciona (Parizad *et al.*, 2016; Khosravi *et al.*, 2014).

Por otra parte, el análisis de SNP de los primeros aislamientos de *C. auris* MYC 43-21 y MYC 97-22 sugiere que los aislamientos están genéticamente relacionados; sin embargo, no se puede aseverar que derivan de un brote, seguramente se trató de una transmisión. Chow *et al.*, (2018), mencionan que actualmente no existe puntos de corte de SNP para determinar si una cepa es

clonal o no, debido a que es necesario complementar con la búsqueda de mutaciones puntuales en distintos genes y aspectos epidemiológicos. Sin embargo, las diferencias de SNP observadas pueden usarse como punto de referencia para evaluar la transmisión.

Actualmente en el estado de Tabasco circulan dos clados de *C. auris* clado I (Sur de Asia) y clado IV (Sudamericano). El clado IV es el que se ha reportado en dos estados del país, Monterrey y Tabasco, pero dichos aislamientos difieren en el perfil de resistencia a los antifúngicos, debido a que los aislamientos del clado IV de Monterrey son multidrogoresistentes presentando resistencia a fluconazol y anfotericina B, mientras que los aislamientos de Tabasco son sensibles a las tres clases de antifúngicos (Ayala-Gaytán *et al.*, 2021; Villanueva-Lozano *et al.*, 2021).

La presencia de *C. auris* del clado IV, en México pudo deberse a una introducción del país vecino, Estados Unidos de América, debido a que este es el país con más brotes de *C. auris* en América, reportándose más de 1500 casos. Cabe resaltar que en este país circulan los cuatro clados representativos de esta especie, siendo los clado I, III y IV los que han causado brote, mismos que han presentado un perfil de multiresistencia y un índice de muerte elevada. Por tal razón, intuimos que la primera aparición de esta levadura emergente se debió a una introducción de dicho país (Rossi *et al.*, 2023; Organización Panamericana de la Salud, 2021).

Por otra parte, evidencia científica indica que *C. auris* clado I emergió en Guatemala durante el año 2020 y es muy probable, que la presencia de *C. auris* clado I en Tabasco se haya debido a la introducción de esta cepa, debido a la concentración de migrantes centroamericanos en el sureste del país (OPS, 2021).

Actualmente *C. auris* en México no ha representado ser un patógeno de alerta, debido a que los brotes han sido contenidos y no han surgido más casos relacionado con cepas multirresistentes a diferencia de otros países en donde esta levadura es un patógeno de gran importancia, tal es el caso de Colombia que se ha registrado casos y brotes por *C. auris* desde el año 2016. En dicho país la notificación de *C. auris* es obligatoria (Escandón *et al.*, 2023).

## CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

- Las pruebas microbiológicas (crecimiento en medios diferenciales, la prueba de tubo germinativo y producción de clamidosporas) y moleculares (PCR-Secuenciación de la regiones de ITS ) empleadas en este trabajo permitieron identificar especies de *Candida* involucradas en el desarrollo de fungemias durante el periodo de estudio en Villahermosa Tabasco.
- De los 20 aislamientos, nueve resultaron ser *C. parapsilosis* (45 %), seis *C. auris* (30 %), dos *C. glabrata* (10 %), dos *C. duobushaemulonii* (10 %) y un aislamiento de *C. intermedia* (5 %).
- Morfológicamente se observaron dos grupos de *C. auris*, el primer grupo se caracterizó por la presencia de levaduras con pseudohifas y blastoconidios en forma racismos, mientras que en el segundo grupo se observaron células individuales algunas con blastoconidios.
- El análisis filogenético de la región ITS y Dominio D1/D2 del ADNr reveló la presencia del clado I (Sur de Asia) y el clado IV (Sudamericano) circulando en el estado de Tabasco.
- Cinco aislamientos mostraron un perfil de susceptibilidad a fluconazol, anfotericina B y caspofungina, solo un aislamiento (MYC 97-22) mostró resistencia al fluconazol (CMI 64 µg/ml) y resultó ser sensible a la anfotericina B y caspofungina.
- No se encontraron mutaciones en los genes *ERG11* y *FKS1* HS1, relacionados con la resistencia a fluconazol y equinocandinas.
- Los aislamientos de *C. auris* estudiados en este trabajo posiblemente no derivaron de un brote, más bien pudo deberse a eventos individuales atemporales.

## CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS

En el estado de Tabasco circulan dos clados de *C. auris*, donde la mayoría de los aislamientos presentan un perfil de susceptibilidad a las tres clases de fármacos a excepción del aislamiento MYC 97-22. Se recomienda que para futuros estudios resultaría de interés cuantificar la expresión del gene *CDRI* el cual codifica para las bombas de flujo de tipo *ABC* la cuales están relacionadas con la resistencia a fluconazol.

Por otra parte, sería conveniente llevar a cabo el análisis de la producción y el desarrollo de la biopelícula, así como la expresión de factores de virulencia como contribuyentes en la patogenicidad.

Con relación al análisis filogenómico, sería conveniente realizar un análisis más profundo, como lo es la secuenciación completa del genoma del resto de aislamientos, para definir el origen de las introducciones de *C. auris* en Tabasco.

## CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abastabar, M., Haghani, I., Ahangarkani, F., Rezai, M. S., Taghizadeh Armaki, M., Roodgari, S., Kiakojuri, K., Al-Hatmi, A. M. S., Meis, J. F., & Badali, H. (2019). *Candida auris* otomycosis in Iran and review of recent literature. *Mycoses*, 62(2), 101–105. <https://doi.org/10.1111/MYC.12886>
- Ahmad, S., & Alfouzan, W. (2021). *microorganisms Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms>
- Al-jindan, R., Aleraky, D. M., Mahmoud, N., Abdalhamid, B., Almustafa, M., Abdulazeez, S., & Francis Borgio, J. (2021). Drug Resistance-Associated Mutations in *ERG11* of Multidrug-Resistant *Candida auris* in a Tertiary Care Hospital of Eastern Saudi Arabia. *Journal of Fungi*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.3390/JOF7010018>
- Ambaraghassi, G., Dufresne, P. J., Dufresne, S. F., Vallières, É., Muñoz, J. F., Cuomo, C. A., Berkow, E. L., Lockhart, S. R., & Luong, M. L. (2019). Identification of *Candida auris* by Use of the Updated Vitek 2 Yeast Identification System, Version 8.01: a Multilaboratory Evaluation Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(11). <https://doi.org/10.1128/JCM.00884-19>
- Arbefeville, S., Harris, A., & Ferrieri, P. (2017). Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. *Journal of Microbiological Methods*, 140, 40–46. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2017.06.015>
- Arendrup, M. C., Prakash, A., Meletiadis, J., Sharma, C., & Chowdhary, A. (2017). Comparison of EUCAST and CLSI reference microdilution mics of eight antifungal compounds for *Candida auris* and associated tentative epidemiological cutoff values.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.00485-17/ASSET/84C742F1-BA9B-4E17-B5D5-FBC16713262F/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0071762660001.JPEG>

- Ayala-Gaytán, J. J., Montoya, A. M., Martínez-Resendez, M. F., Guajardo-Lara, C. E., de J. Treviño-Rangel, R., Salazar-Cavazos, L., Llaca-Díaz, J. M., & González, G. M. (2021). First case of *Candida auris* isolated from the bloodstream of a Mexican patient with serious gastrointestinal complications from severe endometriosis. *Infection*, 49(3), 523–525. <https://doi.org/10.1007/S15010-020-01525-1/METRICS>
- Barker, B. M., Litvintseva, A., Bowers, J., Farrer, R. A., Chybowska, A. D., & Childers, D. S. (2020). *Nine Things Genomics Can Tell Us About Candida auris*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00351>
- Ben-Ami, R., Berman, J., Novikov, A., Bash, E., Shachor-Meyouhas, Y., Zakin, S., Maor, Y., Tarabia, J., Schechner, V., Adler, A., & Finn, T. (2017). Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, 23(1), 195–203. <https://doi.org/10.3201/EID2302.161486>
- Bentz, M. L., Joseph Sexton, D., Welsh, R. M., & Litvintseva, A. P. (2019). Phenotypic switching in newly emerged multidrug-resistant pathogen *Candida auris*. *Medical Mycology*, 57(5), 636–638. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYY100>
- Bing J, Hu T, Zheng Q, Muñoz JF, Cuomo CA, Huang G. (2020). Experimental Evolution Identifies Adaptive Aneuploidy as a Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 16;65(1): e01466-20. doi: 10.1128/AAC.01466-20. PMID: 33077664; PMCID: PMC7927865.
- Borman, A. M., Fraser, M., & Johnson, E. M. (2021). CHROMagar™ Candida Plus: A novel chromogenic agar that permits the rapid identification of *Candida auris*. *Medical Mycology*, 59(3), 253–258. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYAA049>

- Borman, A. M., Szekely, A., & Johnson, E. M. (2016). Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. *MSphere*, 1(4). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00189-16>
- Caceres, D. H., Forsberg, K., Welsh, R. M., Sexton, D. J., Lockhart, S. R., Jackson, B. R., & Chiller, T. (2019). *Candida auris*: A Review of Recommendations for Detection and Control in Healthcare Settings. *Journal of Fungi 2019, Vol. 5, Page 111*, 5(4), 111. <https://doi.org/10.3390/JOF5040111>
- Calvo, B., Melo, A. S. A., Perozo-Mena, A., Hernandez, M., Francisco, E. C., Hagen, F., Meis, J. F., & Colombo, A. L. (2016). First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *Journal of Infection*, 73(4), 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.07.008>
- Carvajal-Valencia, S. K., Lizarazo, D., Duarte, C., Escandon, P., Carvajal-Valencia, S. K., Lizarazo, D., Duarte, C., & Escandon, P. (2020). Identificación de aislamientos de *Candida auris* recuperados a través de la vigilancia por laboratorio en Colombia: un reto para el diagnóstico. *Infectio*, 24(4), 224–228. <https://doi.org/10.22354/IN.V24I4.880>
- Castrillon, Laura. , P. & P. C. (2005). *Virulence factors of Candida sp.* <https://www.researchgate.net/publication/286816593>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation | Candida auris | Fungal Diseases | CDC.* <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>
- Chaabane, F., Graf, A., Jequier, L., & Coste, A. T. (2019). Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 499266. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02788/BIBTEX>
- Chatterjee, S., Alampalli, S. V., Nageshan, R. K., Chettiar, S. T., Joshi, S., & Tatu, U. S. (2015). Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida*

*auris*. *BMC Genomics*, 16 (1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1863-Z/FIGURES/8>

- Chow, N. A., Muñoz, J. F., Gade, L., Berkow, E. L., Li, X., Welsh, R. M., Forsberg, K., Lockhart, S. R., Adam, R., Alanio, A., Alastruey-Izquierdo, A., Althawadi, S., Araúz, A. B., Ben-Ami, R., Bharat, A., Calvo, B., Desnos-Ollivier, M., Escandón, P., Gardam, D., Cuomo, C. A. (2020). Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. *MBio*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.03364-19>
- Chowdhary, A., Prakash, A., Sharma, C., Kordalewska, M., Kumar, A., Sarma, S., Tarai, B., Singh, A., Upadhyaya, G., Upadhyay, S., Yadav, P., Singh, P. K., Khillan, V., Sachdeva, N., Perlin, D. S., & Meis, J. F. (2018). A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: role of the *ERG11* and *FKS1* genes in azole and echinocandin resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(4), 891–899. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX480>
- de Almeida, J. N., Francisco, E. C., Hagen, F., Brandão, I. B., Pereira, F. M., Presta Dias, P. H., de Miranda Costa, M. M., de Souza Jordão, R. T., de Groot, T., & Colombo, A. L. (2021). Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/JOF7030220>
- Du, H., Bing, J., Hu, T., Ennis, C. L., Nobile, C. J., & Huang, G. (2020). *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathogens*, 16(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008921>
- Du, M., Hu, W., Tamura, T., Alshahni, M. M., Satoh, K., Yamanishi, C., Naito, T., & Makimura, K. (2021). Investigation of the Physiological, Biochemical and Antifungal Susceptibility Properties of *Candida auris*. *Mycopathologia*, 186(2), 189–198. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00526-w>

- Escandón, P., Lockhart, S. R., Chow, N. A., & Chiller, T. M. (2023). *Candida auris*: a global pathogen that has taken root in Colombia. *Biomédica*, 43(Suppl 1), 278. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.7082>
- Escandón, P., Chow, N. A., Caceres, D. H., Gade, L., Berkow, E. L., Armstrong, P., Rivera, S., Misas, E., Duarte, C., Moulton-Meissner, H., Welsh, R. M., Parra, C., Pescador, L. A., Villalobos, N., Salcedo, S., Berrio, I., Varón, C., Espinosa-Bode, A., Lockhart, S. R., ... Chiller, T. M. (2019). Molecular Epidemiology of *Candida auris* in Colombia Reveals a Highly Related, Countrywide Colonization With Regional Patterns in Amphotericin B Resistance. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 68(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/CID/CJY411>
- Forgács, L., Borman, A. M., Prépost, E., Tóth, Z., Kardos, G., Kovács, R., Szekely, A., Nagy, F., Kovacs, I., & Majoros, L. (2020). *Comparison of in vivo pathogenicity of four Candida auris clades in a neutropenic bloodstream infection murine model I*. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1771218>
- García, C. S., Palop, N. T., Bayona, J. V. M., García, M. M., Rodríguez, D. N., Álvarez, M. B., Serrano, M. del R. G., & Cardona, C. G. (2020). *Candida auris*: descripción de un brote. *Enferm. Infec. Microbiol. Clín. (Ed. Impr.)*, 38, 39–44. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2020.02.007>
- Girard, V., Mailler, S., Chetry, M., Vidal, C., Durand, G., van Belkum, A., Colombo, A. L., Hagen, F., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2016). Identification and typing of the emerging pathogen *Candida auris* by matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry. *Mycoses*, 59(8), 535–538. <https://doi.org/10.1111/MYC.12519>
- González-Durán, E., Contreras-Pérez, C. U., Caceres, D. H., Ríos-Rosas, C., Piñón-Ortega, J. de J., Téllez-Saucedo, M. D., Marín-Suro, E. S., Wong-Arámbula, C. E., Moreno-Escobar, E. A., Ramírez-González, J. E., Ramírez-Barrios, J. G., Montes-Colima, N. A., Lockhart, S.

- R., Martínez-Montiel, N., Martínez-Contreras, R. D., García-Ruíz, P., Salazar-Sánchez, M. I., Hernández-Rivas, L., & López-Martínez, I. (2022). The use of readily available laboratory tests for the identification of the emerging yeast *Candida auris* in Mexico. *Archives of Microbiology*, 204(9). <https://doi.org/10.1007/S00203-022-03159-3>
- Healey, K. R., Kordalewska, M., Ortigosa, C. J., Singh, A., Berrío, I., Chowdhary, A., & Perlin, D. S. (2018). Limited *ERG11* Mutations Identified in Isolates of *Candida auris* Directly Contribute to Reduced Azole Susceptibility. <https://doi.org/10.1128/AAC.01427-18>
  - Hernando-Ortiz, A., Mateo, E., Perez-Rodriguez, A., De Groot, P. W. J., Quindós, G., & Eraso, E. (2021). Virulence of *Candida auris* from different clinical origins in *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* host models. *Virulence*, 12. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1908765>
  - Hirayama, T., Miyazaki, T., Sumiyoshi, M., Ito, Y., Ashizawa, N., Takeda, K., Iwanaga, N., Takazono, T., Yamamoto, K., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Makimura, K., Tsukamoto, K., Kohno, S., & Mukae, H. (2023). Echinocandin Resistance in *Candida auris* Occurs in the Murine Gastrointestinal Tract Due to *FKSI* Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.01243-22>
  - Horton, M. V., & Nett, J. E. (2020). *Candida auris* infection and biofilm formation: going beyond the surface. *Current Clinical Microbiology Reports*, 7(3), 51–56. <https://doi.org/10.1007/S40588-020-00143-7>
  - Hou, X., Lee, A., Jiménez-Ortigosa, C., Kordalewska, M., Perlin, D. S., & Zhao, Y. (2018). Rapid Detection of *ERG11*-Associated Azole Resistance and *FKS*-Associated Echinocandin Resistance in *Candida auris*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01811-18>

- *Identificación de Candida auris | Candida auris | Enfermedades fúngicas | Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.* (2022). CDC. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/identification.html>
- Jacobs, S. E., Jacobs, J. L., Dennis, E. K., Taimur, S., Rana, M., Patel, D., Gitman, M., Patel, G., Schaefer, S., Iyer, K., Moon, J., Adams, V., Lerner, P., Walsh, T. J., Zhu, Y. C., Anower, M. R., Vaidya, M. M., Chaturvedi, S., & Chaturvedi, V. (2022). *Candida auris* Pan-Drug-Resistant to Four Classes of Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(7). <https://doi.org/10.1128/AAC.00053-22>
- Kathuria, S., Singh, P. K., Sharma, C., Prakash, A., Masih, A., Kumar, A., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2015). Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and ADN sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by vitek 2, CLSI broth microdilution, and etest method. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(6), 1823–1830. <https://doi.org/10.1128/JCM.00367-15>
- Khan, Z., & Ahmad, S. (2017). *Candida auris*: An emerging multidrug-resistant pathogen of global significance. *Current Medicine Research and Practice*, 7(6), 240–248. <https://doi.org/10.1016/J.CMRP.2017.11.004>
- Khosravi AD, Vatani S, Feizabadi MM, Abasi Montazeri E, Jolodar A. (2014). Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis for Study of Genetic Diversity in Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated From Tuberculosis Patients. *Jundishapur J Microbiol.* 7(5): 9963. doi: 10.5812/jjm.9963. Epub 2014 May 1. PMID: 25147723; PMCID: PMC4138641.
- Kordalewska, M., & Perlin, D. S. (2019). Identification of drug resistant *Candida auris*. *Frontiers in Microbiology*, 10(AUG), 470176. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01918/BIBTEX>.

- Kurtzman CP, Mateo RQ, Kolecka A, Theelen B, Robert V, Boekhout T. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. *FEMS Yeast Res.* 2015 Sep;15(6): fov050. doi: 10.1093/femsyr/fov050. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26136514.
- Larkin, E., Hager, C., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Retuerto, M., Salem, I., Long, L., Isham, N., Kovanda, L., Borroto-Esoda, K., Wring, S., Angulo, D., & Ghannoum, M. (2017). The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.02396-16>
- Lee, W. G., Shin, J. H., Uh, Y., Kang, M. G., Kim, S. H., Park, K. H., & Jang, H. C. (2011). First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3139–3142. <https://doi.org/10.1128/JCM.00319-11>
- Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N. P., Colombo, A. L., Calvo, B., Cuomo, C. A., Desjardins, C. A., Berkow, E. L., Castanheira, M., Magobo, R. E., Jabeen, K., Asghar, R. J., Meis, J. F., Jackson, B., Chiller, T., & Litvintseva, A. P. (2017). Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clinical Infectious Diseases*, 64(2), 134–140. <https://doi.org/10.1093/CID/CIW691>
- Lockhart, S. R., Berkow, E. L., Chow, N., & Welsh, R. M. (2017). *Candida auris* for the clinical microbiology laboratory: Not your grandfather's *Candida* species. *Clinical Microbiology Newsletter*, 39(13), 99–103. <https://doi.org/10.1016/J.CLINMICNEWS.2017.06.003>

- Mahmoudi, S., Agha Kuchak Afshari, S., Aghaei Gharehbolagh, S., Mirhendi, H., & Makimura, K. (2019). Methods for identification of *Candida auris*, the yeast of global public health concern: A review. *Journal de Mycologie Medicale*, 29(2), 174–179. <https://doi.org/10.1016/J.MYCMED.2019.04.004>
- *Mecanismo de resistencia a los antifúngicos.* (2019). OPS. [file:///C:/Users/biote/Downloads/2021-cde-ram-seccion-7-infografia-2%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/biote/Downloads/2021-cde-ram-seccion-7-infografia-2%20(4).pdf)
- Nocua-Báez, L. C., Uribe-Jerez, P., Tarazona-Guaranga, L., Robles, R., Cortés, J. A., Nocua-Báez, L. C., Uribe-Jerez, P., Tarazona-Guaranga, L., Robles, R., & Cortés, J. A. (2020). Azoles de antes y ahora: una revisión. *Revista Chilena de Infectología*, 37(3), 219–230. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182020000300219>
- Oh, B. J., Shin, J. H., Kim, M. N., Sung, H., Lee, K., Joo, M. Y., Shin, M. G., Suh, S. P., & Ryang, D. W. (2011). Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudohaemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea. *Medical Mycology*, 49(1), 98–102. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.493563>
- Organización Panamericana de la Salud. (2021). *Alerta Epidemiológica Brotes de Candida auris en servicios de atención a la salud en el contexto de la pandemia de COVID-19.* [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53377/EpiUpdate6February2021\\_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53377/EpiUpdate6February2021_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Organización Panamericana de la Salud. (2019). *Mecanismos de Resistencia a los Antifúngicos.* [file:///C:/Users/biote/Downloads/2021-cde-ram-seccion-7-infografia-2%20\(6\).pdf](file:///C:/Users/biote/Downloads/2021-cde-ram-seccion-7-infografia-2%20(6).pdf)
- Pachón, J., Cisneros, A., Collado-Romacho, J., Lomas-Cabezas, F., Lozano de León-Naranjo, J., Parra-Ruiz, A., & Rivero-Román, A. (2006). Tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24(4). <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-13087298>

- Parizad EG, Parizad EG, Valizadeh A. (2016). The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. *J Clin Diagn Res*, 10(1):DE01-4. doi: 10.7860/JCDR/2016/15718.7043. Epub 2016 Jan 1. PMID: 26894068; PMCID: PMC4740595.
- Pathirana, R. U., Friedman, J., Norris, H. L., Salvatori, O., McCall, A. D., Kay, J., & Edgerton, M. (2018). Fluconazole-Resistant *Candida auris* Is Susceptible to Salivary Histatin 5 Killing and to Intrinsic Host Defenses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01872-17>
- Pemán, J., & Quindós, G. (2014). Aspectos actuales de las enfermedades invasivas por hongos filamentosos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(4), 213–218. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2014.07.003>
- Prakash, A., Sharma, C., Singh, A., Kumar Singh, P., Kumar, A., Hagen, F., Govender, N. P., Colombo, A. L., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2016). Evidence of genotypic diversity among *Candida auris* isolates by multilocus sequence typing, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and amplified fragment length polymorphism. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(3), 277.e1-277.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2015.10.022>
- Ramos, R., Caceres, D. H., Perez, M., Garcia, N., Castillo, W., Santiago, E., Borace, J., Lockhart, S. R., Berkow, E. L., Hayer, L., Espinosa-Bode, A., Moreno, J., Jackson, B. R., Moran, J., Chiller, T., De Villarreal, G., Sosa, N., & Vallabhaneni, S. (2018). Emerging multidrug-resistant *Candida duobushaemulonii* infections in Panama hospitals: Importance of laboratory surveillance and accurate identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.00371-18>
- Rhodes, J., Abdolrasouli, A., Farrer, R. A., Cuomo, C. A., Aanensen, D. M., Armstrong-James, D., Fisher, M. C., & Schelenz, S. (2018). Genomic epidemiology of the UK outbreak

of the emerging human fungal pathogen *Candida auris* article. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1), 43. [https://doi.org/10.1038/S41426-018-0045-X/SUPPL\\_FILE/TEMI\\_A\\_12039952\\_SM0001.DOCX](https://doi.org/10.1038/S41426-018-0045-X/SUPPL_FILE/TEMI_A_12039952_SM0001.DOCX)

- Rossi, A., Chavez, J., Iverson, T., Hergert, J., Oakeson, K., LaCross, N., Njoku, C., Gorzalski, A., & Gerrity, D. (2023). *Candida auris* Discovery through Community Wastewater Surveillance during Healthcare Outbreak, Nevada, USA, 2022. *Emerging Infectious Diseases*, 29(2), 422–425. <https://doi.org/10.3201/eid2902.221523>
- Ruiz-Camps, I., & Cuenca-Estrella, M. (2009). Antifúngicos para uso sistémico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(6), 353–362. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2009.04.001>
- Ruiz-Gaitán, A., & Luis Del Pozo, J. (2021). AmBisome, tres retos: infección por *Candida auris*, infección del sistema nervioso central e infección asociada a biopelículas. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.03.004>
- Ruiz-Gaitán, A., Sigona-Giangreco, I., Pérez-Royo, J. M., Garcia-Bustos, V., García-Hita, M., Valentín-Gómez, E., Almaraz, S. G., de Groot, P. W. J., & Pemán, J. (2023). Usefulness of Chromogenic Media with Fluconazole Supplementation for Presumptive Identification of *Candida auris*. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS13020231>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *ADN sequencing with chain-terminating inhibitors (ADN polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)* (Vol. 74, Issue 12). <https://www.pnas.org>
- Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2009). *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*, 53(1), 41–44. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2008.00083.X>

- Sharma, D., Paul, R. A., Rudramurthy, S. M., Kashyap, N., Bhattacharya, S., Soman, R., Shankarnarayan, S. A., Chavan, D., Singh, S., Das, P., Kaur, H., Ghosh, A. K., Prasad, R., Sanyal, K., & Chakrabarti, A. (2022). Impact of *FKS1* Genotype on Echinocandin In Vitro Susceptibility in *Candida auris* and In Vivo Response in a Murine Model of Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01652-21>
- Spivak, E. S., & Hanson, K. E. (2018). *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(2). <https://doi.org/10.1128/JCM.01588-17>
- Szekely, A., Borman, A. M., & Johnsona, E. M. (2019). *Candida auris* Isolates of the Southern Asian and South African Lineages Exhibit Different Phenotypic and Antifungal Susceptibility Profiles In Vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.02055-18>
- Tamura, T., Alshahni, M. M., & Makimura, K. (2022). Evaluation of CHROMagar™ *Candida* Plus chromogenic agar for the presumptive identification of *Candida auris*. *Microbiology and Immunology*, 66(6), 292–298. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12973>
- Theill, L., Dudiuk, C., Morales-Lopez, S., Berrio, I., Rodríguez, J. Y., Marin, A., Gamarra, S., & Garcia-Effron, G. (2018). Single-tube classical PCR for *Candida auris* and *Candida haemulonii* identification. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35(2), 110–112. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.01.003>
- Turner, S. A., & Butler, G. (2014). The *Candida* Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019778>
- Usca, T., Ricardo, I., Miranda, A., Jara, P., Gabriela, A., & Altamirano, V. (2021). *Candida auris*: diagnóstico y resistencia. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 40, 1–11. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4660368>

- Vásquez, J. A., Ramirez Castrillón, M., & Monsalve F, Z. I. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 129. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530>
- Villanueva-Lozano, H., Treviño-Rangel, R. de J., González, G. M., Ramírez-Elizondo, M. T., Lara-Medrano, R., Aleman-Bocanegra, M. C., Guajardo-Lara, C. E., Gaona-Chávez, N., Castilleja-Leal, F., Torre-Amione, G., & Martínez-Reséndez, M. F. (2021). Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 813–816. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2020.12.030>
- Vingataramin, L., & Frost, E. H. (2015). A single protocol for extraction of gADN from bacteria and yeast. *BioTechniques*, 58(3), 120–125. <https://doi.org/10.2144/000114263>
- Wang, S., Guo, H., Li, J. J., Li, W., Wang, Q., & Yu, X. (2019). Evaluation of five regions as ADN barcodes for identification of Lepista species (Tricholomataceae, Basidiomycota) from China. *PeerJ*, 7(7). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.7307>
- Welsh, R. M., Bentz, M. L., Shams, A., Houston, H., Lyons, A., Rose, L. J., & Litvintseva, A. P. (2017). Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(10), 2996–3005. [https://doi.org/10.1128/JCM.00921-17/SUPPL\\_FILE/ZJM999095654S3.PDF](https://doi.org/10.1128/JCM.00921-17/SUPPL_FILE/ZJM999095654S3.PDF)
- Zhu, Y. C., O'Brien, B., Leach, L., Clarke, A., Bates, M., Adams, E., Ostrowsky, B., Quinn, M., Dufort, E., Southwick, K., Erazo, R., Haley, V. B., Bucher, C., Chaturvedi, V., Limberger, R. J., Blog, D., Lutterloh, E., & Chaturvedi, S. (2020). Laboratory Analysis of an Outbreak of *Candida auris* in New York from 2016 to 2018: Impact and Lessons Learned. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01503-19>

Zuluaga-Rodríguez, A. (2020). *Candida auris*: estrategias y retos para prevenir un brote. *Biomédica*, 40(1), 5. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5454>

# ANEXOS

## Anexo A

### Flujo de trabajo MycoSNP-nf v 1.4

hseabolt Update sra_large.csv		41b3656 · 8 months ago	🕒 299 Commits
📁 .github	Initial commit		2 years ago
📁 .vscode	Initial commit		2 years ago
📁 assets	Update sra_large.csv		8 months ago
📁 bin	Updated pandas container for qc_report module and sheba...		9 months ago
📁 conf	Update modules.config		10 months ago
📁 docs	Update output.md		8 months ago
📁 lib	vcf file addition		2 years ago
📁 modules	Update dumpsoftwareversions.py		9 months ago
📁 subworkflows/local	Merge pull request #94 from UPHL-BioNGS/john_downrate_...		10 months ago
📁 workflows	Merge pull request #92 from cjossart/dev-quicksnp		last year
📄 .gitattributes	attribs		2 years ago
📄 .gitignore	updated scripts to work in the cloud		2 years ago
📄 .gitpod.yml	Create .gitpod.yml		2 years ago
📄 CHANGELOG.md	Update CHANGELOG.md		2 years ago
📄 CITATIONS.md	Update CITATIONS.md		hace 2 años
📄 CODE_OF_CONDUCT.md	initial commit		2 years ago
📄 CONTRIBUTING.md	Initial commit		2 years ago
📄 DISCLAIMER.md	Initial commit		2 years ago
📄 LICENSE	Initial commit		2 years ago
📄 README.md	Update README.md		8 months ago
📄 code-of-conduct.md	Initial commit		2 years ago
📄 main.nf	code cleanup and fix formatting		2 years ago
📄 modules.json	snp distance matrix addition		2 years ago
📄 nextflow.config	Update nextflow.config		9 months ago
📄 nextflow_schema.json	Update nextflow_schema.json		9 months ago
📄 open_practices.md	Initial commit		2 years ago
📄 rules_of_behavior.md	Initial commit		2 years ago

## Anexo B

### Reporte de secuenciación



Centers for Disease Control and Prevention  
Mycotic Diseases Branch Laboratory

---

**Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID),  
Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED),  
Mycotic Diseases Branch (MDB)**

#### Genomic relatedness analysis

---

#### Submission information

---

**International Submitter:**  
**Laboratorio de Bacteriología Molecular**  
Departamento de Bacteriología del InDRE  
**Country of origin:** Mexico

**Date received:**

---

**Specimens received:** 47 isolates

**Date reported:** 11/22/2023

---

**CDC Reference number:** NA

---

#### Laboratory test results

---

Test name	Result
Whole Genome Sequencing (WGS) analysis	See information below

---



### Assay Details

<b>Sequencing technology</b>	Illumina	<b>Method</b>	WGS
<b>Pipeline</b>	MycoSNP-nf v 1.4	<b>Reference</b>	GCA_016772135.1
<b>Number of test isolates</b>	47	<b>Number of comparators</b>	18

#### 1. Relatedness

WGS analysis for single nucleotide polymorphisms (SNP) determination was performed using MycoSNP-nf v 1.4 pipeline. The SNP distance ranges between test isolates (47 *C. auris* sequences from Mexico) are shown below:

Clade I:

	<b>Test isolates</b>	<b>Clinical unlinked comparators</b>
Number of isolates	2	8
SNP distance median	31 SNPs	134 SNPs
SNP distance range	na	25 – 1062

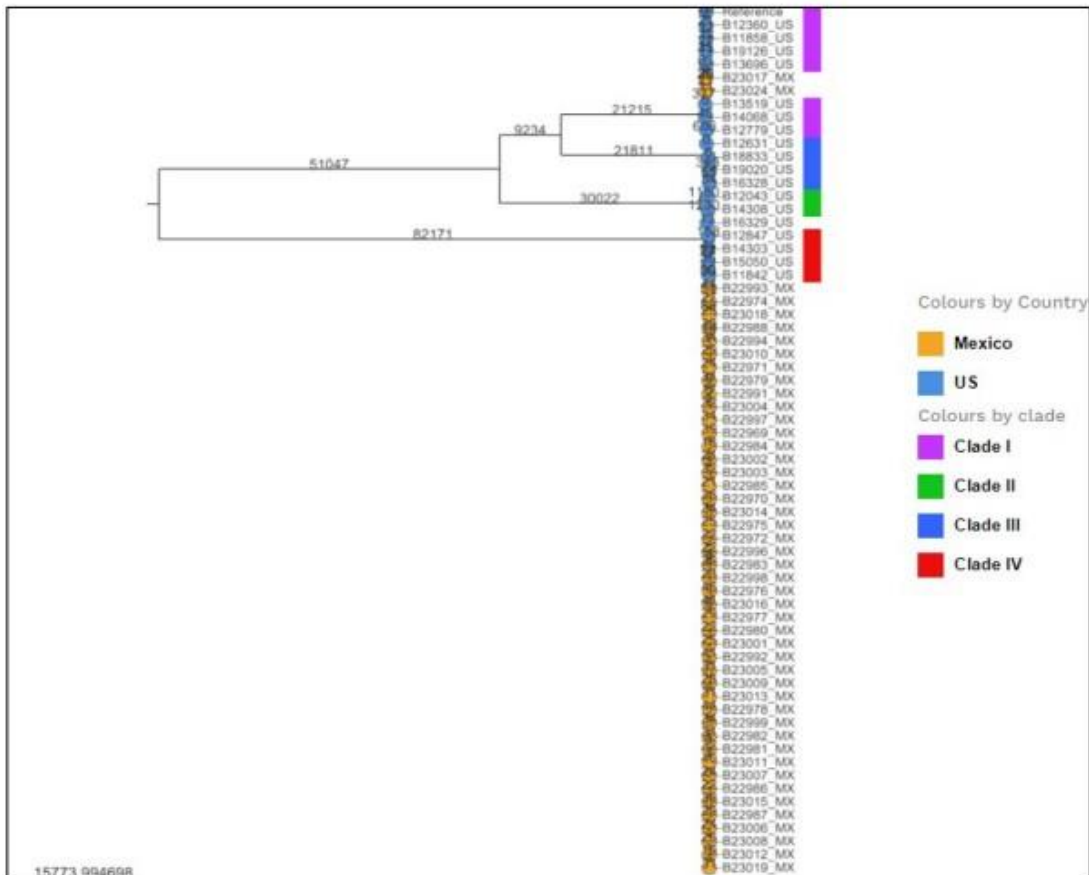
Clade IV:

	<b>Test isolates</b>	<b>Clinical unlinked comparators</b>
Number of isolates	45	5
SNP distance median	69 SNPs	276 SNPs
SNP distance range	39 – 115 SNPs	80 – 328 SNPs

**Note.** A SNP distance threshold to classify an outbreak has not been established for *C. auris*. Generally, it is best to look for SNP distance patterns between the test isolates and comparators. SNP distances should be interpreted within the context of the epidemiology.

## 2. Cluster Detection

The neighbor-joining tree (NJ) with SNP indicated on branch lengths is shown below:



**Note:** The NJ tree was built using MEGA 11 software. Leaf colors correspond to the countries of specimen origin (Mexico: yellow; United States: blue). The metadata block colors in the legend represent *C. auris* clades (I-IV).

## Conclusions

The phylogenetic analysis showed that Mexican isolates cluster in two different clades, clade I (two isolates) and clade IV (45 isolates). The two clade I isolates clustered together with a distance of 31 SNPs. The 45 clade IV isolates cluster together a SNPs distance median of 69 SNPs.



**Centers for Disease Control and Prevention  
Mycotic Diseases Branch Laboratory**

**3. Total reads, Coverage and QC report**

Sample Name	Reads Before Trimming	GC Before Trimming	Average Q Score Before Trimming	Coverage Before Trimming	Reads After Trimming	Paired Reads After Trimming	Unpaired Reads After Trimming	GC After Trimming	Average Q Score After Trimming	Coverage After Trimming	Reads Mapped
B22969_S14	17985614	45.5%	33.8	363.3	17977994 (99.96 %)	17970380 (99.96 %)	7614 (0.04 %)	45.4%	33.8	363.1	14363894 (92.4%)
B22970_S26	18301000	45.3%	33.7	369.6	18296008 (99.97 %)	18291022 (99.97 %)	4986 (0.03 %)	45.3%	33.7	369.5	14609721 (92.49%)
B22971_S38	16893778	45.5%	33.7	341.2	16886135 (99.95 %)	16878514 (99.95 %)	7621 (0.05 %)	45.4%	33.7	341.0	13550289 (92.48%)
B22972_S50	14112600	45.5%	33.8	285.0	14107366 (99.96 %)	14102140 (99.96 %)	5226 (0.04 %)	45.5%	33.8	284.9	11338224 (92.77%)
B22974_S62	19166394	45.4%	33.6	387.1	19158601 (99.96 %)	19150820 (99.96 %)	7781 (0.04 %)	45.4%	33.6	386.9	15353645 (92.9%)
B22975_S74	18460606	45.5%	33.8	372.8	18456066 (99.98 %)	18451534 (99.98 %)	4532 (0.02 %)	45.5%	33.8	372.7	14697501 (92.91%)
B22976_S86	18139002	45.7%	33.5	366.3	18129435 (99.95 %)	18119876 (99.95 %)	9559 (0.05 %)	45.6%	33.5	366.2	14467844 (92.54%)
B22977_S3	18494922	45.3%	34.0	373.5	18489492 (99.97 %)	18484070 (99.97 %)	5422 (0.03 %)	45.3%	34.0	373.4	14669160 (92.47%)
B22978_S15	18090696	45.6%	33.3	365.4	18078847 (99.93 %)	18067006 (99.93 %)	11841 (0.07 %)	45.6%	33.3	365.1	14529220 (92.73%)
B22979_S27	22209976	45.4%	33.9	448.6	22201797 (99.96 %)	22193628 (99.96 %)	8169 (0.04 %)	45.4%	33.9	448.4	17572629 (92.48%)
B22980_S39	21447938	45.3%	34.0	433.2	21440057 (99.96 %)	21432186 (99.96 %)	7871 (0.04 %)	45.3%	34.0	433.0	16905570 (92.69%)
B22981_S51	16793048	45.3%	33.9	339.2	16787521 (99.97 %)	16782008 (99.97 %)	5513 (0.03 %)	45.3%	33.9	339.0	13481295 (92.43%)
B22982_S63	19787300	45.3%	33.9	399.6	19778660 (99.96 %)	19770034 (99.96 %)	8626 (0.04 %)	45.3%	33.9	399.4	15634755 (92.56%)
B22983_S75	16568662	45.3%	33.9	334.6	16561615 (99.96 %)	16554584 (99.96 %)	7031 (0.04 %)	45.3%	33.9	334.5	13154410 (92.42%)



**Centers for Disease Control and Prevention  
Mycotic Diseases Branch Laboratory**

B22984_S87	11647912	45.3%	34.0	235.2	11643356 (99.96 %)	11638812 (99.96 %)	4544 (0.04 %)	45.2%	34.0	235.2	9323087 (92.52%)
B22985_S4	18409908	45.3%	33.9	371.8	18402266 (99.96 %)	18394644 (99.96 %)	7622 (0.04 %)	45.3%	33.9	371.7	14772383 (92.8%)
B22986_S16	20354494	45.2%	34.0	411.1	20347953 (99.97 %)	20341416 (99.97 %)	6537 (0.03 %)	45.2%	34.0	410.9	16075282 (92.46%)
B22987_S28	20920212	45.1%	34.0	422.5	20914094 (99.97 %)	20907992 (99.97 %)	6102 (0.03 %)	45.1%	34.0	422.4	16451810 (92.54%)
B22988_S40	17782090	45.1%	34.1	359.1	17776283 (99.97 %)	17770484 (99.97 %)	5799 (0.03 %)	45.1%	34.1	359.0	14171487 (92.66%)
B22991_S52	19540226	45.1%	33.8	394.6	19533370 (99.96 %)	19526518 (99.96 %)	6852 (0.04 %)	45.1%	33.8	394.5	15310097 (91.13%)
B22992_S64	16478004	45.2%	33.5	332.8	16471710 (99.96 %)	16465420 (99.96 %)	6290 (0.04 %)	45.2%	33.5	332.7	13210421 (91.98%)
B22993_S76	15076826	45.0%	33.9	304.5	15071259 (99.96 %)	15065704 (99.96 %)	5555 (0.04 %)	45.0%	33.9	304.4	12131883 (91.96%)
B22994_S88	16877202	45.3%	33.8	340.9	16872469 (99.97 %)	16867738 (99.97 %)	4731 (0.03 %)	45.3%	33.8	340.8	13264199 (90.97%)
B22996_S5	17161120	45.1%	33.9	346.6	17155186 (99.97 %)	17149260 (99.97 %)	5926 (0.03 %)	45.1%	33.9	346.5	13653624 (91.7%)
B22997_S17	19333706	45.3%	33.9	390.5	19324193 (99.95 %)	19314696 (99.95 %)	9497 (0.05 %)	45.2%	33.9	390.3	15398427 (91.76%)
B22998_S29	14793992	45.0%	33.6	298.8	14788325 (99.96 %)	14782658 (99.96 %)	5667 (0.04 %)	45.0%	33.6	298.7	11824234 (91.22%)
B22999_S41	15449866	45.1%	33.3	312.0	15445709 (99.97 %)	15441552 (99.97 %)	4157 (0.03 %)	45.1%	33.3	311.9	12225257 (91.46%)
B23001_S53	12469296	45.1%	33.4	251.8	12465216 (99.97 %)	12461138 (99.97 %)	4078 (0.03 %)	45.1%	33.4	251.7	10069103 (91.49%)
B23002_S65	13848988	45.1%	33.6	279.7	13845239 (99.97 %)	13841494 (99.97 %)	3745 (0.03 %)	45.1%	33.6	279.6	11082414 (91.07%)
B23003_S77	18279136	45.0%	33.9	369.2	18272410 (99.96 %)	18265700 (99.96 %)	6710 (0.04 %)	44.9%	33.9	369.0	14322759 (91.2%)
B23004_S89	15618510	45.2%	33.6	315.4	15610500 (99.95 %)	15602502 (99.95 %)	7998 (0.05 %)	45.2%	33.6	315.3	12560018 (91.49%)
B23005_S6	22319932	44.8%	33.9	450.8	22311436 (99.96 %)	22302950 (99.96 %)	8486 (0.04 %)	44.8%	33.9	450.6	17079430 (90.42%)



**Centers for Disease Control and Prevention  
Mycotic Diseases Branch Laboratory**

B23006_S18	13631218	45.5%	33.0	275.3	13626213 (99.96 %)	13621216 (99.96 %)	4997 (0.04 %)	45.5%	33.0	275.2	10966566 (91.44%)
B23007_S30	12111790	45.5%	33.2	244.6	12108381 (99.97 %)	12104974 (99.97 %)	3407 (0.03 %)	45.5%	33.2	244.6	9542550 (91%)
B23008_S42	16057220	45.0%	33.9	324.3	16052147 (99.97 %)	16047082 (99.97 %)	5065 (0.03 %)	45.0%	33.9	324.2	12759795 (91.64%)
B23009_S54	17381294	45.1%	33.9	351.0	17375807 (99.97 %)	17370334 (99.97 %)	5473 (0.03 %)	45.1%	34.0	350.9	13666581 (91.39%)
B23010_S66	17776138	44.8%	33.6	359.0	17771053 (99.97 %)	17765980 (99.97 %)	5073 (0.03 %)	44.8%	33.6	358.9	14103301 (91.28%)
B23011_S78	22608622	45.0%	33.6	456.6	22601084 (99.97 %)	22593554 (99.97 %)	7530 (0.03 %)	45.0%	33.6	456.4	17721825 (91.27%)
B23012_S90	16866060	45.2%	33.4	340.6	16857442 (99.95 %)	16848842 (99.95 %)	8600 (0.05 %)	45.2%	33.4	340.5	13422883 (91.2%)
B23013_S7	22866050	45.2%	33.8	461.8	22858703 (99.97 %)	22851368 (99.97 %)	7335 (0.03 %)	45.2%	33.8	461.7	17827423 (91.61%)
B23014_S19	16370140	45.1%	33.9	330.6	16361694 (99.95 %)	16353266 (99.95 %)	8428 (0.05 %)	45.1%	33.9	330.4	12921824 (91.5%)
B23015_S31	19464244	45.1%	33.6	393.1	19456846 (99.96 %)	19449464 (99.96 %)	7382 (0.04 %)	45.1%	33.6	393.0	15330055 (91.37%)
B23016_S43	18263160	45.1%	33.6	368.8	18255971 (99.96 %)	18248788 (99.96 %)	7183 (0.04 %)	45.1%	33.6	368.7	14382523 (91.19%)
B23017_S55	14998628	45.1%	33.8	302.9	14992886 (99.96 %)	14987150 (99.96 %)	5736 (0.04 %)	45.1%	33.8	302.8	11749086 (90.52%)
B23018_S67	16721272	45.0%	33.8	337.7	16715136 (99.96 %)	16709000 (99.96 %)	6136 (0.04 %)	45.0%	33.8	337.6	13101541 (90.93%)
B23019_S79	20847132	45.5%	33.8	421.0	20838024 (99.96 %)	20828928 (99.96 %)	9096 (0.04 %)	45.5%	33.8	420.9	16400909 (91.22%)
B23024_S91	31246358	44.8%	34.3	631.0	31239885 (99.98 %)	31233424 (99.98 %)	6461 (0.02 %)	44.8%	34.3	630.9	23650002 (90.51%)