



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS  
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

***Candida auris*, una especie de levadura oportunista,  
multirresistente en centros hospitalarios**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA) CON OPCIÓN EN:  
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

**QFB. JOEL LARA OCOTITLA**

ASESORAS DE TESIS:

**M. C. ALEJANDRA PAULA ESPINOSA TESIS  
D. C. MARIA DEL RAYO SANTELLAN OLEA**

PUEBLA, PUE.

NOVIEMBRE, 2024

Puebla, Pue. a 13 de noviembre 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 del alumno **Joel Lara Ocotitla**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“*Candida auris*, una especie de levadura oportunista, multiresistente en centros hospitalarios”**

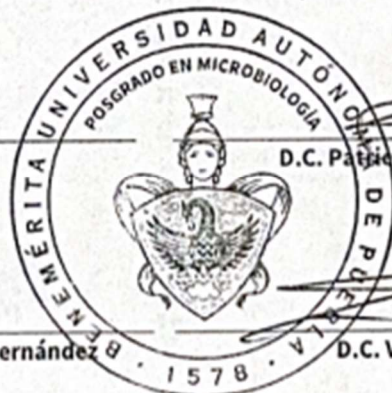
A nuestro juicio, el alumno **Joel Lara Ocotitla** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

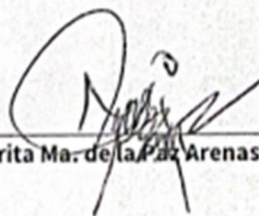
Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”



D.C. Lucía Soto Urzúa



D.C. Patricia Georgina Sánchez Alonso



D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández



D.C. Vianey Marín Cevada

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por ser mi alma mater y brindarme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente.

Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM)** y al **Instituto de Ciencias (ICUAP)**, por aceptarme en el programa y brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al **Laboratorio de Micología** por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Gracias al **Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización del programa de maestría con número de becario 821671.

Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Mi sincero agradecimiento a mis directoras de tesis a la **M.C. Alejandra Paula Espinosa Taxis** y la **D.C. María Del Rayo Santellan Olea**, por la confianza que depositaron en mí para la realización de este proyecto de tesis, sus consejos, asesorías, enseñanza, paciencia y su valioso tiempo, muchas gracias por todo su apoyo.

A la **D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández** por compartir sus conocimientos conmigo, brindarme su apoyo y sus consejos y ser parte fundamental en mi formación de estudios de maestría.

A la **D.C. Lucía Soto Urzúa** por sus observaciones y su disposición para guiar esta tesis y por ser parte de mi formación académica.

A la **D.C. Patricia Georgina Sánchez Alonso**, gracias por sus sugerencias y consejos brindados para la culminación de esta tesis.

A la **D.C. Vianey Marín Cevada** por ser parte de mi formación académica y por sus consejos y sugerencias para la culminación de esta tesis.

Agradezco al **D.C. Cristian Dionisio Román Méndez**, por su colaboración en la realización de este trabajo y por los consejos, enseñanza y tiempo brindado.

Gracias a los miembros de mi comité revisor de tesis: **D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández**, **D.C. Lucía Soto Urzúa**, **D.C. Vianey Marín Cevada** y la **D.C. Patricia Georgina Sánchez Alonso**. Muchas gracias por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por sus generosas y excelentes observaciones.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES Y DEDICATORIAS

Les agradezco a mis padres, **Maridelia y Rene** que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales, profesionales y académicos. Con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos.

A mi abuelo **Reyes Lara Mena**, mi abuela **María del Refugio Torres Corona** y abuela **Sara Muñoz Eliosa**, que, aunque ya no estén con nosotros, siempre me apoyaron, me vieron crecer y me brindaron su cariño, siendo este agradecimiento muy especial para mí. Muchas gracias hasta el cielo.

A mi abuelo **José** por apoyarme y brindarme sus consejos.

A mi familia y amigos, gracias por su compañía y apoyo en los momentos de estrés y alegría. Su contención y amistad me ayudo a mantener las ganas y el animo en los momentos difíciles. Cada uno de ustedes me ayudo a que este proceso fuera mas llevadero y significativo. Mil gracias.

Agradezco infinitamente a mis colegas y colaboradores que me ayudaron en este proyecto de tesis.

Y sobre todo agradezco a **Dios**, por ser mi guía incesante y otorgarme la sabiduría y la fortaleza en cada paso de este camino.

***“El agradecimiento es la parte principal de un hombre de bien”***

-Francisco de Quevedo y Villegas

## ÍNDICE

1) <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Infecciones por hongos .....	1
1.2. Género <i>Candida</i> .....	2
1.3. <i>Candida auris</i> .....	3
1.4. Hábitat.....	4
1.5. Epidemiología.....	5
1.6. Etiología y patogenicidad .....	7
1.7. Factores de virulencia .....	10
1.7.1. Adaptación al estrés ambiental .....	10
1.7.2. Transiciones morfológicas de <i>C. auris</i> .....	11
1.7.3. Filamentación.....	12
1.7.4. Formación de biopelículas .....	13
1.7.5. Producción de enzimas líticas.....	15
1.8. Resistencia a antifúngicos.....	15
1.8.1. Mecanismos de resistencia a los azoles .....	16
1.8.2. Mecanismo de resistencia a equinocandinas.....	17
1.8.3. Mecanismo de resistencia a polienos .....	17
1.9. Resistencia a desinfectantes y métodos de descontaminación en hospitales	18
1.10. Prevención y control de brotes hospitalarios.....	18
1.10.1. Identificación de los casos .....	19
1.10.2. Higiene de manos .....	19
1.10.3. Precauciones basadas en la transmisión.....	20
1.10.4. Limpieza.....	20
1.11. Patologías generadas por <i>Candida auris</i> .....	21
1.12. Diagnóstico .....	21
1.13. Desafíos en el diagnóstico rápido y tratamiento de infecciones por <i>C. auris</i> ..	22
2) <b>ANTECEDENTES</b> .....	24
3) <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
4) <b>OBJETIVOS</b> .....	27
4.1. Objetivo general .....	27

4.2.	Objetivos particulares.....	27
5)	<b>ESQUEMA DE TRABAJO</b> .....	28
6)	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	29
6.1.	Muestras clínicas analizadas .....	29
6.2.	Cepas control .....	29
6.3.	Condiciones éticas .....	30
6.4.	Análisis de las muestras clínicas.....	30
6.4.1.	Procesamiento de aspirado endotraqueal.....	30
6.4.2.	Procesamiento de biopsias para cultivo .....	31
6.4.3.	Procesamiento de secreción heridas e hisopados.....	32
6.4.4.	Procesamiento de lavado broncoalveolar .....	32
6.4.5.	Procesamiento de hemocultivo .....	32
6.4.6.	Procesamiento de catéter intravascular .....	33
6.4.7.	Procesamiento de líquido pleural .....	33
6.4.8.	Procesamiento de piezas metálicas “prótesis” por sonicado.....	34
6.4.9.	Procesamiento de expectoración .....	35
6.4.10.	Procesamiento de urocultivo chorro medio .....	35
6.4.11.	Procesamiento de urocultivo por sonda .....	36
6.4.12.	Procesamiento de abscesos o aspirados.....	36
6.5.	Identificación por VITEK® 2 compact.....	37
6.6.	Cultivo en CHROMagar® <i>Candida</i> Plus.....	37
6.7.	Inducción de tubos germinales en <i>C. auris</i> .....	37
6.8.	Análisis morfológico de <i>C. auris</i> en diferentes medios y temperaturas de incubación .....	37
6.9.	Formación de biopelículas en aislados de <i>C. auris</i> .....	38
6.9.1.	Método semicuantitativo en placa de poliestireno.....	38
6.9.2.	Determinación cualitativa en agar SBD suplementado con rojo Congo... 39	
6.10.	Determinación del perfil de susceptibilidad y resistencia a antifúngicos en aislados de <i>C. auris</i> .....	39
6.11.	Detección por PCR especie específica .....	40
6.11.1.	Extracción del material genético .....	40
6.11.2.	Amplificación del material genético .....	41

6.11.3. Electroforesis y visualización de los productos de PCR.....	42
<b>7) RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
7.1. Resultados de las muestras analizadas .....	43
7.1.1. Microorganismos aislados de las muestras analizadas .....	45
7.2. Resultados de las muestras analizadas con aislamientos de <i>Candida</i> spp ....	46
7.2.1. Tipo de muestras analizadas con aislamiento de <i>Candida</i> spp.....	48
7.2.2. Especies de <i>Candida</i> spp aisladas de las muestras clínicas .....	49
7.2.3. Perfil de susceptibilidad de los aislados de <i>Candida</i> spp.....	50
7.3. Caracterización fenotípica de los aislados de <i>Candida auris</i> .....	51
7.3.1. Análisis morfológico .....	51
7.3.2. Formación de tubos germinales.....	52
7.3.3. Siembra en CHROMagar® <i>Candida</i> Plus .....	53
7.3.4. Formación de pseudohifas en <i>C. auris</i> y análisis morfológico en distintas condiciones de cultivo .....	54
7.4. Formación de biopelículas .....	58
7.5. Determinación del perfil de susceptibilidad a antifúngicos .....	60
7.6. Detección por PCR.....	61
<b>8) DISCUSIÓN</b> .....	<b>64</b>
<b>9) CONCLUSIONES</b> .....	<b>74</b>
<b>10) PERSPECTIVAS</b> .....	<b>75</b>
<b>11) BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>76</b>
<b>12) ANEXOS</b> .....	<b>90</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Clasificación taxonómica del género <i>Candida</i> spp.	<b>2</b>
<b>2</b>	Cepas empleadas como control positivo y negativo.	<b>29</b>
<b>3</b>	Medios utilizados y temperaturas de incubación empleadas para el análisis morfológico.	<b>38</b>
<b>4</b>	Antifúngicos utilizados, se incluyen tres grupos (azoles, equinocandinas y polienos).	<b>40</b>
<b>5</b>	Componentes de la PCR.	<b>41</b>
<b>6</b>	Oligonucleótidos para la reacción de PCR especie específica.	<b>42</b>
<b>7</b>	Protocolo de trabajo para la reacción de PCR.	<b>42</b>
<b>8</b>	Densidades ópticas obtenidas en la determinación de biopelículas por el método semicuantitativo para cepas de <i>C. auris</i> .	<b>58</b>
<b>9</b>	Capacidad de formación de biopelículas de tres cepas de <i>C. auris</i> por el método semicuantitativo.	<b>59</b>
<b>10</b>	Perfil de susceptibilidad a antifúngicos en las cepas de <i>C. auris</i> por el método de Kirby-Bauer.	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Clados de <i>C. auris</i> (Du <i>et al.</i> , 2020).	<b>4</b>
<b>2</b>	Distribución mundial de <i>C. auris</i> .	<b>6</b>
<b>3</b>	Patogénesis de la candidiasis invasiva (Pappas <i>et al.</i> , 2018)	<b>8</b>
<b>4</b>	Morfología colonial de <i>C. auris</i> , forma levaduriforme y filamentosa (imagen adaptada de Yue <i>et al.</i> , 2018).	<b>12</b>
<b>5</b>	Porcentaje de las muestras clínicas analizadas por sexo de los pacientes.	<b>43</b>
<b>6</b>	Distribución porcentual de las muestras clínicas por servicio hospitalario.	<b>43</b>
<b>7</b>	Número de muestras clínicas por rango de edad de la población de estudio.	<b>44</b>
<b>8</b>	Frecuencia en porcentaje del tipo de muestras analizadas.	<b>45</b>
<b>9</b>	Frecuencia de microorganismos aislados a partir de las muestras clínicas.	<b>46</b>
<b>10</b>	Porcentaje de muestras positivas a <i>Candida</i> spp. por sexo de los pacientes.	<b>47</b>
<b>11</b>	Número de muestras positivas a <i>Candida</i> spp. respecto a las edades de los pacientes.	<b>47</b>
<b>12</b>	Porcentaje de los tipos de muestras con aislamiento de <i>Candida</i> spp.	<b>48</b>
<b>13</b>	Porcentaje de especies de <i>Candida</i> spp. aisladas en las muestras clínicas.	<b>49</b>
<b>14</b>	Perfil de susceptibilidad a antifúngicos de 41 cepas de <i>Candida</i> spp.	<b>50</b>
<b>15</b>	Tinción de Gram y morfología colonial de los aislados de <i>C. auris</i> .	<b>52</b>
<b>16</b>	Determinación de tubo germinal.	<b>53</b>
<b>17</b>	Fenotipo de colonias de <i>C. auris</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i> en CHROMagar <i>Candida</i> y <i>Candida auris</i> en CHROMagar <i>Candida</i> Plus.	<b>54</b>

<b>18</b>	Análisis morfológico de <i>Candida auris</i> y <i>Candida albicans</i> utilizando diferentes medios de cultivo a una temperatura de 25°C.	<b>55</b>
<b>19</b>	Análisis morfológico de <i>Candida auris</i> y <i>Candida albicans</i> utilizando diferentes medios de cultivo a 37°C.	<b>56</b>
<b>20</b>	Análisis morfológico de <i>Candida auris</i> y <i>Candida albicans</i> utilizando diferentes medios de cultivo a 42°C.	<b>57</b>
<b>21</b>	Cultivo de <i>C. auris</i> y <i>C. albicans</i> en medio YPD suplementado con 10% NaCl a 42°C.	<b>57</b>
<b>22</b>	Formación de pseudohifas básicas de <i>C. auris</i> .	<b>58</b>
<b>23</b>	Formación de biopelículas en <i>C. auris</i> y ATCC de <i>C. albicans</i> .	<b>59</b>
<b>24</b>	Prueba cualitativa para la determinación de biopelículas.	<b>59</b>
<b>25</b>	Susceptibilidad a antifúngicos en <i>C. auris</i> .	<b>60</b>
<b>26</b>	Promedio de los halos de inhibición en los aislamientos de <i>C. auris</i> .	<b>61</b>
<b>27</b>	Confirmación molecular de <i>C. auris</i> .	<b>62</b>
<b>28</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1.7%.	<b>63</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMB	Anfotericina
ARN	Ácido ribonucleico
ASC	Agar sangre de carnero
ATP	Adenosín trifosfato
CAS	Caspofungina
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
EUCAST	Comité Europeo de Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana
FLU	Fluconazol
Hsp	Proteína de choque térmico
IR	Resistencia intrínseca
ITC	Itraconazol
ITS	Región espaciadora transcrita interna
KOH	Hidróxido de potasio
Mb	Megabase
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MPM	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetro
pb	Par de base
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPBI	Residuos peligrosos biológico-infecciosos
RPM	Revoluciones por minuto

SDA	Agar dextrosa Sabouraud
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UV	Ultravioleta
YPD	Dextrosa Peptona Extracto de levadura
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro

## RESUMEN

Los hongos son un grupo de microorganismos eucariotas, se pueden clasificar en hongos levaduriformes y hongos filamentosos, aunque algunos se comportan como ambos bajo ciertas condiciones. En pacientes inmunocompetentes las infecciones fúngicas se presentan en la mayoría de los casos en piel y mucosas, sin embargo, en pacientes con factores de riesgo predisponentes se asocian con mayor frecuencia a infecciones sistémicas, altamente relacionadas con los cuidados sanitarios en los centros hospitalarios o por la ruptura de las barreras físicas de defensa como la piel y mucosas. Estas infecciones generalmente son causadas por levaduras del género *Candida* spp. En el ser humano su comportamiento como patógeno especialmente es de carácter oportunista.

Recientemente se ha reportado una especie emergente de levadura denominada *Candida auris*, causante de infecciones severas con un alto grado de letalidad, tratándose de una levadura multi-drogo-resistente que ha provocado una alerta a nivel mundial.

El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar mediante distintas pruebas fenotípicas y moleculares a aislados de *C. auris* a partir de muestras clínicas.

Se analizaron un total de 112 muestras obtenidas a partir de distintos sitios anatómicos provenientes de pacientes de 9 centros hospitalarios privados en la ciudad de Puebla durante enero de 2023 a mayo de 2024, con la finalidad de aislar cepas de *Candida* spp. Cada uno de los aislamientos de *Candida* fue identificado previamente mediante el sistema semiautomatizado Vitek2 y se seleccionaron los aislamientos que no pudieron ser identificados por este método por considerarlos como casos presuntivos para *C. auris*.

Se realizó la caracterización fenotípica de cepas de *C. auris*, mediante ensayos como la morfología microscópica y colonial que presenta en distintos medios de cultivo, inducción de tubo germinal, crecimiento en CHROMagar *Candida* Plus, formación de pseudohifas y la determinación de la formación de biopelículas. También se realizó el perfil de resistencia para valorar *in vitro* la susceptibilidad que presentan a distintos antifúngicos.

Finalmente se realizó la detección molecular mediante PCR de las cepas de *C. auris* y de los aislamientos de *Candida* spp.

Esto permitió tener una mejor comprensión sobre el comportamiento de esta nueva especie y aportar información que puede ser empleada para el desarrollo de medidas adecuadas ante un caso sospechoso de *C. auris* y así poder prevenir su propagación.

## 1) INTRODUCCIÓN

### 1.1. Infecciones por hongos

Los hongos son un grupo de microorganismos eucariotas, se pueden clasificar en levaduras y hongos filamentosos, aunque algunos de ellos se comportan como ambos en diferentes condiciones. En hospederos inmunocompetentes las infecciones fúngicas se presentan en la mayoría de los casos en piel y mucosas, sin embargo, en pacientes con factores predisponentes se asocian con mayor frecuencia a infecciones profundas y sistémicas, las cuales se relacionan con los cuidados sanitarios en los centros hospitalario y por la ruptura de las barreras físicas de defensa como la piel y las mucosas. Estas infecciones generalmente son causadas por hongos del género *Candida*. Además, algunos otros hongos como *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides* y *Blastomyces* pueden producir infecciones sistémicas posterior a su inhalación.

Las levaduras son microorganismos que pueden vivir en diferentes hábitats y emplean diferentes fuentes de energía, siendo la más importante los carbohidratos. En el humano su comportamiento patógeno especialmente es de carácter oportunista (Bonifaz, 2020). Dentro de los hongos levaduriformes que causan daño al humano se encuentra el género *Candida* spp. siendo el agente etiológico más importante y relevante desde el punto de vista clínico, ya que es el agente causal de la candidiasis, micosis oportunistas, aguda, subaguda o crónica. Estas infecciones tienen una alta frecuencia en México y a nivel mundial; infectan a personas de cualquier edad, raza o sexo. Los factores predisponentes del huésped y los factores de virulencia del microorganismo favorecen el desarrollo de la infección (Mendoza & Mireya, 2005; Cazarez-Núñez *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha observado un incremento considerable en el número de casos de candidiasis, siendo actualmente *Candida albicans* el principal agente causal, aislándose de entre un 60-70% de los cultivos de muestras clínicas.

Recientemente se ha reportado una especie emergente de levadura denominada *Candida auris*, esta especie genera infecciones severas con un alto grado de letalidad, tratándose de una levadura multi-drogo-resistente, la cual ha provocado una alerta a nivel mundial (Bonifaz, 2020).

## 1.2. Género *Candida*

El género *Candida* comprende cerca de 200 especies, alrededor de 50 son levaduras de importancia clínica y 8 son las más frecuentes (Bonifaz, 2020) (Tabla 1). *Candida albicans* históricamente se consideró la especie más virulenta del género y sigue siendo el agente más común de causar candidiasis (Spivak & Hanson, 2028). También encontramos aquellas especies de *Candida* no-*albicans* cuya principal característica es la resistencia intrínseca a ciertos antifúngicos como *Candida krusei* y *Candida lusitaniae*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Candida* spp.

<b>Clase</b>	<i>Ascomycetes</i>
<b>Subclase</b>	<i>Hemiascomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Familia</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Pichia</i> , <i>Hansenula</i> y <i>Arxiozyma</i> (estados telemorfos)
<b>Especies</b>	Estado anamorfo se le denomina <i>Candida</i> siendo las especies más comunes: <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida dubliniensis</i> y <i>Candida auris</i> .

Las especies patógenas del género *Candida* presentan hifas, pseudohifas largas, ramificadas y blastoconidias a excepción de *C. glabrata* (Bonifaz, 2020).

Las levaduras son generalmente unicelulares, sin embargo, pueden presentar pluricelularidad cuando la levadura forma estructuras como el pseudomicelio, tienen forma globosa, ovoide, cilíndrica, cuadrada o triangular, su tamaño oscila entre 3 µm a 6 µm. La mayoría son mesófilas, con una temperatura de crecimiento de 20°C a 48°C y una temperatura óptima de 30°C a 37°C.

La mayoría de las especies de *Candida* forman colonias cremosas, limitadas, planas, opacas, lisa brillante llegando a ser rugosas de color blanco o blanco-amarillo o en color rosa pálido.

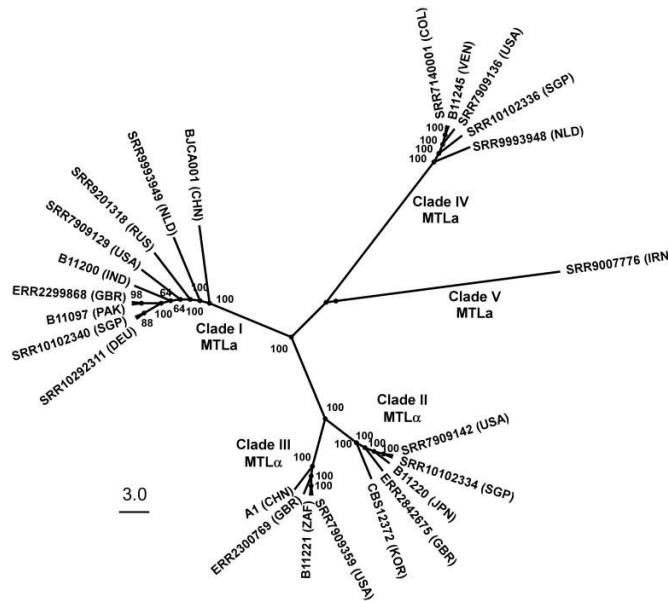
En 2009 en el este de Asia, se identificó una nueva especie de *Candida* con resistencia al fluconazol, llamada *Candida auris*. Actualmente ha sido aislada en los cinco continentes (Spivak & Hanson, 2018).

### **1.3. *Candida auris***

*Candida auris* es una especie de levadura patógena oportunista perteneciente al género *Candida*. Se nombro así debido a que fue aislada por primera vez del canal auditivo de un paciente en Japón (Sikora *et al.*, 2023). Presenta resistencia a múltiples fármacos antifúngicos, factores ambientales y una alta capacidad de propagación especialmente en entornos hospitalarios (Bonifaz, 2020). Análisis de su ADN genómico demostró que esta especie está relacionada filogenéticamente con *Candida ruelliae*, *Candida haemulonii*, *Candida duobushaemulonii* y *C. pseudohaemulonii* (Sato *et al.*, 2009).

*C. auris* posee diversos mecanismos de virulencia los cuales están codificados en su genoma, como la expresión de fosfolipasas, proteinasas, actividades hemolíticas, adherencia, formación de biopelículas, resistencia antifúngicos y al estrés ambiental, siendo estos los más relevantes en la especie. Sin embargo, el conocimiento sobre la virulencia de *C. auris* sigue siendo escaso y se requieren más estudios para comprender su comportamiento patogénico (Hernando *et al.*, 2021).

Existen 4 clados genéticos de *C. auris*, reportados de acuerdo con la información genómica y distintas regiones de los primeros aislamientos, Clado I del sur de Asia, Clado II de Asia oriente, Clado III de Sudáfrica y Clado IV de América del Sur (Du *et al.*, 2020). Estos 4 clados están separados por decenas de miles de polimorfismo de nucleótido único o SNP, pero dentro de cada uno de los clados, los datos de secuenciación determinaron que hay muy pocos SNP, menos de 70 SNP, lo que sugiere que podrían ser casi clonales (Lockhart *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2020). También se ha descrito recientemente un nuevo clado V correspondiente a Irán el cual está separado de los otros cuatro clados por más de 200,000 SNP (Chow *et al.*, 2018) (Figura 1).



**Figura 1. 5 Clados de *C. auris* (Du et al., 2020).** Árbol filogenético de *C. auris* generado con el programa RAxML v7.3.2 utilizando polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). También se incluyen los loci de apareamiento MTL $\alpha$  para cada clado. CHN, China; COL, Colombia; DEU, Alemania; GBR, Reino Unido; IND, India; IRN, Irán; JPN, Japón; KOR, Corea del Sur; NLD, Países Bajos; PAK, Pakistán; RUS, Rusia; SGP, Singapur; USA, Estados Unidos de América; VEN, Venezuela; ZAF, Sudáfrica, describen el país donde se aisló por primera vez la cepa.

*Candida auris* posee un genoma de ~12.5Mb con un contenido de G-C de aproximadamente del 44.5 a 44.8%, con 8358 genes putativos. (Spivak & Hanson, 2018; Jeffery-Smith et al., 2017).

#### 1.4. Hábitat

Hasta hace poco se desconocía el origen de *C. auris* como un hongo ambiental ya que no se sabía si contaba con un nicho ecológico (Escandón, 2022). Varios autores plantearon distintas hipótesis sobre el origen de esta nueva especie, incluyendo el calentamiento global, los cambios ambientales y el uso indiscriminado de antifúngicos que generó un fenómeno de presión selectiva en este hongo para evolucionar y generar resistencia térmica y osmótica. Se ha descrito que la adaptación térmica es una característica que ha permitido a las aves transportar a este hongo hacia zonas rurales donde las aves y el humano están en contacto frecuente. En cuanto a los aislamientos de *C. auris* en ambientes marinos, sobre todo en zonas saladas, se postuló una hipótesis

que planea que antes de su reconocimiento como patógeno para el humano, *Candida auris* existía como un hongo ambiental. Estas hipótesis son respaldadas por el hecho de que *C. auris* no crece en condiciones anaerobias y generalmente se aísla de regiones húmedas de la piel, pero no de intestino (Casadevall *et al.*, 2019).

*Candida auris* se propaga fácilmente en ambientes intrahospitalarios, se adhiere a superficies abióticas y dispositivos médicos, además puede resistir la descontaminación con compuestos de amonio cuaternario.

Coloniza de forma asintomática la piel y otras regiones del cuerpo durante tiempos prolongados, favoreciendo la transmisión rápida entre los pacientes y personal sanitario de hospitales. Puede atravesar la dermis sin provocar signos histopatológicos de inflamación, lo que favorece su diseminación a tejidos cutáneos más profundos, esto podría explicar la reaparición repentina de *C. auris* en pacientes que tuvieron cultivos negativos por hisopados, debido a que este método de toma de muestras no es funcional para la detección de microorganismos fúngicos que se encuentran en las capas más profundas de la piel (Zhai & Rolling, 2021). La colonización por *C. auris* da como resultado infecciones invasivas severas en aproximadamente el 10% de los individuos colonizados.

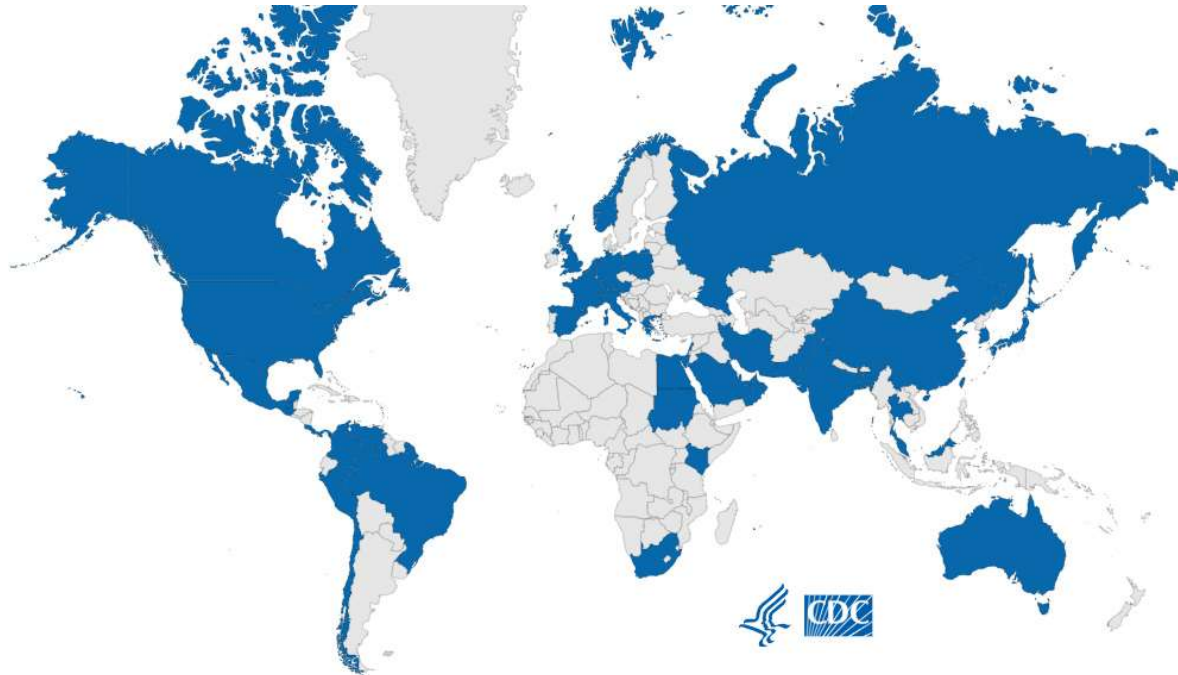
### **1.5. Epidemiología**

*C. auris* fue aislada por primera vez en Japón en el año 2006 de una cepa procedente del canal auditivo externo de un paciente hospitalizado en un hospital geriátrico de Tokio, sin embargo, no se identificó como *C. auris* hasta el año 2009 mediante el estudio de secuenciación del dominio D1/D2 del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante (ADNr) 26S y la región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADNr y estudios bioquímicos los cuales indicaron la identificación de una nueva especie de *Candida*. Posteriormente en el mismo año se identificaron otros 15 pacientes con otitis media crónica en Corea del Sur. En 2011 fueron informados los primeros 3 casos de infección del torrente sanguíneo causada por *Candida auris* en Corea del Sur.

Un análisis retrospectivo de los aislamientos de *Candida* en Corea del Sur demostró que la cepa más antigua de *C. auris* se remonta a 1996 y se aisló a partir de una infección del torrente sanguíneo en un niño. La mayoría de los aislamientos en Corea del Sur

mostraron CMI elevadas de fluconazol, lo que estableció su resistencia a este antifúngico (Spivak & Hanson, 2021).

Tras una década de su primer aislamiento como nuevo patógeno del torrente sanguíneo, se han recuperado de más de 4000 aislamientos en sangre y otras muestras en varios países de todos los continentes. Hasta el 2021, 47 países han notificado casos de infecciones por *C. auris*, según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América. Estos informes provienen de varios países, incluidos India, Sudáfrica, Kuwait, Malasia, Reino Unido, Pakistán, Kenia, Noruega, Alemania, Omán, España, Israel, Venezuela, Colombia, Panamá, Brasil, Estados Unidos y Canadá (Zhai & Hohl, 2021) (Figura 2).



**Figura 2. Distribución mundial de *C. auris*.** (Fuente Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades CDC), en color azul aquellos países que han notificado reportes de aislamientos de *C. auris*.

Las infecciones invasivas por *C. auris* han experimentado cambios drásticos, ya que este tipo de infecciones esporádicas reportadas en los primeros años han sido reemplazadas por brotes nosocomiales que son informados con mayor frecuencia y parecen involucrar a un mayor número de pacientes. Algunos estudios han demostrado que una vez que esta levadura se introduce en los centros hospitalarios, se puede propagar muy

fácilmente entre los pacientes vulnerables. Esta nueva especie se ha convertido rápidamente en un importante patógeno en infecciones del torrente sanguíneo incluso superando a *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Ahmad & Alfouzan, 2021).

El primer caso de *C. auris* en América se reportó en Venezuela en marzo de 2012 y desde entonces cada vez más países se han sumado a esta lista incluyendo a México.

Desde la pandemia por SARS-CoV-2 los distintos sistemas de salud presentaron un desafío sobrecargándose de pacientes sobre todo en las unidades de cuidados intensivos. En el segundo semestre de 2020, 7 países notificaron casos de infección por *C. auris*, la mayor parte en pacientes con antecedentes de COVID-19 siendo estos: Brasil, Guatemala, México, Perú, Panamá, Colombia y Estados Unidos de América.

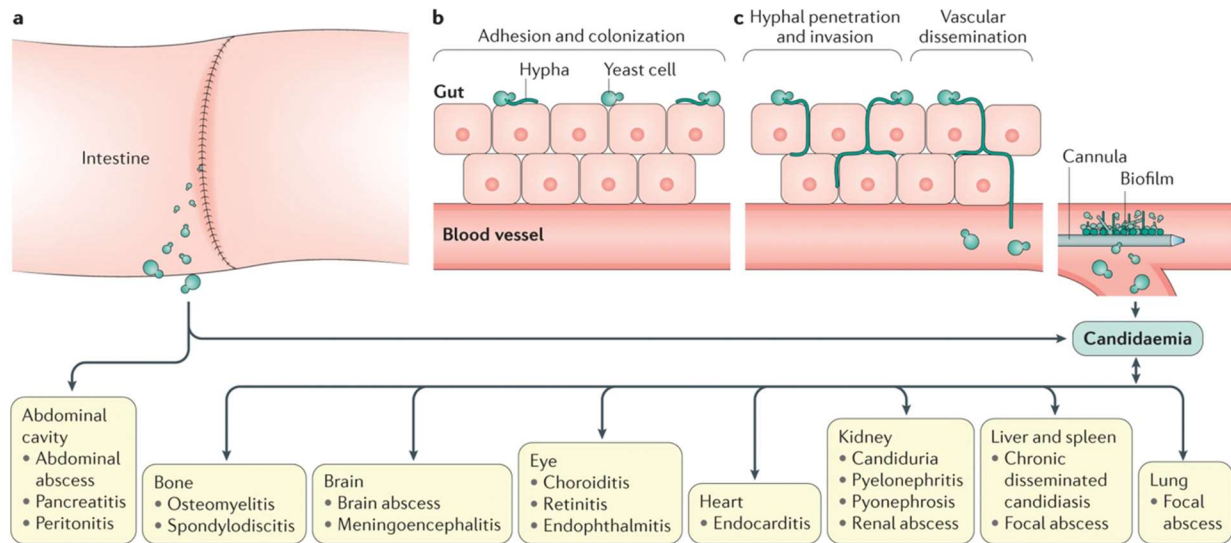
Ante esta situación, la Organización Panamericana de la Salud emite una alerta epidemiología en febrero de 2021, notificando brotes de *Candida auris* en servicios de atención a la salud en el contexto de la pandemia por COVID-19 (OPS, 2021).

En México *C. auris* se reportó por primera vez, en mayo de 2020 en una mujer con endometriosis severa, tres meses después, el mismo hospital notifico un brote de *C. auris* asociado con una alta mortalidad en pacientes con diagnóstico de COVID-19 grave. La pandemia por COVID-19 dio como resultado un mayor número de pacientes con mayor riesgo de candidiasis invasiva (Ayala *et al.*, 2021).

Actualmente la prevalencia de infecciones causadas por *Candida auris* continúa siendo desconocida y puede que no se reporten los casos adecuadamente debido a la falta de métodos diagnósticos precisos y a la identificación errónea confundiéndola con otras especies de *Candida* relacionadas fenotípicamente (Sikora *et al.*, 2023).

### **1.6. Etiología y patogenicidad**

La candidiasis es un término que se refiere a infecciones causadas por el género *Candida* asociadas a diversos sitios anatómicos como: piel, mucosas y órganos profundos, estas infecciones ocurren en cualquier rango de edad y usualmente en el contexto de factores de riesgo. La candidiasis invasiva se refiere a las infecciones del torrente sanguíneo (candidemia), e infecciones profundas como: abscesos intraabdominales, peritonitis y osteomielitis (Pappas *et al.*, 2018).



**Figura 3. Patogénesis de la candidiasis invasiva (Pappas et al., 2018)** a) Cuando existe ruptura de la barrera intestinal, *Candida* spp. puede diseminarse a la cavidad abdominal e invadir el torrente sanguíneo. b) *Candida* spp puede coexistir en el hospedero humano como un microorganismo comensal sin causar daño. c) Un estado de deterioro de la respuesta inmune u otros factores, pueden promover el desarrollo del hongo en el intestino y generar candidiasis, pudiendo conducir a infecciones profundas en diversos órganos.

La colonización se considera un requisito previo para la infección, debido a que *Candida* se considera una levadura comensal que forma parte de la microbiota normal en la piel y el intestino humano, y esta es detectable hasta en el 60% de individuos sanos; por lo tanto; la enfermedad invasiva suele ser consecuencia de un aumento en la colonización junto con factores predisponentes del hospedero.

Cuando se generan perturbaciones a la microbiota de la mucosa o hay un factor predisponente generando el debilitamiento de la inmunidad del huésped, *Candida* efectúa un proceso de transición del comensalismo al oportunismo, asociado a la inducción de factores clave de virulencia (Kullberg & Arendrup, 2015).

Existen tres condiciones principales que predisponen a la infección invasiva en humanos. El primero es el uso durante tiempo prolongado de antibióticos de amplio espectro, los antibióticos confieren a *Candida* spp una ventaja, ya que algunas bacterias de microbiota intestinal son importantes para inducir la liberación de factores protectores de la mucosa como el factor de transcripción, factor inducible por hipoxia (HIF)-1 $\alpha$  y el péptido LL-37-CRAMP. El HIF-1 $\alpha$  es un regulador esencial de la defensa innata en mamíferos, aumenta

la expresión de péptidos antimicrobianos de catelicidina en las células mieloides, estos péptidos antimicrobianos relacionados con la catelicidina pertenecen a una familia de polipéptidos que tienen la función de defensa inmune innata en los mamíferos contra las infecciones bacterianas, pero, también se ha demostrado que la catelicidina humana LL-37 tiene actividad anti-*Candida* e inhibe la adhesión de *Candida* spp. a las superficies de las células epiteliales. Por lo tanto, el agotamiento de estas bacterias por antibióticos elimina estos factores protectores y permite que *Candida* spp actúe como oportunista (Pappas *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2015).

El segundo factor predisponente es la ruptura de las barreras gastrointestinales o cutáneas causadas por una mucositis inducida por una quimioterapia citotóxica, cirugías o perforación gastrointestinal y/o el uso de catéteres venosos centrales, que permiten que *Candida* spp se pueda translocar desde sitios mucocutáneos al torrente sanguíneo (Figura 3).

El último factor es la inmunosupresión iatrogénica, tal es el caso de la neutropenia inducida por quimioterapia o terapia con corticosteroides, que alteran la inmunidad en tejidos y facilita la invasión al torrente sanguíneo u otros órganos por *Candida* spp. (Pappas *et al.*, 2018).

*Candida auris* se ha asociado con una variedad de infecciones fúngicas invasivas, como la candidemia en un alto grado, pero también con pericarditis e infecciones del tracto respiratorio y del tracto urinario. En la mayor parte de los casos, este tipo de infección ocurre en pacientes en estado crítico que se ubican en unidades de cuidados invasivos o son sometidos a procedimientos invasivos (Jeffery *et al.*, 2017).

Exhibe diversas características preocupantes en comparación con otras especies de *Candida*; su característica más sorprendente es la transmisión eficaz de persona a persona, ya que, por lo general, las infecciones causadas por *Candida* surgen del propio microbioma del hospedero; sin embargo, aún no hay evidencia de que *C. auris* puede colonizar comúnmente el tracto gastrointestinal o cavidad bucal. Además, puede sobrevivir durante varias semanas en superficies nosocomiales y resistir a múltiples desinfectantes. Lo más alarmante es su capacidad para desarrollar resistencia a todas las clases principales de antifúngicos generando limitación en las opciones terapéuticas.

Este patrón de resistencia se ha observado en aproximadamente el 40% de los aislados clínicos (Vila *et al.*, 2020).

Aun no se conoce mucho sobre la biología de *C. auris*, pero los estudios *in vitro* demuestran que expresa varios factores de virulencia clave comunes en *Candida*, como producción de fosfolipasas, proteinasas, proteasas aspárticas secretadas, adhesinas y la capacidad de formar biopelículas (Vila *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Chatterjee *et al.*, analizaron el genoma de *C. auris* para poder explicar su naturaleza virulenta, encontrando que en su genoma alberga diversas familias de genes como lipasas, transportadores de oligopéptidos, manosil transferasas y factores de transcripción que intervienen en la colonización, invasión y adquisición de hierro. Determinaron que *C. auris* comparte muchos genes con *C. albicans* y *C. lusitaniae*, indicando que comparten una ascendencia común; sin embargo, *Candida auris* pudo haber adquirido rasgos genéticos que lo han preparado como un patógeno diferente. También se plantearon la idea de que el uso indiscriminado de antibióticos haya moldeado su genoma, confiriéndole cualidades en su espectro clínico y para emerger como un patógeno resistente a múltiples antifúngicos (Chatterjee *et al.*, 2015).

*C. auris* a diferencia de *C. albicans*, carece de la capacidad de formar tubos germinales, hifas y clamidosporas (Larkin *et al.*, 2017).

## **1.7. Factores de virulencia**

Al igual que otras especies de *Candida*, *C. auris* puede formar biopelículas, pseudohifas y sufrir modificaciones fenotípicas a nivel celular, siendo esto, características que pueden estar involucradas en la virulencia, resistencia a antifúngicos y supervivencia en ambientes bióticos y abióticos.

### **1.7.1. Adaptación al estrés ambiental**

La mayoría de los hongos no pueden sobrevivir a la temperatura fisiológica (36.5 a 37.5°C y con fiebre 40°C), por tanto, no son capaces de colonizar a los humanos y provocar infecciones (González *et al.*, 2022). Existe una zona de restricción térmica que protege a los mamíferos, siendo la diferencia entre la temperatura corporal basal y la temperatura ambiental. Se ha planteado que el cambio climático inducido por los humanos incrementa

varios grados la temperatura de la Tierra, reduciendo de manera considerable el gradiente entre la temperatura corporal de los mamíferos y las ambientales, siendo esto una preocupación, ya que se prevé que esto genere una selección de linajes fúngicos volviéndolos más termotolerantes a manera que puedan romper la zona de restricción térmica, provocando daño hacia los mamíferos (Casadevall *et al.*, 2019).

Considerando lo antes mencionado, se propone la hipótesis de que *Candida auris* es el primer hongo patógeno que emergió adaptativamente a partir del calentamiento global, planteando la idea de que antes de ser considerado un patógeno para el humano, este se encontraba de manera ambiental, todo esto es sustentado con el hecho de que no tiene la capacidad de crecer en condiciones anaerobias y normalmente se aísla de sitios anatómicos húmedos de la piel, pero no del intestino.

Otra característica única de esta especie comparada con otras es su capacidad para tolerar y crecer en medios con una alta concentración de NaCl inclusive mayor al 10%. Algunos investigadores han demostrado que, bajo estas condiciones de cultivo, *Candida auris* puede formar estructuras como pseudohifas y sugirieron que se trate de una transición morfológica adaptativa al estrés osmótico (Welsh *et al.*, 2017).

Estas dos características únicas pueden favorecer a la persistencia y supervivencia de *C. auris* en superficies bióticas y abióticas durante tiempos prolongados. Actualmente se ha demostrado que esta persistencia en condiciones adversas es única en *C. auris*, haciéndola diferente al resto de los patógenos fúngicos (Du *et al.*, 2020).

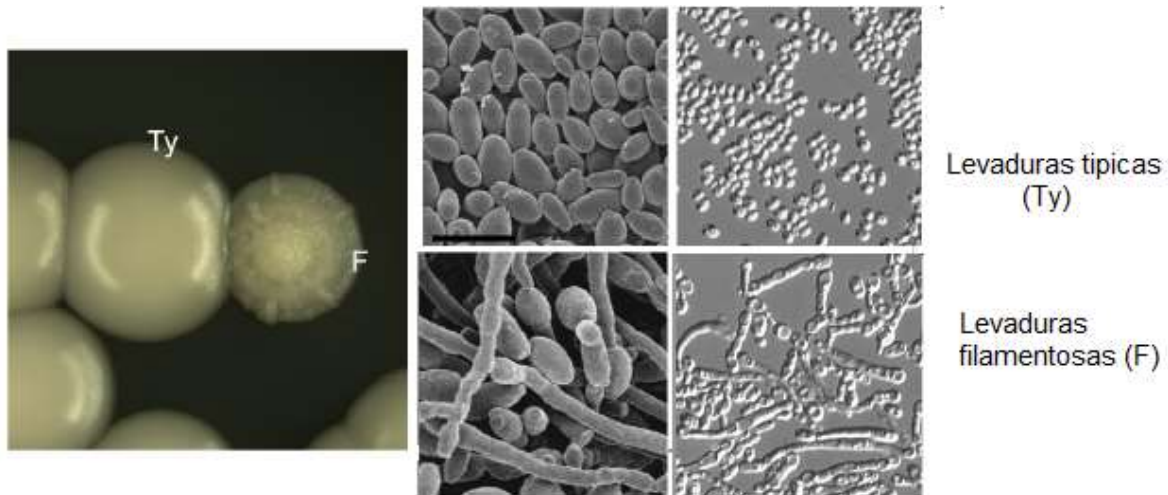
### **1.7.2. Transiciones morfológicas de *C. auris***

Una estrategia comúnmente utilizada por algunos microorganismos es la plasticidad morfológica para poder adaptarse de una forma rápida a los cambios ambientales. Distintas especies patógenas de *Candida*, experimentan cambios en su morfología celular que puede ser inducida por señales ambientales.

*C. auris* también presenta varios fenotipos morfológicos, en muchos aislamientos existe en forma de levadura unicelular, y en otros aislados puede formar grandes agregados de células similares a pseudohifas, donde la célula madre e hija permanecen unidas (González *et al.*, 2022). Algunos aislados clínicos de *C. auris* pueden formar fenotipo agregativo que difieren de las células unicelulares en forma de levadura en diversos

aspectos biológicos, incluidas la morfología colonial y celular, la capacidad de formación de biopelículas y susceptibilidad a antifúngicos. Este fenotipo agregativo puede inducirse tanto *in vivo* como *in vitro*, por ejemplo, la exposición al antifúngico caspofungina, puede provocar alteraciones morfológicas y la formación de células agregativas en *C. auris*. Forgacs *et al.* observaron la presencia de células agregadas en corazón, riñón e hígado en un modelo de ratón neutropénico, sugiriendo que también puede presentarse este fenotipo agregativo en el hospedero. Bing *et al.*, descubrieron recientemente que existen dos tipos de morfologías agregativas en *C. auris*, uno debido a un defecto en la división celular y el otro se cree que es el resultado de la sobreexpresión de genes asociados con la adhesión. Ambas morfologías difieren en su capacidad de formación de biopelículas y virulencia (Forgács *et al.*, 2020; Bing *et al.*, 2024).

Estos agregados pueden ser más tolerantes a los agentes antifúngicos en comparación con su forma unicelular; sin embargo, las células que se agregan son menos virulentas que las levaduras unicelulares (Du *et al.*, 2020; Borman *et al.*, 2016).



**Figura 4. Morfología colonial de *C. auris*, forma levaduriforme y filamentosa (imagen adaptada de Yue *et al.*, 2018).** Colonias y morfología de las células; levadura y filamentosa cultivadas en medio YPD.

### 1.7.3. Filamentación

El desarrollo de células filamentosas en especies patógenas de *Candida* es fundamental para la invasión hacia los tejidos del hospedero. Inicialmente se planteó la hipótesis que dice que *C. auris* no puede formar verdaderas hifas, solo siendo capaz de formar pseudohifas, sin embargo, recientes evidencias refieren que aislados de *C. auris* puede

formar hifas en algunas condiciones específicas como la termotolerancia y osmotolerancia las cuales son características distintivas de esta especie (Wang *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Wang *et al.* en el cual se analizó el crecimiento de *C. auris* en diversas condiciones de cultivo, demostraron que puede presentar múltiples morfologías celulares, incluidas la forma redonda, alargada o pseudohifal, cuando fue incubada a elevadas concentraciones de NaCl superiores al 10% (Wang *et al.*, 2018).

Otro estudio realizado por Kim *et al.* demostró que el deterioro de la función o inhibición farmacológica de la proteína de choque térmico (Hsp90) y la progresión del ciclo celular también conducen al desarrollo del morfotipo pseudohifal en *Candida auris*, sugiriendo que algunos mecanismos reguladores de la filamentación de *Candida albicans* se conservan en *Candida auris*, siendo la Hsp90 una chaperona molecular involucrada esencialmente en el proceso de filamentación dependiente de la temperatura en *C. albicans* (Kim *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2020).

Sin embargo, aún siguen investigando los mecanismos por los cuales se desarrolla esta morfología celular en *Candida auris*.

#### **1.7.4. Formación de biopelículas**

La formación de biopelículas en las distintas especies de *Candida* son importantes a nivel clínico debido a que se vinculan con la resistencia adaptativa a diversos antifúngicos e incrementan considerablemente la morbilidad y mortalidad. Está bien descrito que *C. albicans* es la principal especie patógena del género con capacidad de formación de biopelículas, sin embargo, actualmente existe un incremento en las especies de *Candida* no-*albicans* con esta capacidad, particularmente *C. auris*.

Todo esto es respaldado con el hecho de que *C. auris* ha sido aislada de distintos sitios, incluidas heridas y catéteres, sugiriendo que esta especie coexiste en un entorno rodeado por biopelículas en el hospedero (Kean *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Sherry *et al.* se determinó la capacidad de formación de biopelículas en cepas con fenotipo agregativo y no agregativo de *C. auris* comparándolas con *C. albicans* y *C. glabrata*. Determinaron que *C. albicans* tiene mayor producción de masa de biopelícula en concordancia con estudios anteriores, y que todas las cepas de

*C. auris* formaron biopelículas significativamente reducidas en comparación con las de *C. albicans*, obteniendo que la biomasa para las cepas con fenotipo agregativo fue menor en comparación con las biopelículas formadas por las cepas no agregativas de *C. auris*. Sin embargo, las cepas de *C. auris* formaron biopelículas mayores a las formadas por *C. glabrata*. Demostrando así que *C. auris* tiene la capacidad de adherirse diferencialmente a superficies, formar biopelículas y adquirir resistencia temporal a antifúngicos cuando esta se encuentra en esta matriz extracelular en comparación con sus contrapartes planctónicas (Sherry *et al.*, 2017).

En otro estudio realizado por Hernando-Ortiz *et al.* determinaron la capacidad de formación de biopelículas en 12 aislados clínicos de *C. auris*, concluyendo que ninguno de los 12 aislamientos produjo una biopelícula más densa en comparación con la cepa control de *C. albicans* SC5314. Esta formación de biopelículas de *C. auris* en comparación con *C. albicans* se ha reportado anteriormente. En este análisis el aislado de sangre JMRC:NRZ 1101 con fenotipo agregativo mostró una mayor producción de biomasa y actividad metabólica seguido del aislado de orina con fenotipo no agregativo CR14 en comparación con los otros aislamientos de *C. auris*. Pese a que las biopelículas formadas por *C. auris* son más delgadas que las producidas por *C. albicans*, estas se han asociado con una menor susceptibilidad a antifúngicos. La producción de biopelículas se ha reportado tanto en fenotipos agregativos como no agregativos de *C. auris* (Hernando-Ortiz *et al.*, 2021).

La matriz extracelular de las biopelículas en diversas especies de *Candida* está compuesta por un complejo polisacárido de manano y glucano, este complejo se ha relacionado con la resistencia a antifúngicos a través de un mecanismo de secuestro antifúngico. Para evaluar la composición en las biopelículas por *C. auris*, Domínguez *et al.* aislaron la matriz extracelular y analizaron el polisacárido mediante cromatografía de gases. Determinando que cada una de las biopelículas en un conjunto de 10 aislamientos de *C. auris* contenían polímeros de manano y glucano, sin embargo, el contenido de estos polímeros fue variable, al igual que la proporción de manano y glucano en los distintos aislamientos (Domínguez *et al.*, 2019).

La formación de biopelículas no solo contribuye a la virulencia de *C. auris*, sino que también favorece la supervivencia en distintos entornos a nivel hospitalario (Kean *et al.*, 2018; Sherry *et al.*, 2017).

#### **1.7.5. Producción de enzimas líticas**

La síntesis de diferentes enzimas líticas como fosfolipasas y proteinasas es reconocida como importante para el proceso de patogénesis de *Candida* hacia el hospedero humano, favoreciendo la adherencia e invasión hacia las células huésped (Rossato & Colombo, 2018).

Otro grupo importante de enzimas son las hidrolasas, siendo este el grupo más grande de proteínas encontradas en el genoma de *C. auris*, seguidas de enzimas como transferasas y oxidorreductasas. También se ha demostrado que tiene la capacidad de producir lipasas. De forma similar en estudios realizados, se demostró que la mayoría de las cepas de *C. auris* tiene actividad de hemolisina, confiriéndole una alta capacidad de captación de hierro, crecimiento e invasividad (Rossato & Colombo, 2018).

El genoma de *C. auris* alberga a 8358 genes putativos, los cuales codifican para distintas proteínas predichas e hipotéticas, sin embargo, a nivel genómico, *C. auris* muestra una relación altamente divergente respecto a otras especies patógenas de *Candida*. La mayoría de las proteínas de *C. auris* se han predicho *in silico* y no están funcionalmente caracterizadas, siendo necesarios más estudios para su comprensión (Chatterjee *et al.*, 2015).

#### **1.8. Resistencia a antifúngicos**

*C. auris* es una especie de levadura emergente resistente a múltiples antifúngicos, mostrando tasas elevadas de resistencia al fluconazol y susceptibilidad variable a otros azoles, equinocandinas y anfotericina B, generando que el tratamiento de infecciones por *C. auris*, en particular las infecciones invasivas sean extremadamente complicadas de tratar. Otra situación importante, es que actualmente no existen puntos de corte de susceptibilidad establecidos en las guías internacionales como el CLSI o EUCAST. Ante esta situación la CDC estableció puntos de corte temporales guiados en la opinión de los expertos y en los establecidos para otras especies de *Candida* relacionadas estrechamente con *C. auris* (Pharkjaksu *et al.*, 2021; Ahmad & Alfouzan, 2021).

Actualmente se han descrito distintos mecanismos moleculares de resistencia a antifúngicos en *C. auris*, esto puede ser por modificaciones genéticas que inducen la modificación del sitio diana del antifúngico, sobreexpresión de bombas de eflujo o modificación metabólica (Chaabane *et al.*, 2019).

### **1.8.1. Mecanismos de resistencia a los azoles**

#### **1.8.1.1. Bombas de eflujo**

Las bombas de eflujo son un grupo de proteínas que tienen como principal función el transporte de componentes a través de la membrana celular, algunas pueden estar involucradas con la expulsión de fármacos fuera de la célula, disminuyendo la concentración y el efecto de este. Actualmente se han descrito dos familias de bombas de eflujo involucradas en la resistencia a antifúngicos: los transportadores de casete de unión a ATP (ABC) y la superfamilia de facilitadores principales (MFS). Siendo la sobreexpresión de estas, uno de los mecanismos implicados de resistencia a los azoles en *C. auris* (Chaabane *et al.*, 2019).

#### **1.8.1.2. Mutación en el gen *ERG11***

El ergosterol, es el esteroide más abundante y componente clave en las membranas celulares de los hongos, tiene como función la regulación de la permeabilidad y fluidez de la membrana. Debido a estas funciones cruciales, el ergosterol es un objetivo principal para la mayoría de los antifúngicos del grupo de los azoles (Rodriguez, 2018).

La biosíntesis de este componente está regulada por la enzima lanosterol 14-alfa-desmetilasa, codificada por el gen *ERG11* que se encarga de la conversión de lanosterol a ergosterol, siendo el mecanismo de acción de los azoles, inhibir la función de esta enzima y detener el proceso de biosíntesis de ergosterol, causando alteraciones en la membrana (Chaabane *et al.*, 2019).

Actualmente se ha comprobado que mutaciones puntuales en el gen *ERG11* se ha asociado a la resistencia a los azoles en *C. auris*. Chowdhary *et al.*, realizaron la comparación de la secuencia de aminoácidos del gen *ERG11* en 8 aislados de *C. auris* con resistencia al fluconazol con la secuencia de *C. albicans* WT, encontrando 15 sustituciones de aminoácidos, de estas 15 sustituciones encontradas en *ERG11*, ya se

habían informado previamente que las sustituciones en las posiciones F105, K119, Y132, K143 y R267 se han asociado a la resistencia de los azoles en *C. albicans* (Chowdhary *et al.*, 2018; Chaabane *et al.*, 2019).

### **1.8.2. Mecanismo de resistencia a equinocandinas**

El  $\beta$  (1,3) D-glucano es uno de los componentes principales de la pared celular de los hongos, su biosíntesis está regulada por la enzima 1,3-beta-glucano sintasa, la cual sirve como objetivo farmacológico de algunos antifúngicos como las equinocandinas, considerados inhibidores de la enzima (Martins *et al.*, 2011).

En algunas especies de *Candida* incluida *C. albicans*, se han encontrado mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2* que se han asociado a la resistencia a equinocandinas, a estas mutaciones se los conoce como “puntos calientes” 1 y 2 (HS1 y HS2). En un estudio realizado por Chowdhary *et al.*, en el cual realizaron secuenciación de estos dos puntos calientes correspondientes a 38 cepas de *C. auris*, encontraron la mutación S639F en *FKS1* en 4 cepas resistentes a equinocandinas y ausente en las 34 susceptibles, sugiriendo la causa de dicha resistencia (Chowdhary *et al.*, 2018).

### **1.8.3. Mecanismo de resistencia a polienos**

Diversos estudios realizados *in vitro*, demuestran que el principal mecanismo de acción de los polienos es a través de la unión al ergosterol, interfiriendo en funciones vitales para la célula, siendo este último de suma importancia para las membranas celulares en los hongos debido a que tiene funciones de regular distintos procesos fisiológicos (Rivera-Toledo *et al.*, 2020).

Se conoce que *C. auris* puede presentar susceptibilidad reducida a anfotericina B, sin embargo, este mecanismo aun no es claro debido a que continúan buscando si se debe a mutaciones en ciertos genes como tal es el caso de *C. albicans*, de la cual está bien descrito que cuando existen mutaciones en los genes *ERG 2,3,5,6* y *11* tiene ese efecto de resistencia (Rhodes *et al.*, 2018; Arendrup & Patterson, 2017).

### **1.9. Resistencia a desinfectantes y métodos de descontaminación en hospitales**

Actualmente aún son limitados los métodos de descontaminación y mecanismos de resistencia a desinfectantes en *Candida auris*. Algunos investigadores analizaron la eficacia de una diversidad de desinfectantes contra diversos aislamientos clínicos de especies de *Candida* en pacientes hospitalizados, concluyendo que un detergente a base de fenol y amonio cuaternario fue bastante eficaz para inhibir el crecimiento de todas las especies de *Candida* a diferentes concentraciones y tiempos de contacto, sin embargo, este estudio se limitó a la evaluación de células planctónicas y no estudio biopelículas (Ku *et al.*, 2018).

A nivel sanitario, se han empleado desinfectantes a base de cloro, como el hipoclorito de sodio y dicloroisocianurato para la desinfección contra *C. auris*, debido a que anteriormente se ha demostrado que son extremadamente eficaces contra otras especies de *Candida*. Esta eficacia de los desinfectantes a base de cloro en *C. auris* se demostró por primera vez durante un brote en un hospital de Reino Unido en 2015, en el cual mencionan que para la descontaminación ambiental, implementaron medidas de limpieza y desinfección de las habitaciones y equipos médicos utilizando productos a base de cloro de 1000 ppm (Chlorclen, Guest Medical, Ashford, Reino Unido) tres veces al día, y posterior al alta o traslado del paciente, la habitación se limpió con un detergente a base de cloro de 10 000 ppm (Hazbat, Guest Medical) (Ku *et al.*, 2018; Shelenz *et al.*, 2016).

En un estudio realizado por Cadnum *et al.* se demostró que los desinfectantes mejorados de peróxido de hidrógeno no esporicidas son altamente eficaces contra diferentes especies de *Candida*, incluida *C. auris*, sin evidencia de que *C. auris* fuera mayormente resistente a estos desinfectantes en comparación con otras especies de *Candida* (Cadnum *et al.*, 2017).

### **1.10. Prevención y control de brotes hospitalarios**

*C. auris* es una levadura patógena para el hospedero humano con una elevada capacidad de causar brotes hospitalarios asociada a una alta tasa de mortalidad, debido a esto es crucial el control de infecciones dentro del entorno hospitalario (Kean & Ramage, 2019). Puede colonizar la piel de pacientes y personal sanitario, y persistir durante tiempos prolongados en diversos ambientes hospitalarios, siendo estos dos aspectos clave para

generar brotes en los centros de salud. Se ha descrito la colonización de *C. auris* en distintos sitios anatómicos como las fosas nasales, ingle, axilas y el recto, incluso reportando aislamientos durante tres meses o más posteriores al aislamiento inicial.

Debido a lo anterior, es sumamente importancia la implementación de protocolos de control para prevenir y controlar brotes de *C. auris* en los centros hospitalarios.

Para iniciar la implementación de estos protocolos, es necesario comenzar con la identificación de los casos, considerando a los pacientes enfermos como a los colonizados asintomáticos. El aislamiento de *C. auris* en cualquier región del cuerpo puede representar una fuente de transmisión. La detección de este microorganismo en el cuerpo humano se hace frecuentemente con muestras de hisopado tomadas de axila e ingle, ya que en estos sitios se ha aislado con mayor frecuencia, pero también se pueden tomar muestras de nariz, boca, oído, orina, heridas y el recto.

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) ha emitido varias recomendaciones para el control de infecciones por *C. auris*, enlistando la identificación de los casos, higiene de manos, precauciones basadas en la transmisión y limpieza.

#### **1.10.1. Identificación de los casos**

Se inicia con la identificación de las especies de *Candida* aisladas de sitios anatómicos estériles y no estériles cuando el paciente se encuentre en un centro de salud que haya reportado casos de *C. auris* o provenga de algún hospital donde se hayan reportado casos tanto en el país de origen como en el extranjero.

También se deben incluir aquellos pacientes que sean contactos cercanos a los casos reportados de *C. auris*, que hayan recibido atención médica en el extranjero, puntualizando aquellos países con reportes de casos de *C. auris*, en el caso de sospecha de transmisión se debe considerar la ampliación del muestreo de todas las personas de la sala donde se haya aislado *C. auris*.

#### **1.10.2. Higiene de manos**

El personal sanitario del hospital debe practicar una correcta y frecuente higiene de manos, utilizando desinfectantes a base de alcohol siendo estos eficaces contra *C. auris* y en caso de que las manos estén visiblemente sucias, se recomienda lavarse las manos con agua y jabón.

### **1.10.3. Precauciones basadas en la transmisión**

Se aconseja hospitalizar a los pacientes con aislamiento de *C. auris* en habitaciones individuales, si existe un número limitado de habitaciones individuales, estas deben ser reservadas a aquellos pacientes con mayor riesgo de transmitir *C. auris*.

Los pacientes con aislamientos de *C. auris* pueden ser hospitalizados con otros que también se encuentren infectados con *C. auris*, pero no juntarlos con pacientes que estén infectados por otros microorganismos.

En caso de ser posible, se debe reducir el número de personal que atienden a los pacientes infectados con *C. auris*.

### **1.10.4. Limpieza**

Se ha comprobado en diversos estudios, que *C. auris* es capaz de persistir en el ambiente durante largos periodos de tiempo, por lo tanto, la limpieza juega un papel crucial para la prevención y control de brotes a nivel hospitalario. Se recomienda usar desinfectantes de grado hospitalario que cuenten con registro en la Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos y que tengan efectividad contra las esporas producidas por *C. difficile*, como el Oxivir® siendo un limpiador a base de peróxido de hidrógeno o el limpiador a base de hipoclorito de sodio Micro-Kill®.

La CDC y la EPA también sugieren el uso de otros limpiadores que aún no cuenten con registro, pero que sus principales ingredientes activos sean el peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio, combinaciones de peróxido de hidrogeno con ácido paroxiacético y combinaciones de amonio cuaternario con etanol o isopropanol.

Se debe realizar la limpieza y desinfección de forma diaria en las áreas de atención a pacientes con aislamientos de *C. auris*.

Actualmente no existe información concluyente sobre un protocolo para la descolonización de los pacientes con aislamiento de *C. auris*, sin embargo, se ha observado que la clorhexidina al 2% en toallas desechables o al 4% en solución acuosa ha sido eficaz durante un brote en Reino Unido. En aquellos pacientes con ventilación mecánica, la clorhexidina en enjuague bucal al 0.2%, gel dental al 1% o administración oral también dio buenos resultados (Zuluaga-Rodriguez, 2020; Schelenz *et al.*, 2016).

### **1.11. Patologías generadas por *Candida auris***

Desde su aparición *C. auris* se ha identificado en el mundo como un patógeno que causa principalmente infecciones del torrente sanguíneo, pero también en heridas, vías urinarias y otras infecciones (Ahmad & Alfouzan, 2021).

La manifestación más frecuente de infección por esta levadura es la candidemia, sin embargo, también se han reportado infecciones del SNC, tracto respiratorio, tracto urogenital, abdomen, huesos, piel y tejidos blandos. Los huéspedes también pueden colonizarse por *C. auris* en la axila, la ingle, las fosas nasales, el oído y el recto. Esta colonización puede no representar una amenaza inmediata al paciente, pero estos pacientes posteriormente pueden infectarse y también representan un riesgo potencialmente grave de colonización hacia otros pacientes (Lockhart & Guarner, 2019).

### **1.12. Diagnóstico**

El diagnóstico por laboratorio de *C. auris* aun es considerado un desafío, ya que frecuentemente es identificada de manera errónea mediante el uso de métodos clásicos de microbiología clínica, incluidos los métodos bioquímicos y los instrumentos automatizados. Esto se debe a que presenta similitudes fenotípicas con otras especies que están estrechamente relacionadas (Vila *et al.*, 2020).

*C. auris* tiene la capacidad de crecer bastante bien a partir de los aislamientos de sangre y otro tipo de muestras, como la orina y exudados de heridas, sin embargo, existen factores atenuantes que dificultan su identificación. Debido a que es una especie recientemente identificada aún no se encuentra en la base de datos de muchos sistemas convencionales de identificación de levaduras y bioquímicamente, está muy relacionada con otras especies de *Candida* como *C. haemulonii* y *C. duobushaemulonii*, lo que complica su identificación debido a la similitud fenotípica (Lockhart & Guarner, 2019).

Crece en medios micológicos utilizados de manera rutinaria, como agar dextrosa Sabouraud (SDA) y medios cromogénicos teniendo una temperatura óptima de crecimiento de 37 a 40°C. Puede requerir un tiempo de incubación prolongado de hasta 10 días para la detección a partir del cultivo primario.

Utilizando medios de cultivo de enriquecimiento selectivo logra un tiempo de recuperación más rápido a partir de muestras clínicas. La CDC actualmente recomienda el uso de

medio cultivo Sabouraud Dulcitol (SDD) suplementado con el 10% de NaCl, cloranfenicol y gentamicina. Esto permite poner de manifiesto la capacidad única de *C. auris* para crecer a temperaturas elevadas y en concentraciones altas de NaCl. *C. haemulonii* y *C. duobushaemulonii* también crecen en estas condiciones, pero requieren glucosa como fuente de carbono, en comparación con *C. auris*, que puede utilizar dulcitol o manitol como fuente de carbono (Keighley *et al.*, 2021).

En microscopio, *C. auris* muestra levaduras individuales o agregadas con forma ovalada, alargadas, y en gemación, de aproximadamente 2.0-3.0 x 2.5-5.0 µm, con colonias de color blanco crema en SDA y colonias de color rosa pálido en CHROMagar *Candida*.

Existen características fenotípicas específicas de clado, por ejemplo, la presencia de pseudohifas son raras en aislamientos de los clados sudafricano y japonés/coreano, pero podrían estar presentes en aislamientos del clado del sur de Asia. En el caso de la formación de agregados celulares se observa frecuentemente en aislamientos de los clados de Sudáfrica y el sur de Asia (Keighley *et al.*, 2021).

*C. auris* debe identificarse mediante métodos moleculares, precisos como: secuenciación de ADN, MALDI-TOF con una base de datos actualizada o el uso de PCR especie específica (Lockhart & Guarner, 2019).

### **1.13. Desafíos en el diagnóstico rápido y tratamiento de infecciones por *C. auris***

En la actualidad, muchos laboratorios de microbiología no identifican de manera correcta y rutinaria a las distintas especies de *Candida* no-albicans o solamente se limitan al uso de métodos de identificación de levaduras como el CHROMagar *Candida*, pruebas bioquímicas o sistemas semiautomatizados como VITEK que no son capaces de identificar con precisión o identifican de manera incorrecta a *C. auris* con otras especies. Actualmente, los únicos métodos de identificación confiables son la PCR, AFPL, análisis de secuenciación y biotipificación por MALDI-TOF (Chowdhary *et al.*, 2013).

La identificación temprana y oportuna de las especies de *Candida*, no solo es importante para el uso apropiado de tratamiento con antifúngicos, sino también para poder implementar medidas y protocolos específicos para el control de infecciones en los hospitales.

Debido a esta situación se debe estar alerta por la emergencia de especies de *Candida* no-*albicans*, particularmente en la búsqueda de *C. auris* en muestras clínicamente significativas en los distintos entornos hospitalarios sobre todo en aquellos pacientes con alto riesgo o en estado crítico que se encuentren en las unidades de cuidados intensivos. Se debe considerar una alta sospecha al momento de aislar cepas distintas a *C. albicans* con resistencia al fluconazol (Schelenz *et al.*, 2016).

## 2) ANTECEDENTES

*Candida auris* es una especie de levadura emergente, considerada como patógeno para el humano, que presenta resistencia a diversos antifúngicos, se aisló e identificó por primera vez en Japón en el año 2009, aunque una revisión retrospectiva de las colecciones de *Candida* reveló que la cepa más antigua se había aislado anteriormente en Corea del Sur en 1996, incorrectamente identificada como *Candida haemulonii*. Se renombró entonces como “auris”, que en latín significa oído.

En 2011, fueron publicados 15 casos de *C. auris* en pacientes de Corea del Sur. Las cepas fueron aisladas de muestras de oído colectadas en 2006. Tras el descubrimiento de *C. auris*, se confirmó que estos 15 casos aislados pertenecían a *Candida auris*.

En 2016, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE. UU. emitió una alerta clínica advirtiendo sobre la aparición de *C. auris* asociado con altas tasas de mortalidad. En 2017, el informe fue actualizado aportando más información sobre su diseminación e incluyendo instrucciones para su desinfección, identificación y recomendaciones para su tratamiento. Actualmente *C. auris* ha sido aislado e identificado en, al menos, 40 países diferentes de los 6 continentes.

En México se describió un brote de *C. auris* durante la pandemia por COVID-19 a finales de mayo de 2020. Esto ocurrió durante la transición del hospital a una instalación exclusiva para COVID-19; este brote comenzó en un paciente sin COVID-19 que posteriormente se propagó a 12 pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (González *et al.*, 2022). Se identificaron cepas de *C. auris* de 12 pacientes y tres aislamientos ambientales de sus habitaciones mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) y se confirmaron mediante tipificación de secuencia multilocus de las regiones ITS1-5.8-ITS2, D1/D2, RPB1 y RPB2. Estas secuencias se alinearon y analizaron utilizando MEGA v.7.0.26 y se delineó un dendrograma (Borman & Johnson, 2016; Villanueva *et al.*, 2021). Todos los pacientes infectados por *C. auris* estaban con uso de ventilación mecánica, catéter venoso central, sondas vesicales y una estancia hospitalaria prolongada.

En este brote se aislaron cepas de *C. auris* en 6 muestras de sangre (6/12; 50%), 8 en orina (8/12; 66.6%) y 2 de ambos sitios (2/12; 16.6%). La mortalidad fue del 83.3% en los pacientes con este diagnóstico (Villanueva *et al.*, 2021).

### 3) JUSTIFICACIÓN

*Candida auris* es una especie de levadura emergente, la cual se destaca de las demás especies del género *Candida* spp por causar epidemias y brotes dentro de los hospitales y centros de salud, generalmente en unidades de cuidados intensivos (UCI).

Lo más alarmante de esta especie, es su resistencia a la mayoría de los diferentes grupos de fármacos antifúngicos, a los desinfectantes y sus elevados índices de mortalidad de entre un 40% y 70%. Actualmente no existen puntos de corte aprobados en las guías internacionales como CLSI y EUCAST, pero se ha demostrado que presenta una susceptibilidad disminuida a los antifúngicos. Debido a esto la CDC propuso el uso temporal de las siguientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) como puntos de corte temporales: fluconazol  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ , anidulafungina y micafungina  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ , caspofungina  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  y anfotericina B  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ , para ser utilizados empíricamente.

En la mayoría de los casos afecta a pacientes en un estado crítico, sin importar sexo o edad y es responsable de causar infecciones a nivel de mucosas, piel y torrente sanguíneo.

La identificación de *C. auris* continúa siendo un desafío, debido a que la mayoría de los sistemas de identificación fenotípica comerciales como Vitek 2, BD Phoenix, MicroScan etc., identifican de forma errónea los aislamientos de *C. auris*. Los casos sospechosos se deben confirmar mediante métodos más precisos como: MALDI-TOF, PCR especie específica, secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad ARN ribosomal 28S o regiones ITS. La dificultad para identificar correctamente a *C. auris* con métodos fenotípicos convencionales agrava la situación, ya que una identificación incorrecta retrasa el tratamiento adecuado para el paciente y compromete su recuperación y pronóstico del estado de salud.

Por lo anterior, este estudio busca caracterizar fenotípica y molecularmente a *C. auris* para comprender mejor su biofisiología, contribuir a una detección más precisa, proponer soluciones terapéuticas y de manejo clínico considerando que se trata de un patógeno emergente que representa una grave amenaza para la salud mundial.

Los hallazgos aportaran datos relevantes para el desarrollo de protocolos locales y estatales de prevención y control de infecciones causadas por *C. auris* apoyando así la respuesta sanitaria en México frente a este patógeno emergente.

## 4) OBJETIVOS

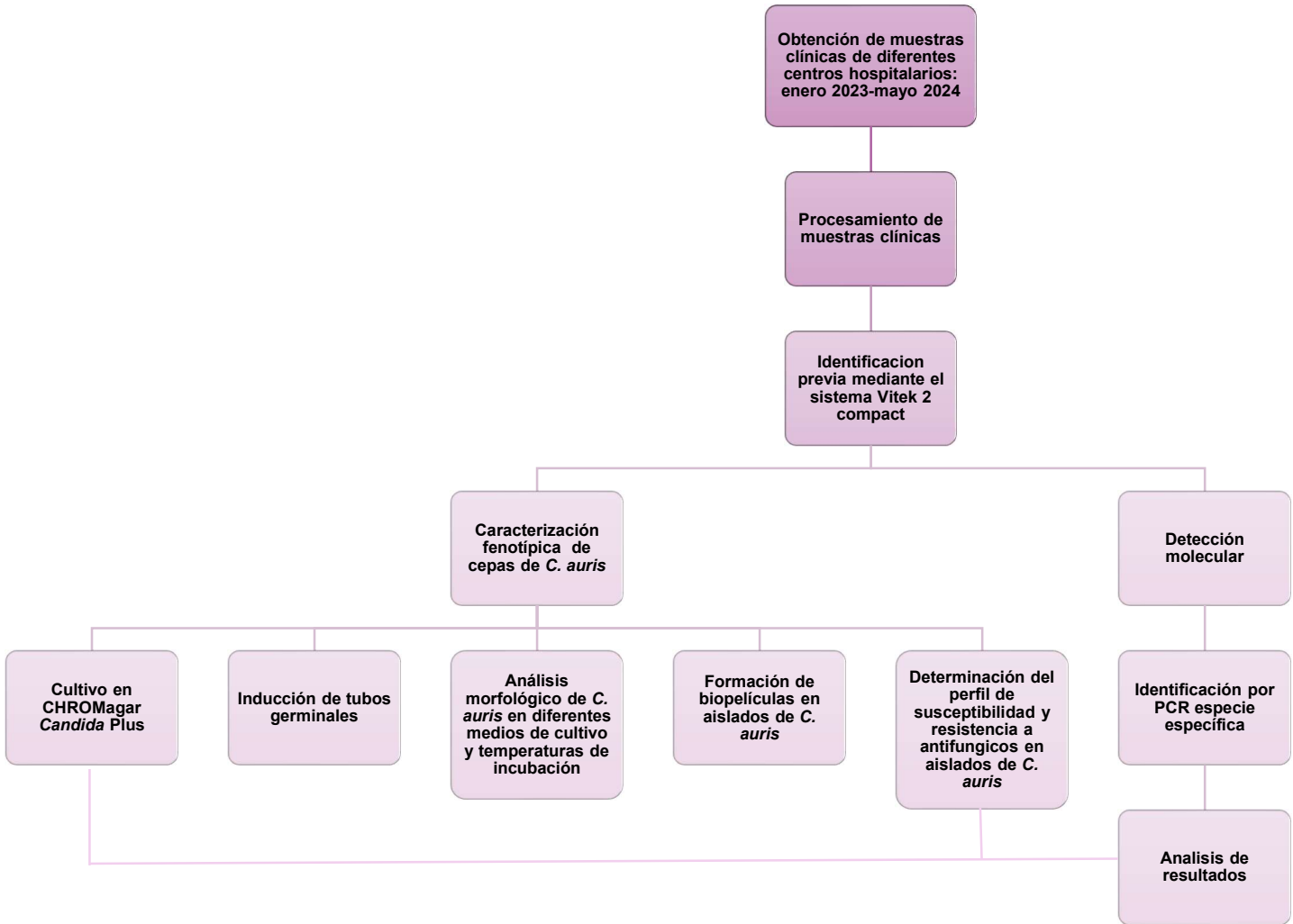
### 4.1. Objetivo general

Detectar y caracterizar fenotípica y genotípicamente a *C. auris* a partir de muestras clínicas.

### 4.2. Objetivos particulares

- 1) Obtener muestras clínicas de diferentes centros hospitalarios e identificar cepas de *C. auris*.
- 2) Caracterizar fenotípicamente los aislados de *C. auris* mediante siembra en CHROMagar *Candida* y siembra en medio YPD suplementado con 10% NaCl.
- 3) Determinar la formación de biopelículas de los aislados de *C. auris*.
- 4) Determinar el perfil de susceptibilidad y resistencia a antifúngicos en aislados de *C. auris*.
- 5) Detectar mediante PCR especie específica los aislados de *C. auris*.

## 5) ESQUEMA DE TRABAJO



## 6) MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Muestras clínicas analizadas

En este trabajo se analizaron 112 muestras clínicas provenientes de diferentes centros hospitalarios privados de la ciudad de Puebla, durante el periodo de enero 2023 a mayo 2024. Las muestras de vías respiratorias altas y bajas, biopsias de tejido y hueso, muestras de orina, sangre e hisopados de lesiones, fueron tomadas de diversos sitios anatómicos en pacientes con diagnóstico de candidiasis invasiva, factores de riesgo predisponentes, uso prolongado de antibióticos y alta permanencia en unidades hospitalarias.

### 6.2. Cepas control

Las cepas usadas como control positivo y negativo para las diferentes pruebas fenotípicas realizadas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas empleadas como control positivo y negativo.

Microorganismo	Denominación de la cepa	Origen anatómico y clado	Donada por:
<i>Candida auris</i>	CA1	Desconocido Clado III	Dr. Eulogio Valentín Gómez
<i>Candida auris</i>	CA2	Hemocultivo Clado III	Dra. María de Lourdes Villa Tanaca
<i>Candida auris</i>	CA3	Orina Clado III	Dra. María de Lourdes Villa Tanaca
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	N/A	Dr. Cristian Dionisio Román Méndez
<i>Candida tropicalis</i>	CT	Herida quirúrgica	Evolución Diagnóstica Puebla
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	N/A	Evolución Diagnóstica Puebla

### **6.3. Condiciones éticas**

Las muestras clínicas fueron colectadas en distintos servicios de 9 centros hospitalarios privados en la Ciudad de Puebla, y procesadas en el laboratorio de microbiología médica Evolución Diagnóstica Puebla. Se elaboró un convenio de confidencialidad con el laboratorio para garantizar que los datos de los pacientes se trabajaron de forma anónima.

Las muestras clínicas y cepas aisladas en un periodo posterior al término del estudio fueron desechadas acorde con lo que dicta la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre el manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI).

Los aislamientos presuntivos para *C. auris*, fueron analizados en el laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP.

### **6.4. Análisis de las muestras clínicas**

Las muestras clínicas obtenidas fueron procesadas conforme a los procedimientos establecidos por el Laboratorio Evolución Diagnóstica Puebla.

#### **6.4.1. Procesamiento de aspirado endotraqueal**

- 1) Se realizó la verificación positiva entre la muestra y la solicitud de estudios, asignándole un código para la identificación.
- 2) Se realizó un frotis, se dejó secar y se fijó con calor para después teñir por Gram, realizándose la valoración de la muestra conforme a los criterios de Murray y Washington, reportando lo observado de la siguiente forma:
  - i) Buena muestra: <10 células epiteliales por campo observándose con el objetivo seco 10x.
  - ii) Mala muestra: >10 células epiteliales por campo con el objetivo seco 10x.
  - iii) Microorganismos: cantidad que se apreció determinado en cruces (+, escasos; ++, moderados; +++, abundantes).

Si la muestra es buena, se continuo con el procedimiento, si fue una mala muestra se reportó como muestra con pobre valor diagnóstico y se paró el procedimiento.

- 3) Si la muestra se valoró como buena, se procedió a utilizar: agar sangre al 5%, MacConkey, agar gelosa chocolate y agar dextrosa Sabouraud en pico de flauta.  
Con un asa bacteriológica de 1 µL se tomó la muestra y se sembró por estría radial en agar sangre al 5% y agar chocolate.  
Se tomo otra asada y se sembró por estría cruzada en agar MacConkey.  
Se tomo una alícuota de 100 µL de la muestra y se inoculó en SDA.
- 4) Se incubo el agar sangre y MacConkey en atmósfera aeróbica a 37°C, el agar chocolate en condiciones de CO<sub>2</sub> al 7.5% a 37°C y el medio SDA en condiciones aeróbicas a temperatura ambiente.
- 5) Posteriormente se analizó el desarrollo de microorganismos.

#### **6.4.2. Procesamiento de biopsias para cultivo**

- 1) Se realizó la verificación positiva entre la muestra y la solicitud, asignándole un código para la identificación.
- 2) Se procedió a utilizar los medios: agar sangre al 5%, MacConkey, feniletilalcohol, caldo tioglicolato y agar dextrosa Sabouraud en pico de flauta.
- 3) Se extrajo la biopsia de tejido blando u óseo del frasco estéril, macerándolo con un pistilo en un mortero y resuspendiéndolo con 5 mL de solución salina isotónica.
- 4) Se tomo una alícuota de la muestra previamente tratada y se inoculo en cada uno de los medios de cultivo.
- 5) Con un asa bacteriológica esterilizada, se sembró mediante estría cruzada en los diferentes medios de cultivo.  
Se inoculó una alícuota de la muestra en el agar dextrosa Sabouraud y caldo tioglicolato.  
Se tomo una gota de la muestra, se colocó en un portaobjetos, se fijó por calor y finalmente se tiño por Gram.
- 6) Se incubo el agar sangre al 5%, MacConkey y caldo tioglicolato en atmósfera aerobia a 37°C, el agar feniletilalcohol en atmosfera anaeróbica a 37°C y el SDA se incubo temperatura ambiente.
- 7) Se realizó el análisis del cultivo en los diferentes medios.

#### **6.4.3. Procesamiento de secreción heridas e hisopados**

- 1) Se realizó la verificación positiva entre la muestra y la orden médica, asignándole un código de identificación.
- 2) Se utilizaron los medios: agar sangre al 5% y MacConkey.
- 3) Las muestras que se trabajaron en medio de transporte se inocularon en los agares sangre y MacConkey. Con el asa bacteriológica esterilizada, se sembró por estría cruzada.
- 4) Se incubaron los agares en atmósfera aeróbica a 37°C.
- 5) Se procedió al análisis del cultivo.

#### **6.4.4. Procesamiento de lavado broncoalveolar**

- 1) Se realizó la verificación positiva entre la muestra y la solicitud, asignándole un código de identificación.
- 2) Se utilizaron los medios: agar sangre al 5%, MacConkey, agar gelosa chocolate, SDA en pico de flauta y botella para anaerobios.
- 3) Se tomo una muestra con un asa bacteriológica de 1µL y se sembró por estría radial en agar sangre y agar chocolate.  
Se tomo una asada y se sembró por estría cruzada en MacConkey.
- 4) Se tomaron 10 mL de muestra y se centrifugaron a 3000 RPM durante 10 minutos.  
Se inoculó con 0.1 mL del sedimento el medio SDA.  
Se depositó una gota del sedimento para los siguientes análisis: KOH 10%, tinción por Gram y tinción Ziehl-Neelsen.
- 5) Se incubaron los medios agar sangre y MacConkey en atmósfera aeróbica a 37°C, el agar chocolate en condiciones de CO<sub>2</sub> al 7.5% a 37°C, el tubo de SDA a temperatura ambiente y la botella de anaerobios se incubó en condiciones que especifica el fabricante utilizando el sistema BactAlert®.
- 6) Se analizaron los resultados.

#### **6.4.5. Procesamiento de hemocultivo**

- 1) Se realizó la verificación positiva de la muestra y la solicitud de estudios, asignándole un código de identificación.

- 2) Se verificó que las botellas estuvieran rotuladas con la hora y vía de toma de muestras.
- 3) Se metió la botella inoculada con la muestra en el sistema de incubación BactAlert® de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- 4) Se analizaron los frascos de hemocultivos positivos.

#### **6.4.6. Procesamiento de catéter intravascular**

- 1) Se realizó la verificación positiva de la muestra con la solicitud de estudios, asignándole un código de identificación.
- 2) Se utilizaron los medios: 2 placas de agar sangre al 5%, 1 placa de MacConkey y 2 placas de SDA.
- 3) Se retiró el catéter del contenedor en el que fue enviado al laboratorio, se colocó en una placa de agar sangre al 5% y se rodó (técnica de Maki) por toda la placa con ayuda de una pinza estéril. Se tomó el catéter y se pasó a una placa de SDA, nuevamente se rodó por toda la placa.
- 4) Se tomó la punta de catéter y se introdujo en un tubo estéril, se agregaron 5 mL de solución salina estéril, se agitó por 15 segundos en vórtex y posteriormente se sonó el tubo con la punta de catéter durante 1 minuto.
- 5) Se tomaron 100 µL de la suspensión y se inoculó en el centro de una placa con agar sangre al 5%, SDA y MacConkey.

Con un asa esterilizada se sembró por estría radial los medios de cultivo agar sangre y SDA. La placa de MacConkey se sembró por estría radial.

- 6) Se incubaron las placas de agar sangre al 5% y MacConkey en atmósfera aeróbica a 35°C y las placas de SDA en atmósfera aeróbica a 37°C.
- 7) Se analizaron los resultados del cultivo.

#### **6.4.7. Procesamiento de líquido pleural**

- 1) Se realizó la validación positiva de la muestra con la orden de estudios, asignándole un código de identificación.
- 2) Se utilizaron los medios: agar dextrosa Sabouraud en pico de flauta y botella de hemocultivos anaerobia.

- 3) Se inoculó 0.5 mL del líquido pleural en el frasco de hemocultivo, por otro lado, se inoculó 0.1 mL de líquido en el medio SDA en pico de flauta.
- 4) Se depositaron 0.5 mL del líquido pleural en un criotubo de 1.5 mL y se centrifugo a 12,000 RPM durante 1 minuto.
- 5) Del sedimento, se colocó 1 gota en dos portaobjetos, se fijó con calor directo, se realizó tinción mediante Gram y Ziehl-Neelsen.
- 6) Se analizaron los resultados del cultivo.

#### **6.4.8. Procesamiento de piezas metálicas “prótesis” por sonicado**

- 1) Se realizó la verificación positiva de la muestra con la orden médica, y se asignó un código de identificación.
- 2) Se utilizaron los medios: agar sangre al 5%, MacConkey, feniletalcohol, botella de hemocultivo anaerobia y SDA en pico de flauta.
- 3) Se saco la pieza metálica y se colocó en un vaso de precipitados estéril.
- 4) Se añadieron 400 mL de solución salina isotónica, se llevó a vórtex durante 30 segundos, posteriormente se sónico a una temperatura de 68°C durante 5 minutos empleando el equipo BRANSON® 3800 y al final nuevamente se llevó a vórtex durante 30 segundos.
- 5) Se tomaron 500 µL del sonicado y se inocularon en el centro de una placa de agar sangre al 5%, MacConkey y feniletalcohol.
- 6) Con un asa esterilizada, se sembró por estría radial el agar sangre y por estría cruzada el agar MacConkey y feniletalcohol.
- 7) Se inoculó una alícuota del sonicado en medio SDA en pico de flauta y en la botella de hemocultivo anaerobia.
- 8) Se incubaron las placas de agar sangre y MacConkey en atmosfera aeróbica a 37°C, la placa de agar feniletalcohol en atmosfera anaeróbica a 37°C, el medio SDA en pico de flauta a temperatura ambiente y la botella de hemocultivo anaerobia se trabajó de acuerdo con lo establecido por el fabricante.
- 9) Se analizaron los resultados.

#### **6.4.9. Procesamiento de expectoración**

- 1) Se realizó la verificación positiva de la muestra con la orden médica, y se asignó un código de identificación.
- 2) Se realizó un frotis con la muestra de expectoración, se fijó con calor directo y se tiñó por Gram para realizar la valoración de la muestra reportando lo observado de la siguiente forma:  
Buena muestra: <10 células epiteliales por campo con el objetivo seco 10x, se continuo con el proceso.  
Mala muestra: >10 células epiteliales por campo con el objetivo seco 10x.  
Microorganismos: se observó la cantidad apreciativa simbolizada por cruces (+, escasos; ++, moderado; +++, abundantes). Si la muestra fue apta para continuar con el proceso.  
Si la muestra se catalogó como mala para el proceso, se reportó como muestra con pobre valor diagnóstico y se paró el procedimiento.
- 3) Se utilizaron los medios: agar sangre al 5%, MacConkey, agar chocolate y SDA en pico de flauta.
- 4) Se inocularon los medios con la muestra y con asa esterilizada se sembraron por estría cruzada.
- 5) Se incubaron las placas de agar sangre y MacConkey en atmósfera aeróbica a 37°C, el agar chocolate en condiciones de CO<sub>2</sub> al 7.5% a 37°C y medio SDA en atmósfera aeróbica a temperatura ambiente.
- 6) Se analizaron los resultados.

#### **6.4.10. Procesamiento de urocultivo chorro medio**

- 1) Se realizó la verificación positiva de la muestra con la orden de estudios, y se asignó un código de identificación de la muestra.
- 2) Se utilizaron los medios: agar sangre al 5%, MacConkey y SDA.
- 3) Se homogenizo la muestra de orina y con un asa calibrada esterilizada de 1µL se tomó una alícuota y se sembró por estría radial en los medios de cultivo.

- 4) Se incubaron los medios agar sangre y MacConkey en atmósfera aeróbica a 37°C y el medio SDA a temperatura ambiente.
- 5) Se analizaron los resultados.

#### **6.4.11. Procesamiento de urocultivo por sonda**

- 1) Se realizó la verificación positiva entre la muestra y la solicitud de estudios, y se generó un código de identificación para la muestra.
- 2) Se utilizaron los medios: agar sangre al 5%, MacConkey y medio SDA.
- 3) Con un asa de 1µL esterilizada se tomó la muestra y se sembró por estría radial en agar sangre al 5%, MacConkey y SDA.
- 4) Se incubaron los medios agar sangre y MacConkey en atmósfera aeróbica a 37°C y el medio SDA a temperatura ambiente.
- 5) Se analizaron los resultados.

#### **6.4.12. Procesamiento de abscesos o aspirados**

- 1) Se realizó la verificación positiva entre la muestra y la orden médica, generando un código de identificación.
- 2) Se utilizaron los medios: agar sangre al 5%, MacConkey, feniletanol, botella de hemocultivo anaerobio y medio SDA en pico de flauta.
- 3) Se inocularon los diferentes medios utilizados, con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada se sembraron por estría cruzada las placas.  
Se realizó un frotis con la muestra, se fijó con calor y se tiñó por Gram.
- 4) Se incubaron los medios agar sangre y MacConkey en atmósfera aeróbica a 37°C, agar feniletanol en atmósfera anaeróbica a 37°C, medio SDA a temperatura ambiente y la botella anaeróbica bajo las condiciones descritas por el fabricante.
- 5) Se analizaron los resultados.

### **6.5. Identificación por VITEK® 2 compact**

Se realizó una identificación previa utilizando el sistema semiautomatizado VITEK® 2 compact a aquellos cultivos que presentaron desarrollo de levaduras. Este sistema utiliza paneles basados en reacciones bioquímicas del microorganismo para la obtención de un bionúmero y así extrapolar con la base de datos del equipo, pudiendo identificar en la mayoría de las ocasiones el género y especie del microorganismo.

### **6.6. Cultivo en CHROMagar® *Candida* Plus**

De los cultivos con aislamiento de levaduras, se tomó una colonia aislada y se realizó siembra por estría cruzada en medio CHROMagar® *Candida* (MCD LAB), las placas se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37°C bajo condiciones atmosféricas aerobias. Posterior al tiempo de incubación se observaron los fenotipos de colonias y se analizaron con lo que se especifica en el inserto del fabricante.

### **6.7. Inducción de tubos germinales en *C. auris***

Para la inducción de tubos germinales se utilizó suero humano. En un criotubo se depositaron 500 µL de suero, posteriormente con un asa esterilizada se tomó una colonia aislada del cultivo de levadura en medio SDA y se suspendió en el suero, se incubó durante dos horas a 37°C. Finalmente se tomaron 40 µL de esta suspensión y se observó utilizando microscopio óptico con el objetivo 40x.

### **6.8. Análisis morfológico de *C. auris* en diferentes medios y temperaturas de incubación**

Se realizó el análisis morfológico de *C. auris* utilizando diferentes medios de cultivo e incubando a distintas temperaturas (Tabla 3). Se utilizaron las cepas de *C. auris*, *C. albicans* ATCC y los aislamientos obtenidos de las muestras clínicas.

Se colocaron 2 mL de cada uno de los medios en tubos de plástico estériles, posteriormente se suspendió 1 colonia aislada de cada cepa y se incubaron durante 48 horas.

Posterior al tiempo de incubación, se tomaron 40 µL de cada una de las muestras, se colocaron en portaobjetos y se observaron al microscopio con el objetivo 40x.

Tabla 3. Medios utilizados y temperaturas de incubación utilizadas para el análisis morfológico.

Medio utilizado	Temperatura de incubación
Suero humano (SH)	25°, 37°C y 42°C
YPD	25°, 37°C y 42°C
YPD suplementado con 10% NaCl	25°, 37°C y 42°C

### 6.9. Formación de biopelículas en aislados de *C. auris*

Para la formación de biopelículas se utilizaron dos métodos, un método cualitativo utilizando rojo Congo y un método semicuantitativo en microplacas de poliestireno.

Se tomó una colonia de cada cultivo y se inoculó en medio YPD, el cual fue incubado durante 48 horas a 37°C. De cada aislamiento se preparó una suspensión con solución salina isotónica al 0.5 de McFarland, se tomaron 50 µL de la suspensión y se colocaron en 4950 µL de caldo SBD obteniendo una dilución 1:100.

#### 6.9.1. Método semicuantitativo en placa de poliestireno

En una microplaca de poliestireno con fondo en U, en cada pocillo se añadieron 200 µL de la dilución 1:100 que se preparó inicialmente de cada uno de los aislamientos, se cubrió la microplaca con Parafilm y se incubó durante 48 horas a una temperatura de 37°C bajo condiciones atmosféricas aerobias. Después de la incubación, se decantó el medio de cultivo y cada pocillo fue lavado 3 veces con solución PBS estéril, se añadieron 200 µL de metanol a cada uno de los pocillos para fijar durante 30 minutos y se procedió a lavar nuevamente por 3 veces con solución PBS. Posteriormente se adicionaron 200 µL de cristal violeta a una concentración del 1% a cada pocillo para teñir durante 30 minutos. Se decantó el cristal violeta y se lavaron los pocillos 3 veces con solución PBS estéril. Se agregaron 200 µL de etanol al 96%, se dejó por un tiempo de 5-10 minutos y se continuó a tomar lectura de la microplaca en un lector de ELISA (*MULTISKAN FC* ThermoScientific) a una longitud de onda de 450 nm. Cada aislamiento se procesó por triplicado. Finalmente, para el análisis de las absorbancias obtenidas se utilizó la

clasificación establecida por Stepanovic, *et al.* en 2007, que describe lo siguiente para la formación de biopelículas: no formadoras ( $DO \leq DOc$ ); poco formadoras ( $DOc < DO < 2DOc$ ); medianamente formadoras ( $2DOc < DO < 4DOc$ ) y fuertemente formadoras ( $4DOc < DO$ ). Para este método semicuantitativo se ocupó como control negativo caldo SBD sin inocular con la suspensión de levaduras.

#### **6.9.2. Determinación cualitativa en agar SBD suplementado con rojo Congo.**

Se prepararon placas con agar SBD suplementados con 0.025% de colorante rojo Congo. Posteriormente se preparó una suspensión al 0.5 McFarland utilizando solución salina isotónica de cada uno de los aislamientos provenientes de un cultivo en agar SDA con 48 horas de incubación. De dicha suspensión de levaduras, se tomaron 100  $\mu$ L y se inocularon en las placas de agar SBD suplementadas con rojo Congo, se sembraron por estría cruzada, se incubaron durante 48 horas a 37°C y se realizó la interpretación de acuerdo con lo establecido por Bravo *et al.* en 2005, en el cual se considera como prueba positiva a aquellas colonias color rojo y como negativa la formación de colonias color blancas.

#### **6.10. Determinación del perfil de susceptibilidad y resistencia a antifúngicos en aislados de *C. auris***

Para la determinación del perfil de susceptibilidad y resistencia a diferentes antifúngicos en *C. auris*, se usó el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) siguiendo las recomendaciones del CLSI especificadas en la guía M24M44S-ED3:2022. Se utilizaron colonias de un cultivo puro de las cepas de *C. auris*, posteriormente se realizó una suspensión en un tubo con 3 mL de solución salina isotónica a una concentración de 1.8 – 2.2 en la escala de McFarland ( $5.4 \times 10^8$  –  $6.6 \times 10^8$  cel/mL). De esa suspensión de levaduras, se tomó una muestra con un hisopo estéril para inocular y sembrar de forma masiva en tres direcciones diferentes una placa con agar Mueller-Hinton, se dejó reposar la placa un tiempo de 10-15 minutos, para después colocar los discos impregnados con antifúngicos (Tabla 4).

**Tabla 4. Antifúngicos utilizados, se incluyen tres grupos (azoles, equinocandinas y polienos)**

<b>Antifúngico</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Concentración</b>
<b>Fluconazol</b>	FLU	25 µg
<b>Itraconazol</b>	ITC	8 µg
<b>Caspofungina</b>	CAS	5 µg
<b>Anfotericina B</b>	AMB	10 µg

Se incubaron las placas durante 24-48 horas a 37°C en atmósfera aeróbica y se tomó lectura del halo de inhibición registrando los diámetros.

Para la determinación del perfil de susceptibilidad y resistencia de las otras especies de *Candida* no-albicans que se aislaron de las muestras clínicas, se utilizó el sistema automatizado VITEK®2 Compac, pudiendo así determinar la concentración mínima inhibitoria de los aislados, tomando en cuenta lo que dice la guía CLSI M24M44S-ED3:2022, que solo *Candida krusei* (*Pichia kudriavzevii*) presenta resistencia intrínseca (IR) a fluconazol y *Candida lusinariae* puede adquirir resistencia *in vivo* a anfotericina B durante la terapia. Para este método se consideraron los antifúngicos: fluconazol, voriconazol, caspofungina y micafungina, tomando los puntos de corte para la CMI de la guía CLSI.

## **6.11. Detección por PCR especie específica**

### **6.11.1. Extracción del material genético**

Para la extracción del material genético se utilizó el siguiente protocolo descrito en el kit comercial Quick-DNA™ Microprep Kit ZYMO RESEARCH® a partir de una suspensión celular y digestión con proteinasa K.

- 1) Se realizó una suspensión de levaduras, colocando 200 µL de agua libre de nucleasas y una colonia de un cultivo puro de *Candida* spp. en un tubo tipo eppendorf estéril, posteriormente se añadieron 20 µL de proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL, se llevó a vórtex por 15 segundos e incubó a 55°C durante 10 minutos.
- 2) Posterior a la incubación, se añadió al mismo tubo 220 µL del reactivo Genomic Binding Buffer y se llevó a vórtex por 15 segundos.

- 3) Se transfirió el contenido del tubo eppendorf a un tubo colector con columna y se centrifugo a 12,000 RPM por 1 minuto, después de la centrifugación, se desechó el primer tubo colector.
- 4) Se transfirió la columna a un nuevo tubo colector, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de DNA Pre wash y se llevó a centrifugación a 12,000 RPM durante 1 minuto.
- 5) Se decanto, y se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de g-DNA wash buffer, se centrifugo a 12,000 RPM por 1 minuto, nuevamente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de g-DNA wash buffer y se volvió a centrifugar a 12,000 RPM durante 1 minuto.
- 6) Finalmente se transfirió la columna a un tubo eppendorf estéril, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, se incubo durante 5 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugo a 14,500 RPM durante 1 minuto.
- 7) El producto de extracción de DNA se almaceno a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 6.11.2. Amplificación del material genético

Para la amplificación del material genético se utilizó una reacción de PCR punto final, utilizando la enzima DreamTaq DNA polimerasa incluida en el DreamTaq Green PCR Máster Mix (2X) ThermoScientific. La cantidad de componentes de la PCR utilizados se muestran en la tabla 5. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador BIORAD T100™ Thermal Cycler.

**Tabla 5. Componentes de la PCR.**

Componente	Volumen añadido por reacción ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final de la reacción
DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific)	6.25 $\mu\text{L}$	Buffer de reacción 1X, dNTPs 0.2 $\mu\text{M}$ y $\text{MgCl}_2$ 2 $\mu\text{M}$
Primer F	0.3 $\mu\text{L}$	0.45 $\mu\text{M}$
Primer R	0.3 $\mu\text{L}$	0.45 $\mu\text{M}$
DNA	3 $\mu\text{L}$	---
$\text{H}_2\text{O}$ libre de nucleasas	2.65 $\mu\text{L}$	---
<b>Volumen final</b>	12.5 $\mu\text{L}$	

Mediante la reacción de PCR se realizó la amplificación del gen QG37\_03410 que codifica para una proteína GPI presente en la pared celular especie específica para *C.*

*auris*. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 6 y el protocolo de trabajo para la amplificación en la tabla 7.

**Tabla 6. Oligonucleótidos para la reacción de PCR especie específica.**

Gen diana	Primer	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
QG37_03410	03410_F	GCCGCTAGATTGATCACCGT	137 pb	Ruiz <i>et al.</i> , 2018
	03410_R	TAGGTGTGGGTACCCTTGGT		

**Tabla 7. Protocolo de trabajo para la reacción de PCR.**

Gen diana	Primer	DI	35 ciclos			Extensión final	CF
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
QG37_03410 TA: 137 pb	03410_F	95°C/ 3 min	95°C/45 s	60°C/40 s	72°C/ 45 s	72°C/ 5 min	∞12° C
	03410_R						

DI: desnaturalización inicial, CF: conservación final, TA: tamaño del amplificado

### 6.11.3. Electroforesis y visualización de los productos de PCR

La electroforesis se realizó en geles de agarosa a una concentración de 1.7%. Se cargaron cada uno de los pocillos con 5µL del producto de PCR y 5µL de colorante GelRed™ Biotium®. Se uso el marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific), cargando en el pozo 5µL de GelRed™, 2 µL de MPM y 1µL de agua destilada estéril. Se cargo la cámara para el corrimiento electroforético con una solución 1X de tris borato, EDTA (TBE) como buffer. Se aplicó un voltaje de 90V/45 minutos. Finalmente se visualizaron y fotografiaron los geles mediante la exposición a luz UV, utilizando el trasiluminador SYNGENE®.

## 7) RESULTADOS

### 7.1. Resultados de las muestras analizadas

Se analizaron un total de 112 muestras provenientes de 9 hospitales privados en la Ciudad de Puebla capital, en un periodo comprendido de enero 2023 a mayo 2024. Del total de las muestras, el 48% corresponden al sexo masculino y el 52% al sexo femenino (Figura 5).

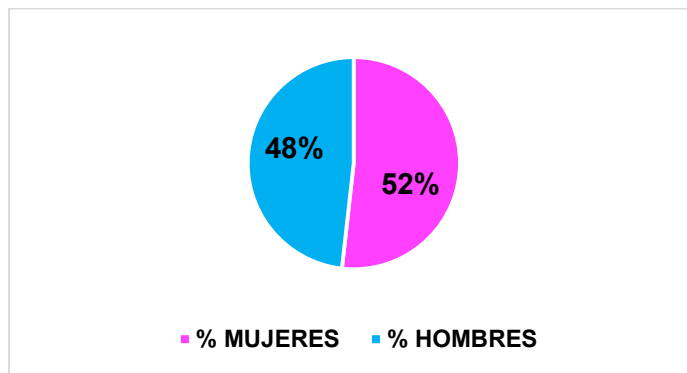


Figura 5. Porcentaje de las muestras clínicas analizadas por sexo de los pacientes.

La distribución de las muestras por servicio hospitalario fue del 66.1% correspondiente al área de hospitalización general, 29.4% a la unidad de cuidados intensivos (UCI) y solo un 4.5% corresponde a muestras de pacientes ambulatorios (Figura 6).

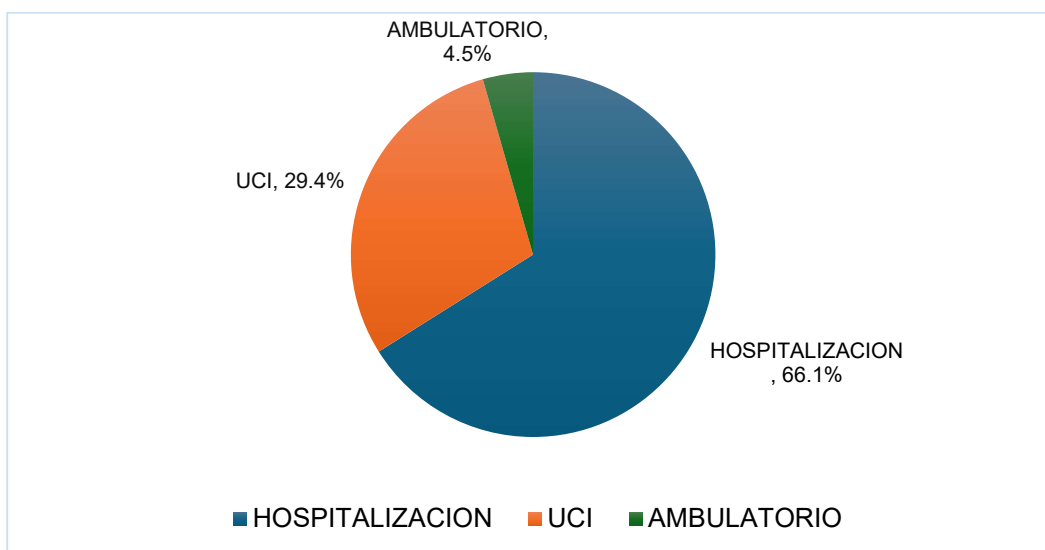
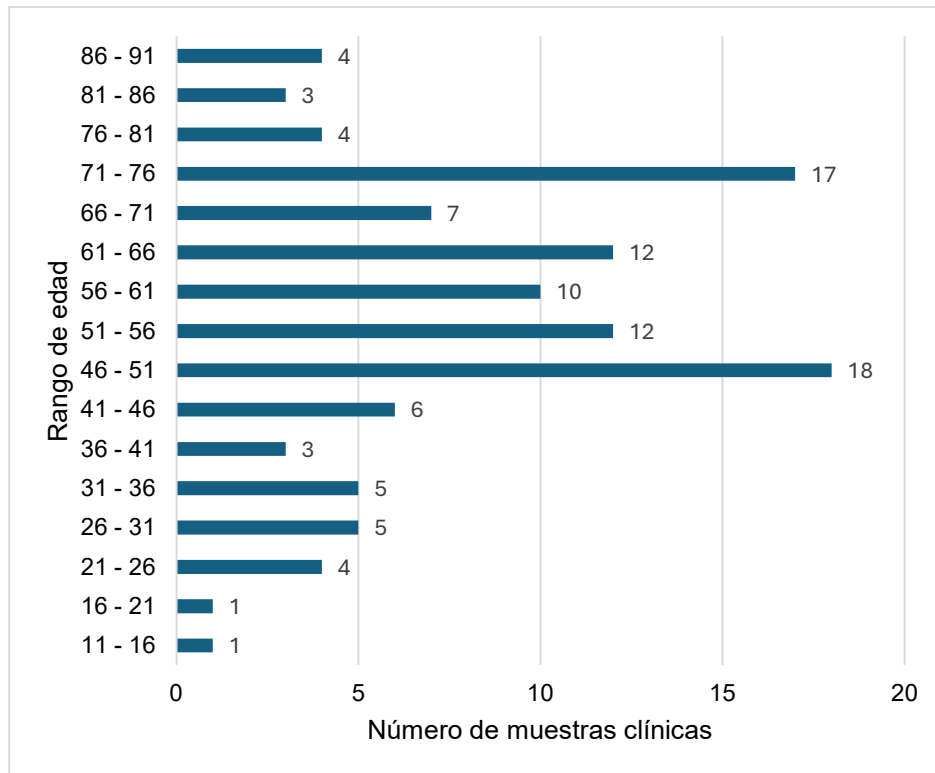


Figura 6. Distribución porcentual de las muestras clínicas por servicio hospitalario.

Con respecto a la edad de los pacientes de los que se obtuvieron las muestras de estudio, fue heterogénea, comprendiendo desde los 11 años hasta una edad máxima de 91 años, el rango más frecuente fue de los 46 a los 76 años (Figura 7).



**Figura 7. Número de muestras clínicas por rango de edad de la población de estudio.**

Las muestras fueron tomadas de distintos sitios anatómicos, obtenidas mediante procedimientos quirúrgicos o procedimientos invasivos, provenientes de pacientes con infecciones recurrentes o con algún proceso de inmunosupresión. El mayor número de muestras fue a partir de lavado broncoalveolar con un 49.1%, seguido de cultivos de biopsia de tejido muscular y óseo en un 10.7% y posteriormente de muestras de orina en el 7.1% (Figura 8).

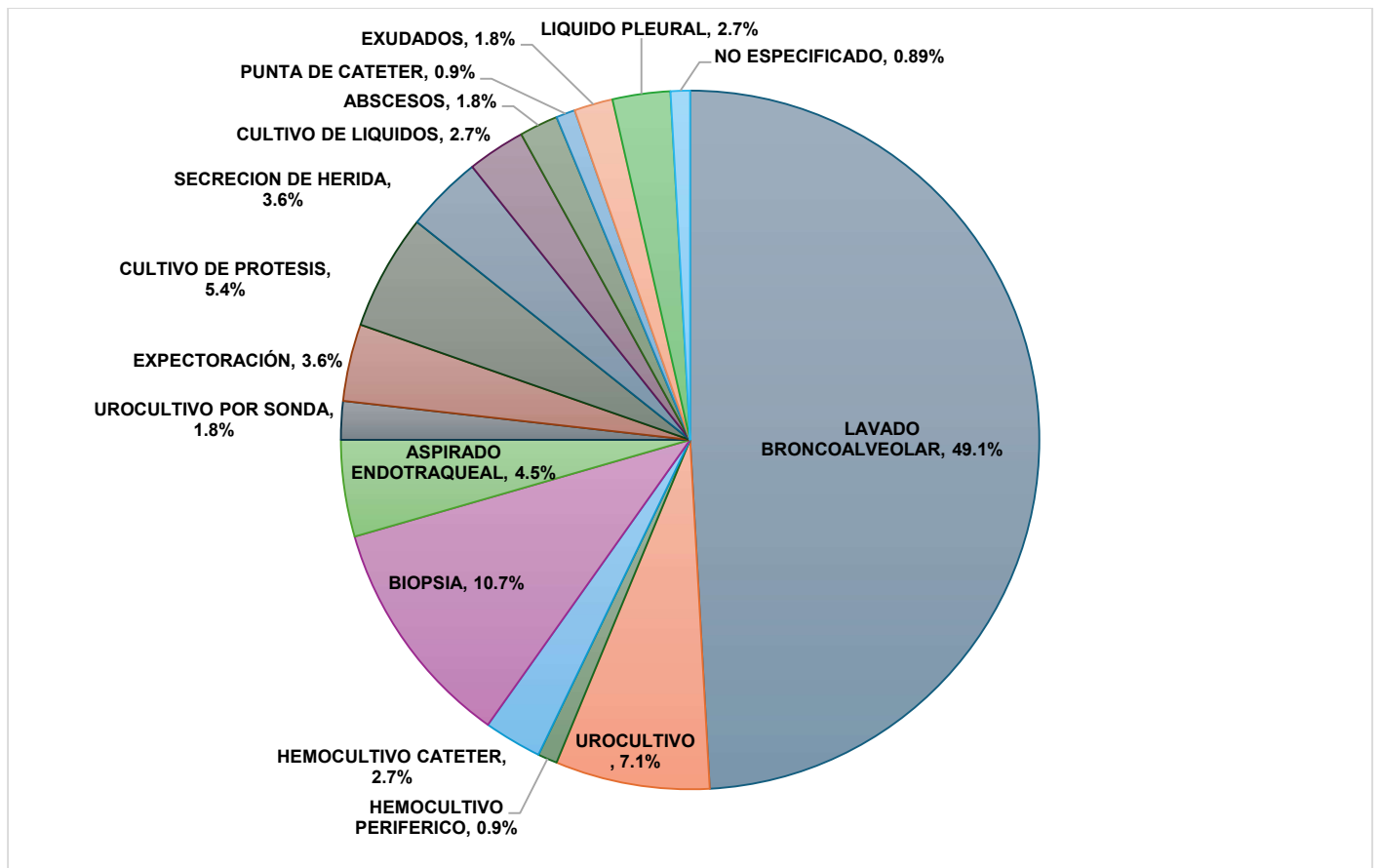


Figura 8. Frecuencia en porcentaje del tipo de muestras analizadas.

### 7.1.1. Microorganismos aislados de las muestras analizadas

De las muestras analizadas, se recuperaron diversos microorganismos. Teniendo como resultados, 84 cultivos positivos y 28 cultivos negativos. En los cultivos positivos, se observó que la enfermedad infecciosa en el hospedero era generada por más de un microorganismo. Teniendo la mayor frecuencia, cultivos con aislamientos de *Candida albicans*, seguido de especies de *Candida* no-*albicans* y posteriormente diversos géneros bacterianos y fúngicos (Figura 9).

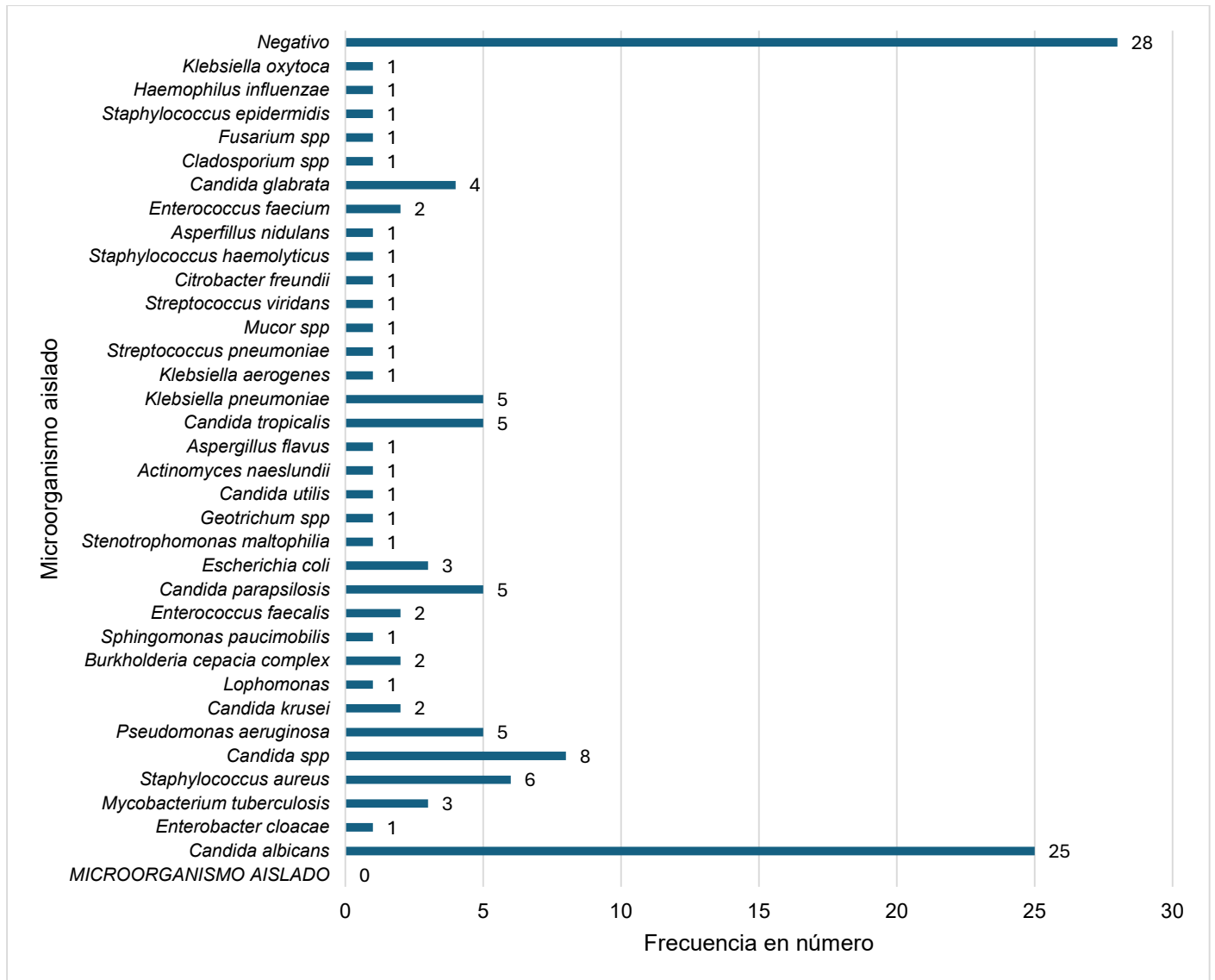


Figura 9. Frecuencia de microorganismos aislados a partir de las muestras clínicas.

### 7.2. Resultados de las muestras analizadas con aislamientos de *Candida spp*

De un total de 84 muestras positivas en cultivo, 50 presentaron desarrollo de diferentes especies de levaduras del género *Candida spp*. En cuanto al sexo en los pacientes de las muestras analizadas con aislamiento de *Candida spp*, obtuvimos que un 44% corresponden al género masculino y un 56% al género femenino, observando que afecta por igual a ambos sexos (Figura 10).

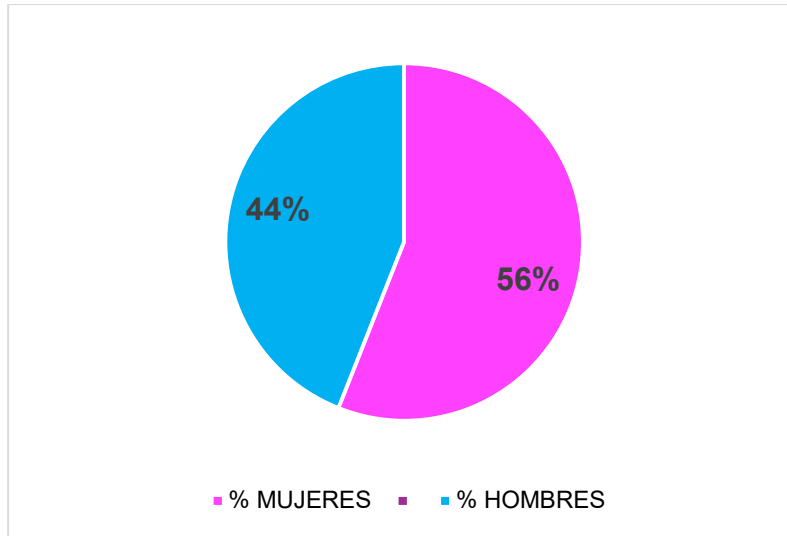


Figura 10. Porcentaje de muestras positivas a *Candida* spp por sexo de los pacientes.

En cuanto a la edad de los pacientes, se encontró que el género *Candida* spp afecta a todas las edades y que es más frecuente en la edad adulta en un rango de 46 a 76 años (Figura 11).

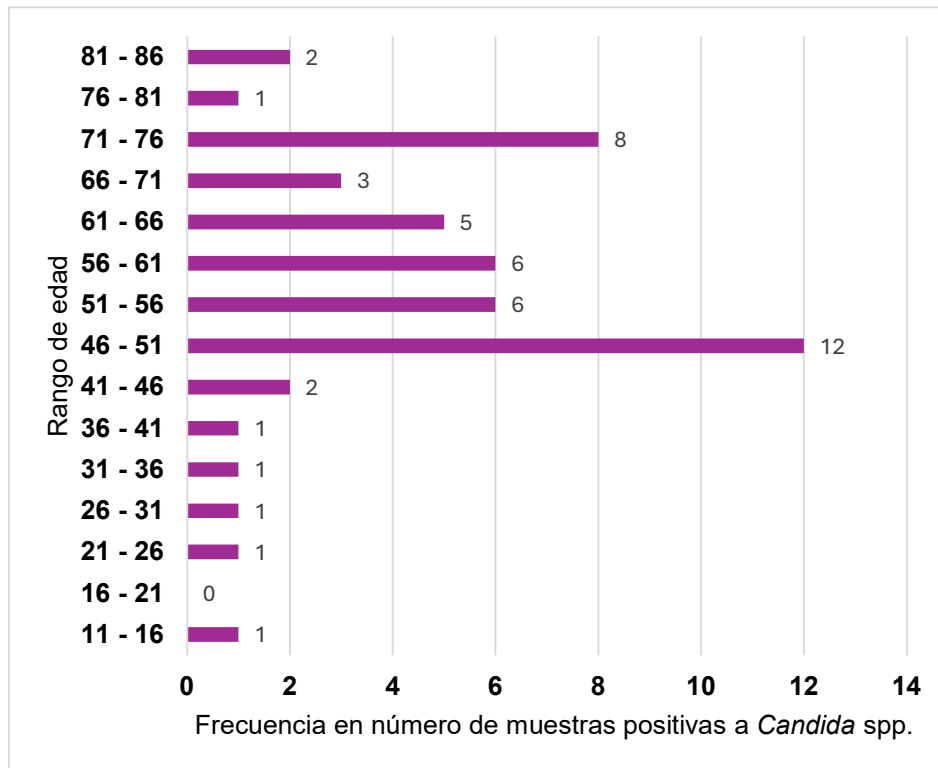


Figura 11. Número de muestras positivas a *Candida* spp respecto a las edades de los pacientes.

### 7.2.1. Tipo de muestras analizadas con aislamiento de *Candida* spp

De un total de 50 muestras positivas con aislamiento de *Candida* spp, encontramos que la mayor frecuencia es en cultivos de biopsia con un 22%, seguido de muestras de orina 16%, lavados broncoalveolares 12%, cultivo de prótesis 10%, 6% de hemocultivos de catéter y 2% en hemocultivos periféricos (Figura 12). En varias de estas muestras con aislamiento de *Candida* spp, se aislaron otros microorganismos, determinado que se trataba de infecciones polimicrobianas.

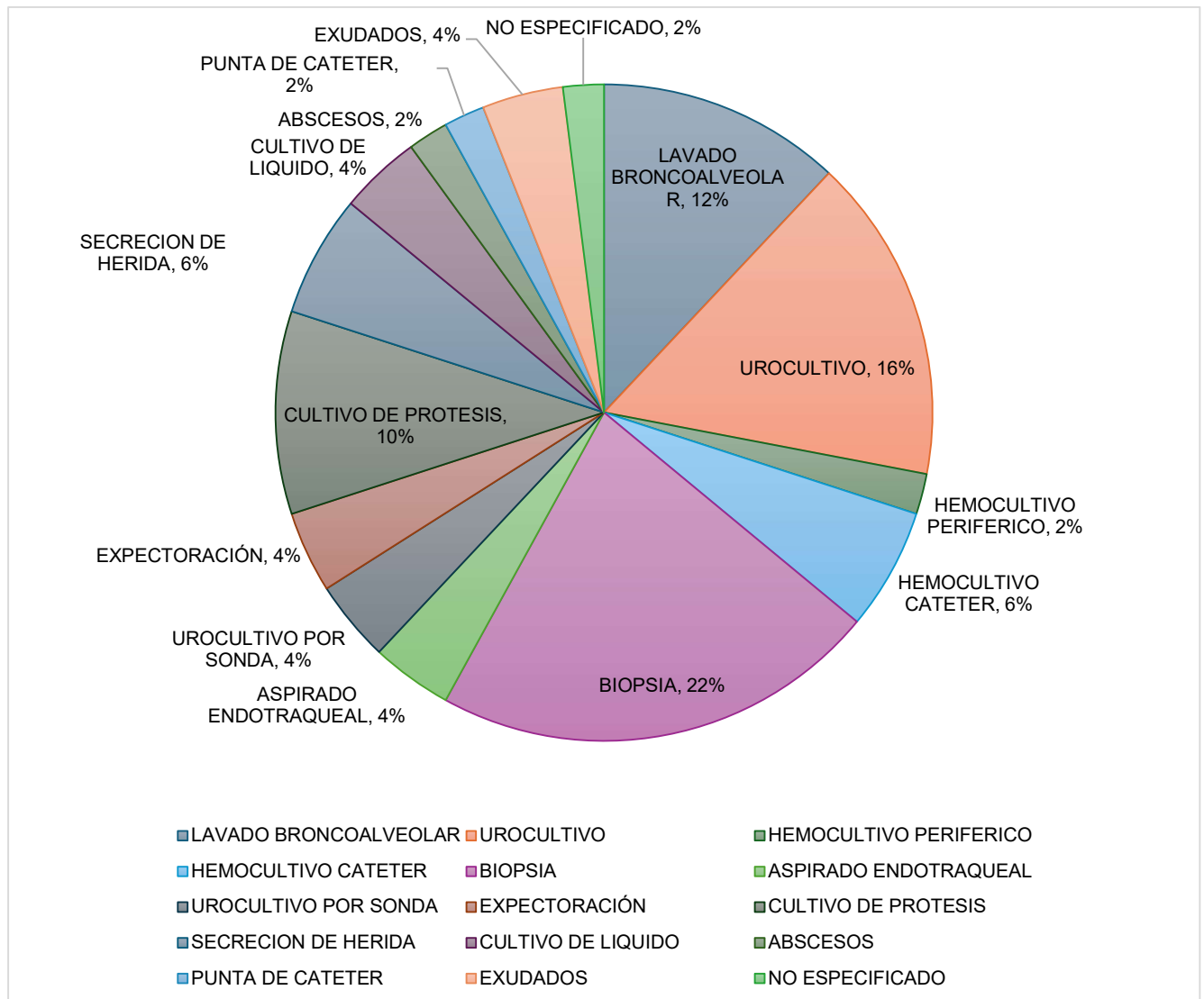


Figura 12. Porcentaje de los tipos de muestras con aislamiento de *Candida* spp.

### 7.2.2. Especies de *Candida* spp aisladas de las muestras clínicas

Se realizó la identificación a nivel de género y/o especie de las 50 cepas levaduriformes, 42 de ellas se pudieron identificar mediante el método semiautomatizado VITEK®2 compact y 8 cepas no se identificaron, considerándose como sospechosas para *Candida auris*, tomando en consideración la definición de caso probable de infección por *C. auris* publicado en el aviso epidemiológico emitido por la CONAVE en septiembre de 2021.

Del total de las cepas analizadas, el 50% corresponden a *Candida albicans* siendo esta la especie más frecuente, seguido de un 10% de *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*, 8% para *Candida glabrata*, 4% *Candida krusei* y 2% *Candida utilis* (Figura 13).

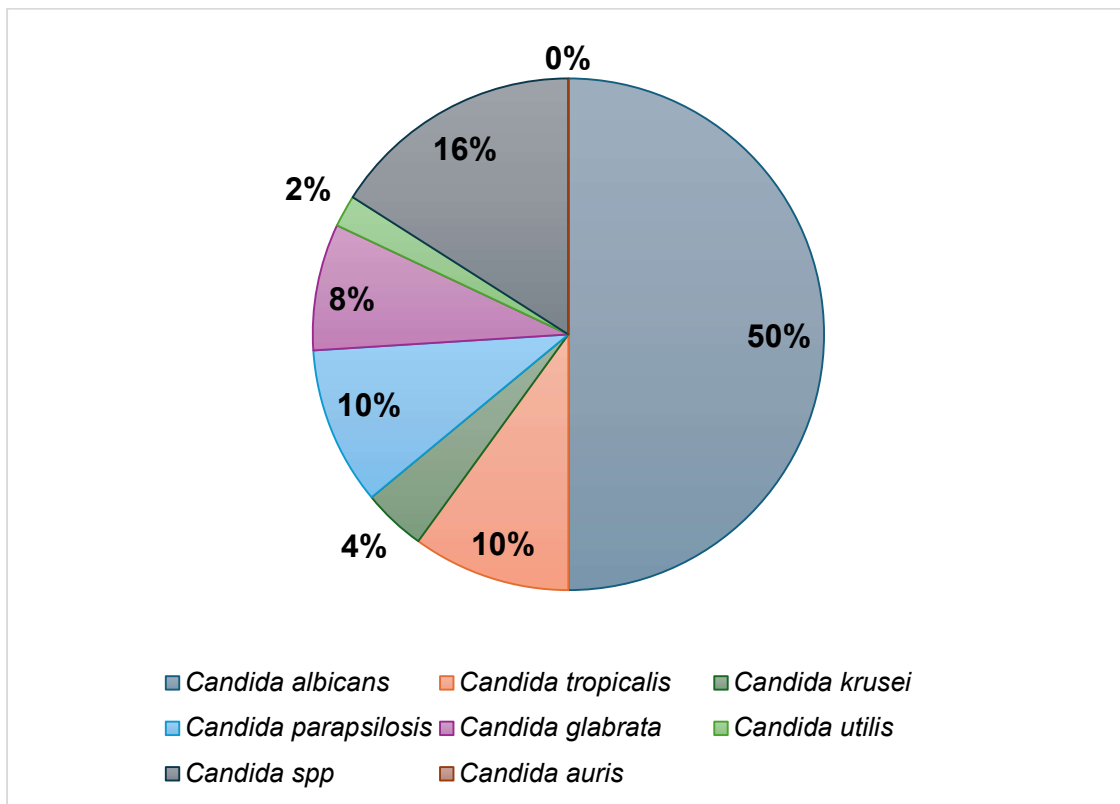


Figura 13. Porcentaje de especies de *Candida* spp aisladas de las muestras clínicas.

En estos 50 aislamientos con *Candida* spp, no encontramos ninguna cepa de *C. auris*, pero consideramos 8 casos presuntivos, debido a que las cepas no pudieron ser identificadas mediante el uso del método semiautomatizado Vitek2 compact.

### 7.2.3. Perfil de susceptibilidad de los aislados de *Candida* spp

Se determino el perfil de susceptibilidad a cuatro antifúngicos a 41 cepas de *Candida* spp. Se consideraron los puntos de corte para concentración mínima inhibitoria (CMI) de la guía CLSI M27M44S-ED3:2022 y se tomó en cuenta que, de las especies aisladas, solo *Candida krusei* tiene resistencia intrínseca o IR a fluconazol. Se determino en este análisis, que cada vez es más frecuente encontrar cepas de *Candida albicans* y *Candida* no-albicans que presentan resistencia a azoles y equinocandinas, los cuales son grupos de fármacos antifúngicos empleados como tratamiento en infecciones invasivas o sistémicas a nivel hospitalario. En la figura 14 se puede observar el número de cepas de cada especie aislada y el porcentaje de susceptibilidad, resistencia intermedia y resistencia para cada antifúngico.

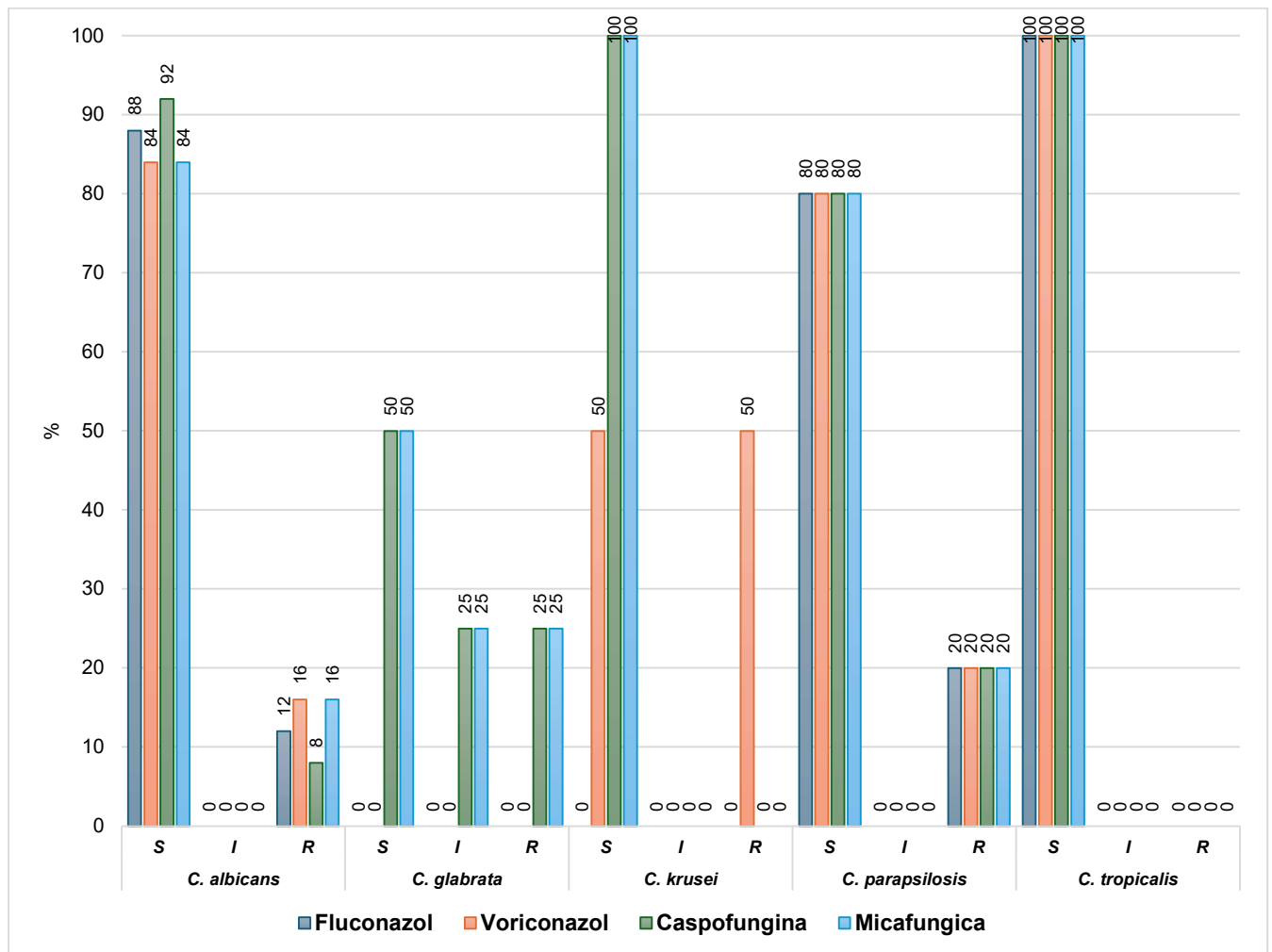


Figura 14. Perfil de susceptibilidad a antifúngicos de 41 cepas de *Candida* spp. 25 cepas de *C. albicans*, 4 cepas de *C. glabrata*, 2 cepas de *C. krusei*, 5 cepas de *C. parapsilosis* y 5 cepas de *C. tropicalis*.

### **7.3. Caracterización fenotípica de los aislados de *Candida auris***

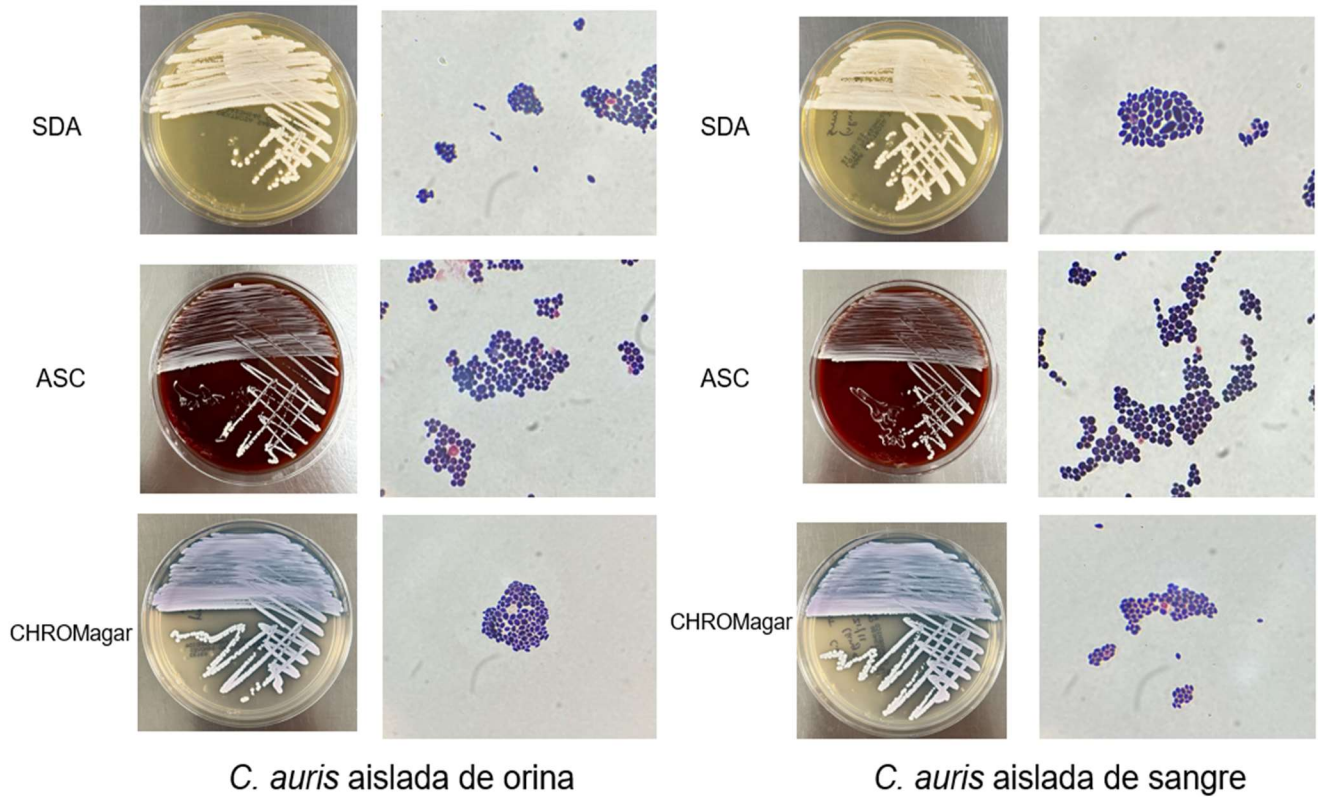
Al no encontrar aislamientos de *Candida auris* en las muestras clínicas analizadas de los 9 centros hospitalarios en la Ciudad de Puebla, se continuo el proyecto con la caracterización de *C. auris* utilizando 3 cepas donadas pertenecientes al clado III correspondiente a Sudáfrica. 1 cepa tipo clado III y 2 cepas provenientes de aislados clínicos (sangre y orina).

#### **7.3.1. Análisis morfológico**

*C. auris* presenta distintas morfologías utilizando diferentes medios de cultivo. Para poder observar estas diferencias morfológicas, las cepas de *C. auris* las cultivamos en placas de agar sangre de carnero, agar dextrosa Sabouraud y CHROMagar® *Candida* Plus, para posteriormente ser teñidas por Gram y observar la morfología celular.

En ASC y SDA se observó una morfología microscópica de levadura de forma ovalada y células en gemación, en CHROMagar® *Candida* Plus, se apreciaron células relativamente más redondeadas, pero algo importante, es que no se observaron células hifales o pseudohifales en comparación con *Candida albicans*.

En cuanto a la morfología macroscópica en los medios ASC y SDA se observó un fenotipo de colonia similar a otros géneros de *Candida* spp, apreciándose colonias cremosas, redondas, de color blanco-amarillento, pero en CHROMagar® *Candida* Plus se apreciaron colonias de color azul con halo azul al reverso de la placa, siendo esta característica única para esta especie de acuerdo con lo que indica el fabricante en el inserto (Figura 15).

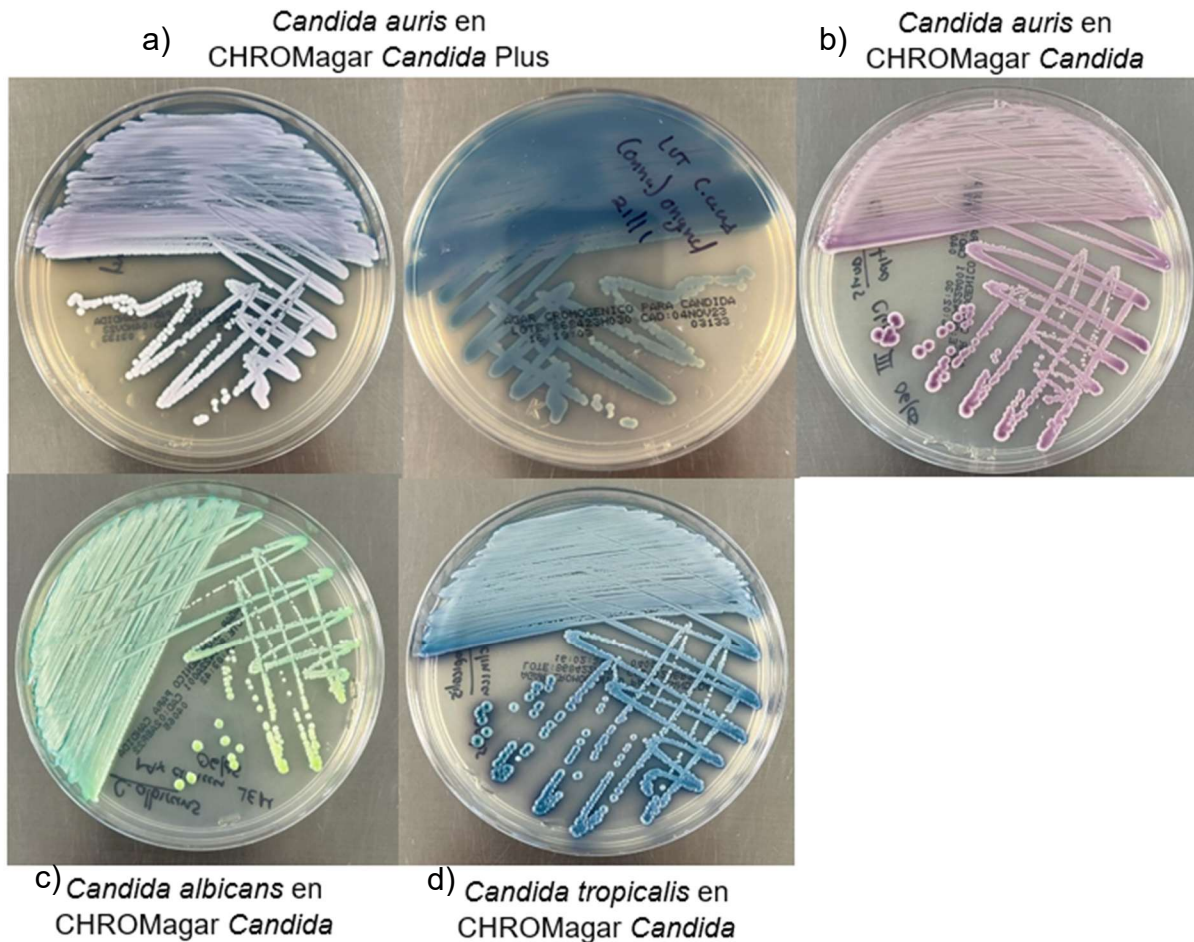


**Figura 15. Tinción de Gram y morfología colonial de los aislados de *C. auris*.** Se utilizaron diversos medios de cultivo. SDA: agar dextrosa Sabouraud, ASC: agar sangre de carnero. En SDA o ASC se observan colonias cremosas, redondas, de color blanco-amarillento y en CHROMagar *Candida* Plus se aprecian colonias de color azul con halo azul al reverso de la placa.

### 7.3.2. Formación de tubos germinales

Se demostró que las tres cepas de *Candida auris* no desarrollan tubo germinal cuando se realizó la inducción de esta estructura utilizando suero humano, como control positivo para tubo germinal se utilizó una cepa ATCC de *Candida albicans* y a *Candida tropicalis* como control negativo, observándose en la Figura 16 la formación de tubo germinal solo en *C. albicans*.



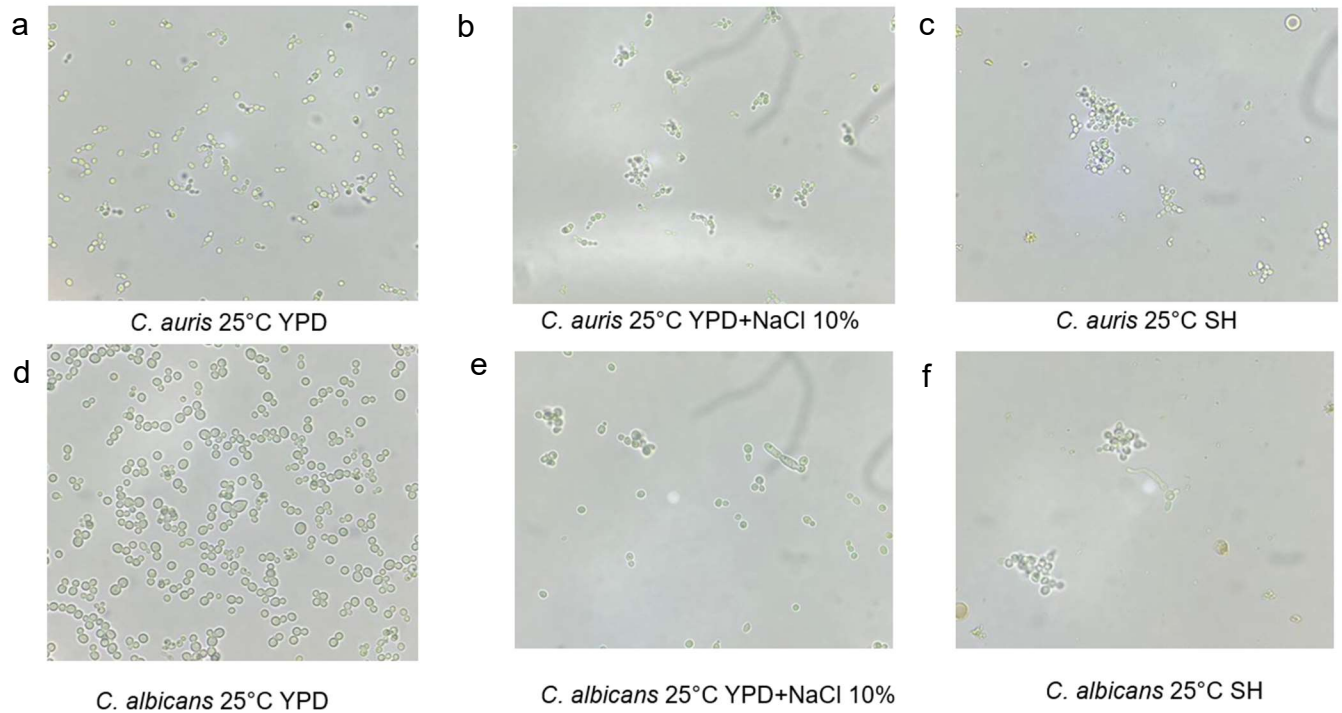


**Figura 17. Fenotipo de colonias de *C. auris*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis* en CHROMagar *Candida* y *Candida auris* en CHROMagar *Candida* Plus.** a) *C. auris* con colonias azules-lilas y halo azul al reverso de la placa, b) *C. auris* en CHROMagar *Candida* con colonias moradas, c) *C. albicans* con colonias verdes y d) *C. tropicalis* con colonias azul metálico.

#### **7.3.4. Formación de pseudohifas en *C. auris* y análisis morfológico en distintas condiciones de cultivo**

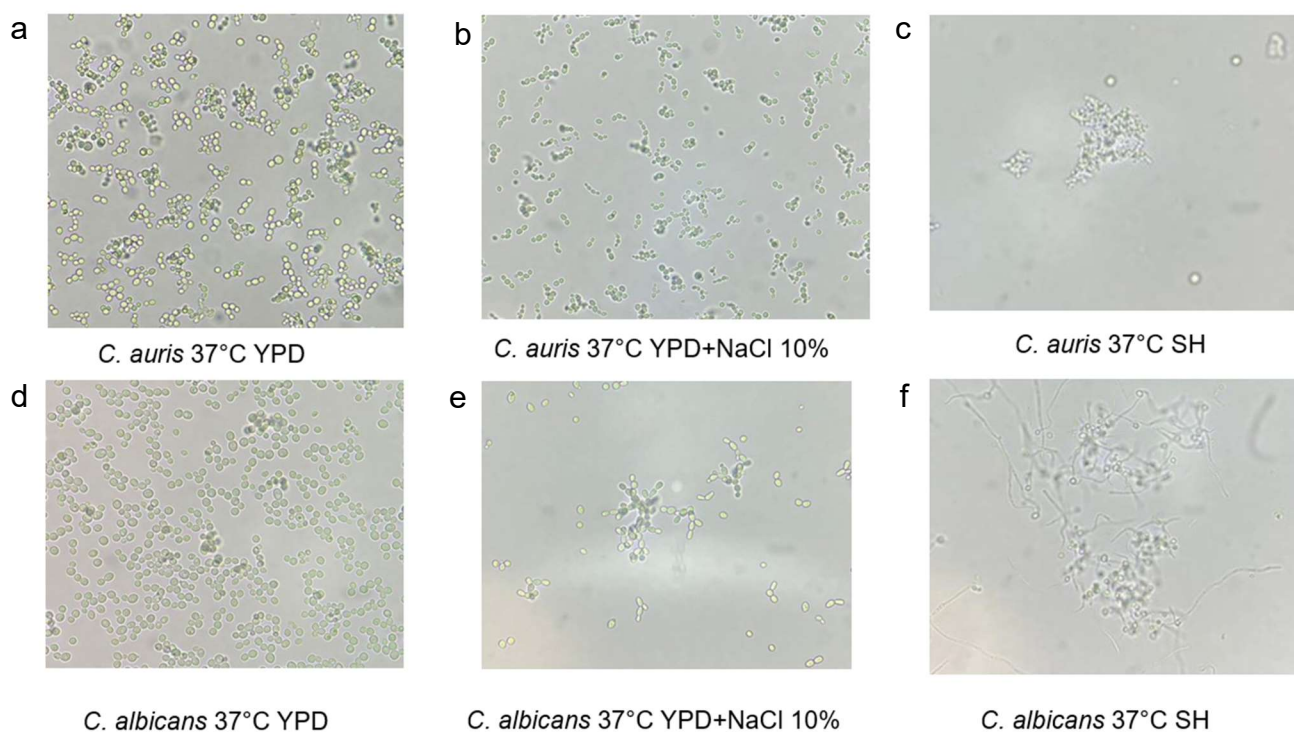
Se realizó un ensayo con el objetivo de observar si *C. auris* presenta cambios en su morfología cuando es cultivada utilizando distintos medios de cultivo y distintas temperaturas.

Cuando se cultivó a una temperatura de 25°C, en suero humano se observó un fenotipo agregativo y en los medios YPD y YPD suplementado con NaCl no hubo algún cambio aparente, en comparación con *C. albicans* que en suero humano y YPD ya se apreciaba la formación de pseudohifas (Figura 18).



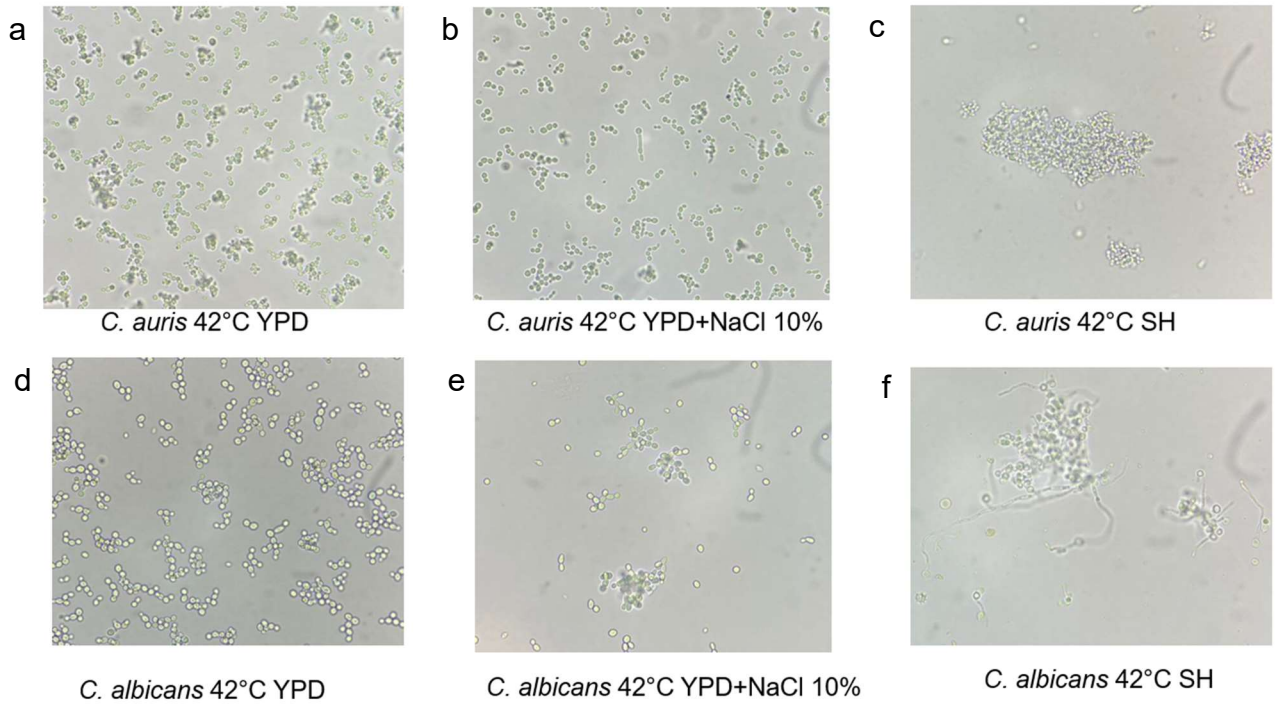
**Figura 18. Análisis morfológico de *Candida auris* y *Candida albicans* utilizando diferentes medios de cultivo a una temperatura de 25°C. a) Levaduras de *C. auris*. b y c) células con fenotipo agregativo de *C. auris*. d) levaduras de *C. albicans*. e y f) Tubo germinal de *C. albicans*.**

Por otra parte, a una temperatura de 37°C, *C. auris* nuevamente presenta el fenotipo agregativo utilizando suero humano, y en los medios YPD y YPD suplementado con NaCl se notó un mejor desarrollo en comparación a la temperatura de 25°C, sin la formación de pseudohifas (Figura 19).

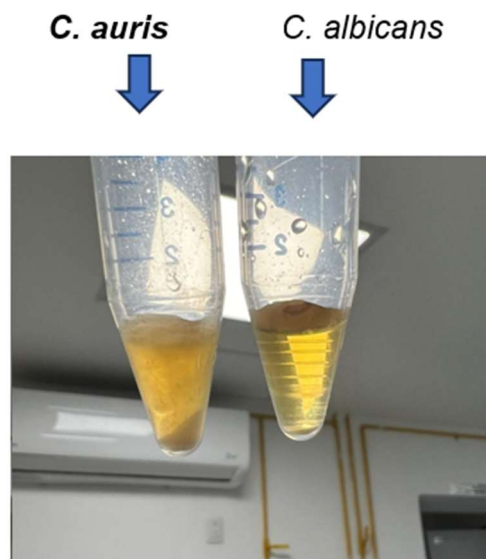


**Figura 19. Análisis morfológico de *Candida auris* y *Candida albicans* utilizando diferentes medios de cultivo a 37°C. a) Células unicelulares de *C. auris*. b y c) Células con fenotipo agregativo de *C. auris*. d) levaduras de *C. albicans*. e y f) Tubo germinal y pseudohifas de *C. albicans*.**

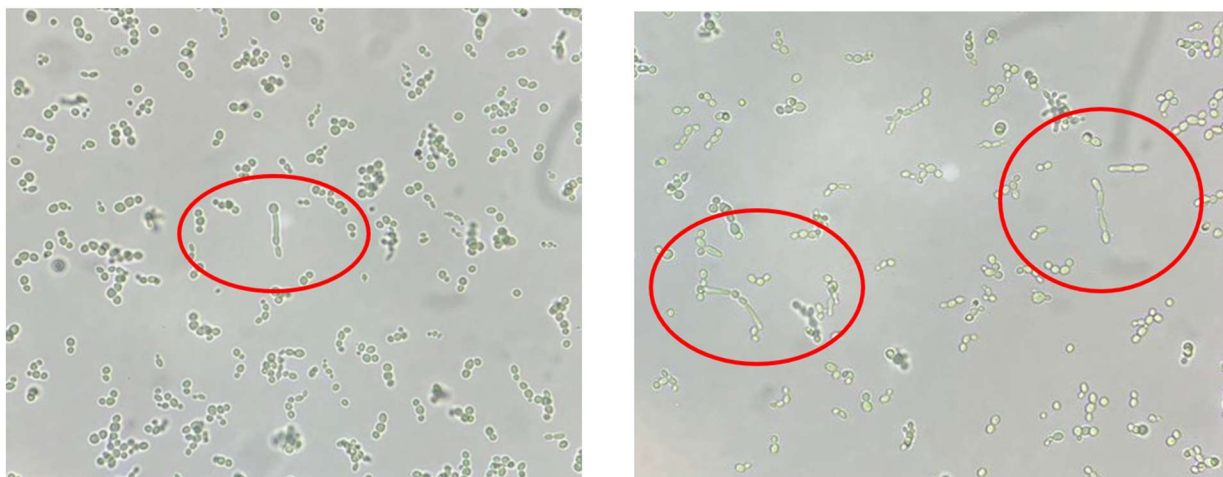
Finalmente, cuando fue incubada a una temperatura de 42°C, en suero humano continuó presentando el fenotipo agregativo y en los medios YPD y YPD suplementado con 10% de NaCl se comenzó a observar la formación de pseudohifas (Figura 20 y 22). En el tubo con el medio YPD más 10% de NaCl la masa celular fue abundante en comparación con *C. albicans*, donde fue limitado el desarrollo (Figura 21).



**Figura 20. Análisis morfológico de *Candida auris* y *Candida albicans* utilizando diferentes medios de cultivo a 42°C.** a) Células unicelulares de *C. auris*. b) Pseudohifas de *C. auris* cuando fue incubada en medio YPD suplementado con NaCl 10% a 42°C. c) Células agregadas de *C. auris*. d) Células levaduriformes de *C. albicans*. e) Células levaduriformes de *C. albicans*. f) Pseudohifas de *C. albicans*.



**Figura 21. Cultivo de *C. auris* y *C. albicans* en medio YPD suplementado con 10% de NaCl a 42° C.** Se observa una abundante masa celular en el aislado de *C. auris* y en *C. albicans* se nota un escaso desarrollo cuando fue incubada durante 48 horas.



**Figura 22. Formación de pseudohifas básicas de *C. auris*.** Pseudohifas producidas por *C. auris* (círculo rojo) cuando fue incubada en medio YPD suplementado con NaCl 10% a una temperatura de 42°C durante 48 horas.

#### 7.4. Formación de biopelículas

De los tres aislados de *C. auris* analizados mediante el método semicuantitativo en microplaca de poliestireno, todas fueron capaces de formar biopelículas y lo hicieron como “poco formadoras” (Figura 23). Con el método cualitativo utilizando el agar SBD suplementado con rojo Congo, ninguna de las tres cepas formó colonias rojas, indicando que no producen exopolisacáridos (Figura 24).

**Tabla 8. Densidades ópticas obtenidas en la determinación de biopelículas por el método semicuantitativo para cepas de *C. auris*.**

	DOc (control negativo)	DO (densidad óptica)			
		<i>Candida albicans</i>	<i>Candida auris</i> (cepa tipo)	<i>Candida auris</i> (orina)	<i>Candida auris</i> (sangre)
1	0.192	0.298	0.192	0.171	0.196
2	0.155	0.323	0.219	0.197	0.181
3	0.167	0.301	0.153	0.194	0.187
<b>Promedio</b>	<b>0.171</b>	<b>0.307</b>	<b>0.188</b>	<b>0.187</b>	<b>0.188</b>

**DO:** 0.171

**2xDOc:** 0.343

**4xDOc:** 0.685

Tabla 9. Capacidad de formación de biopelículas de tres cepas de *C. auris* por el método semicuantitativo.

		<i>Candida albicans</i>	<i>Candida auris</i> (cepa tipo)	<i>Candida auris</i> (orina)	<i>Candida auris</i> (sangre)
No formadoras	$DO \leq DOc$	0.307 < 0.171	0.188 < 0.171	0.187 < 0.171	0.188 < 0.171
Poco formadoras	$DOc < DO \leq 2xDOc$	0.171 < 0.307 < 0.343	0.171 < 0.188 < 0.343	0.171 < 0.187 < 0.343	0.171 < 0.188 < 0.343
Formadoras moderadas	$2xDOc < DO \leq 4xDOc$	0.343 < 0.307 < 0.685	0.343 < 0.188 < 0.685	0.343 < 0.187 < 0.685	0.343 < 0.188 < 0.685
Formadoras fuertemente	$4xDOc < DO$	0.685 < 0.307	0.685 < 0.188	0.685 < 0.187	0.685 < 0.188

Criterios para la clasificación de producción de biopelículas de acuerdo con Stepanovic *et al.*: no formadoras  $DO \leq DOc$ , poco formadoras  $DOc < DO \leq 2xDOc$ , formadoras moderadas  $2xDOc < DO \leq 4xDOc$  y formadoras fuertemente  $4xDOc < DO$ .

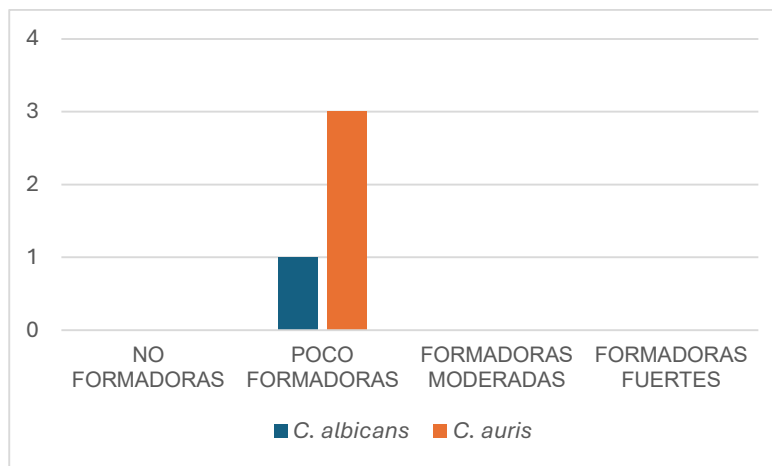


Figura 23. Formación de biopelículas en *C. auris* y ATCC de *C. albicans*.

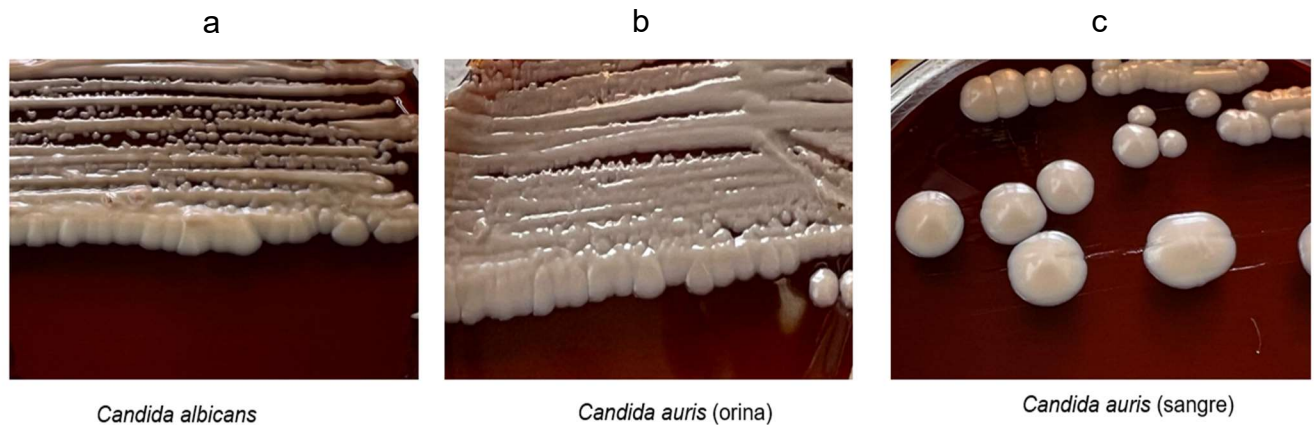
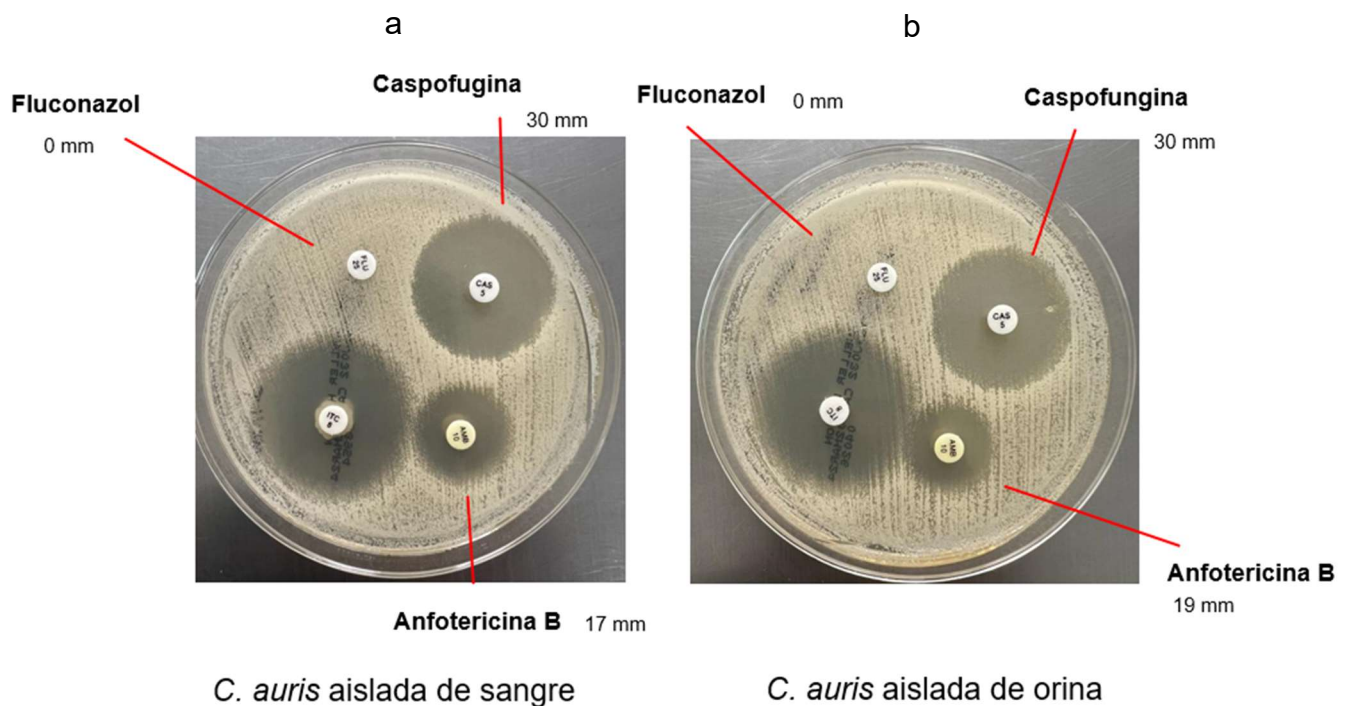


Figura 24. Prueba cualitativa para la determinación de biopelículas. a) Prueba negativa para formación de biopelículas en *C. albicans*. b y c) Colonias blancas de *C. auris* indicando que no hubo absorción del colorante y producción de exopolisacáridos considerándose prueba negativa para formación de biopelículas.

### 7.5. Determinación del perfil de susceptibilidad a antifúngicos

Se realizó el perfil de resistencia a antifúngicos a las cepas de *C. auris* y se evaluó la susceptibilidad a 3 antifúngicos. Limitándonos a determinar el tamaño en milímetros del halo de inhibición que presentaron los aislados sin poder interpretar el resultado, debido a que actualmente no existen puntos de corte para *C. auris* en las guías CLSI y EUCAST. Los antifúngicos utilizados fueron: fluconazol e itraconazol (azoles), caspofungina (equinocandina) y anfotericina B (polieno).



**Figura 25. Susceptibilidad a antifúngicos en *C. auris*.** a) Perfil de susceptibilidad a antifúngicos en cepa de *C. auris* aislada de hemocultivo b) Perfil de susceptibilidad a antifúngicos en cepa de *C. auris* aislada de muestra de orina.

Se determinó *in vitro*, que en las 3 cepas de *C. auris* hubo inhibición del crecimiento utilizando caspofungina, medianamente utilizando anfotericina B y no hubo inhibición con fluconazol (Figura 25 y 26).

Tabla 10. Perfil de susceptibilidad a antifúngicos en las cepas de *C. auris* por el método de Kirby-Bauer.

	Cepa tipo <i>C. auris</i> CA1	Cepa CA2	Cepa CA3
<b>Fluconazol</b>	0 mm	0 mm	0 mm
<b>Caspofungina</b>	29 mm	30 mm	30 mm
<b>Anfotericina</b>	17 mm	17 mm	19 mm
<b>Itraconazol</b>	28 mm	27 mm	28 mm

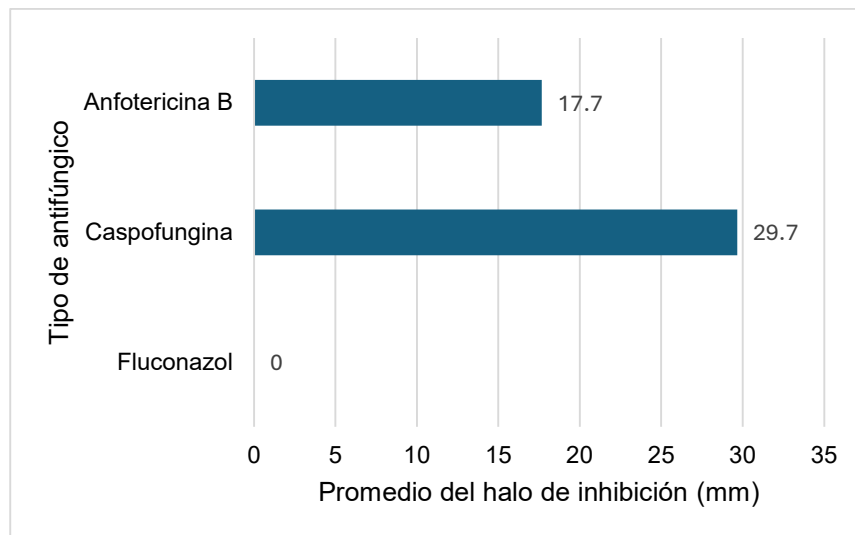


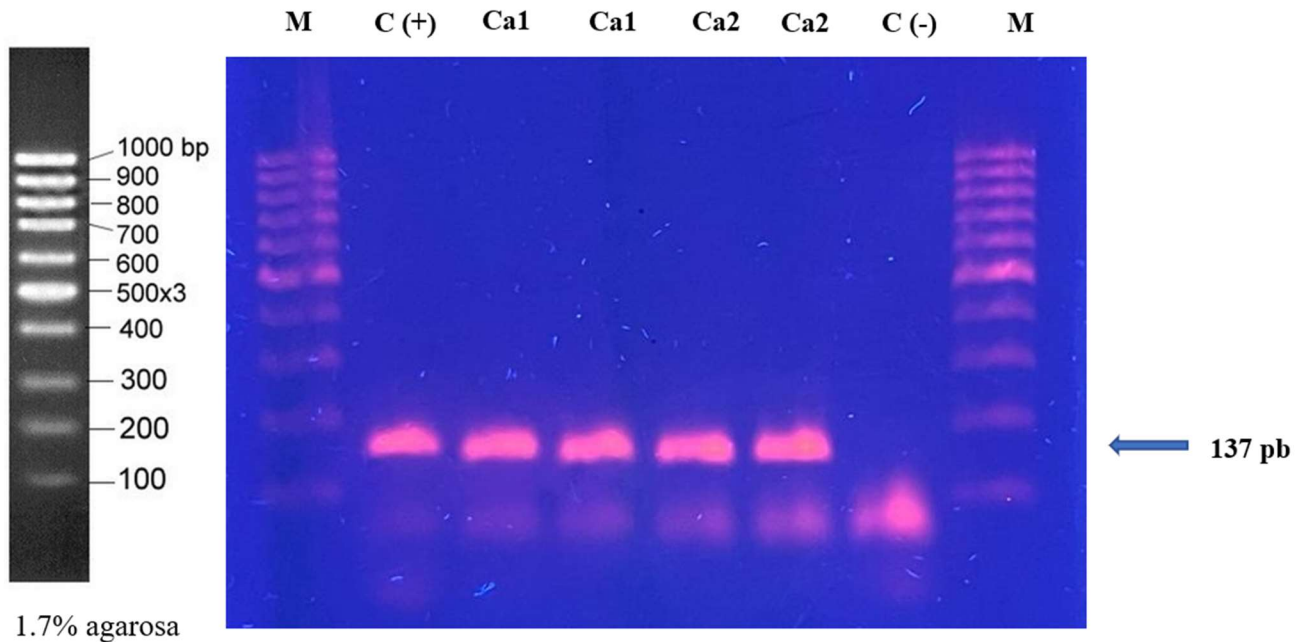
Figura 26. Promedio de los halos de inhibición en los aislamientos de *C. auris*. Se utilizaron los antifúngicos fluconazol, caspofungina y anfotericina B.

Determinando una mayor efectividad *in vitro* cuando se utilizó el grupo de antifúngicos equinocandinas, y una actividad de inhibición nula usando fluconazol. Observamos que también hubo inhibición utilizando itraconazol; sin embargo, no se consideró en la interpretación debido a que este antifúngico no está indicando como tratamiento de primera elección para candidiasis invasiva.

### 7.6. Detección por PCR

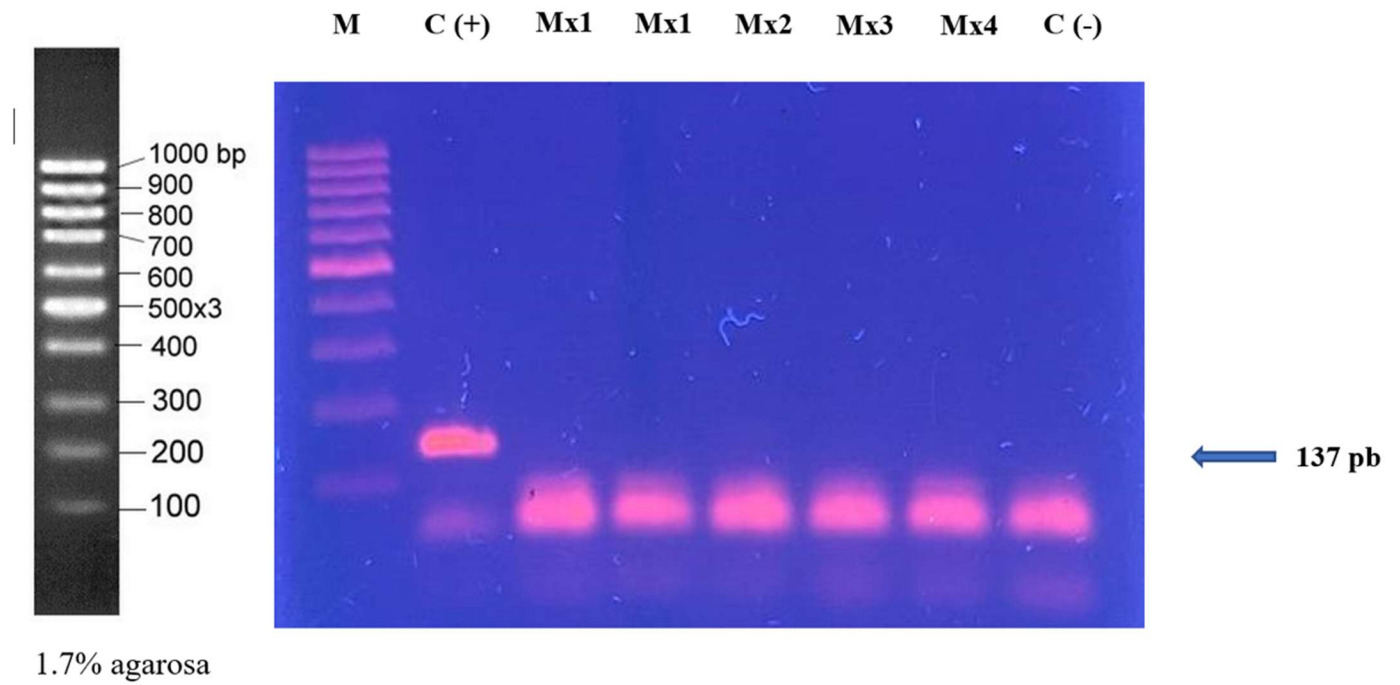
Se amplificó el gen que codifica para la proteína de membrana plasmática anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) especie específica QG37\_3410 para la detección por PCR

especie específica de aislamientos de *C. auris*. Inicialmente utilizando los oligonucleótidos con las cepas CA1, CA2 y CA3 de *C. auris* y como control negativo una cepa ATCC de *C. albicans*. Se obtuvo del producto de PCR un amplicón de 137 pb en las 3 cepas de *C. auris*, y en *C. albicans* no hubo amplificado (Figura 27).



**Figura 27. Confirmación molecular de *C. auris*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los resultados de PCR especie específica. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb; Carril 2: cepa de *C. auris* control positivo; Carril 3 y 4: cepa CA2; Carril 5 y 6: cepa CA3 y Carril 7: cepa ATCC de *C. albicans* y Carril 8: marcador de peso molecular.

Se realizó la amplificación del gen QG37\_3410 que codifica para una proteína GPI especie específica en *C. auris* mediante PCR especie específica a las 8 cepas que consideramos como casos sospechosos para *C. auris*, sin embargo, en ninguna de las cepas se observó el amplicón esperado, por lo que no son *C. auris* (Figura 28). Para este segundo gel, se ocupó como control positivo una cepa de *C. auris* y para el control negativo se utilizó la cepa ATCC de *C. albicans*.



**Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7%.** Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb; Carril 2: control positivo *C. auris*; Carril 3 y 4: Mx1; Carril 5: Mx2; Carril 6: Mx3; Carril 7: Mx4 y Carril 8: control negativo ATCC *C. albicans*.

## 8) DISCUSIÓN

*Candida auris* es una especie de levadura que actualmente representa una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial, siendo capaz de causar infecciones invasivas asociadas a una alta tasa de mortalidad (Sikora *et al.*, 2023). Esta nueva especie fue descrita por primera vez en 2009, y desde entonces ha sido aislada y reportada en más de 35 países a nivel mundial a excepción de la Antártida. Actualmente esta especie se asocia con el entorno hospitalario y ha sido encontrada en diversas superficies hospitalarias donde puede sobrevivir durante periodos prolongados (Sabino *et al.*, 2020).

Se desconocen las razones de la aparición simultánea de cinco clados a nivel global, planteándose diversas hipótesis, mencionando que fue debido a un aumento en el uso indiscriminado de antifúngicos, asociado a los cambios ambientales que se están presentando recientemente o que exista algún reservorio natural o animal aún no identificado. En estudios epidemiológicos iniciales de los reportes de *C. auris*, se encontró que varios de los pacientes que desarrollaron una enfermedad infecciosa por *C. auris* habían estado recibiendo terapia con antifúngicos en el momento en que esta especie fue aislada, sugiriendo dicho hallazgo, que la presión selectiva ejercida por los antifúngicos pueden haber resultado en la aparición de esta nueva especie de *Candida* no-*albicans* (Forsberg *et al.*, 2019).

Recientemente estamos observando esa emergencia de especies de *Candida* spp las cuales se han convertido en una de las principales causas comunes de infecciones por hongos a nivel hospitalario, siendo aun *Candida albicans* la más frecuente (Jiménez-Guerra *et al.*, 2018; Sobel, 2006). Existen especies de *Candida* que se encuentran de forma comensal en el hospedero humano y otras han surgido como patógenos emergentes. El desarrollo de candidemia en pacientes hospitalizados cada vez es más frecuente, principalmente en aquellos pacientes que se encuentran en las unidades de cuidados intensivos o con algún proceso de inmunosupresión, ya que la patogenicidad de estos microorganismos se ve influenciada por el estado inmune o la enfermedad de base del hospedero (Richards *et al.*, 2000).

Dentro de los factores de riesgo que favorecen al desarrollo de candidemia, se encuentran: pacientes en estado crítico, estancia hospitalaria prolongada, uso de

sonda urinaria, tratamiento con antibióticos de amplio espectro, uso de catéter venoso central, comorbilidades, HIV/SIDA o que el paciente haya sido sometido a algún procedimiento quirúrgico (Álvarez-Lerma *et al.*, 2003). En estos casos, los clínicos optan por dar tratamiento con antifúngico como medida profiláctica, siendo el fluconazol el fármaco de elección (Maldonado *et al.*, 2016).

En este proyecto se analizaron 112 muestras clínicas de pacientes, tomadas en diversos centros hospitalarios en la ciudad de Puebla, las cuales fueron seleccionadas por cumplir con los siguientes criterios: pacientes con probable diagnóstico de candidemia, hospederos con factores de riesgo, que tuvieran una terapia con antibióticos de amplio espectro, estancia prolongada en la unidad hospitalaria o aquellas muestras con aislamientos previos de *Candida* spp y que no hayan sido identificadas por métodos fenotípicos convencionales.

Del total de las muestras estudiadas, se obtuvieron 28 resultados negativos por cultivo y 84 positivos con aislamientos de diversos microorganismos, dentro de los cuales, en una gran proporción de las muestras se presentó desarrollo de más de un microorganismo, notando que muchas de las enfermedades infecciosas a nivel hospitalario, sobre todo en muestras pulmonares o de tejido blando son de origen polimicrobiano. En las muestras analizadas positivas por cultivo, obtuvimos que el microorganismo con mayor frecuencia de aislamiento fue *C. albicans*, seguido de otras especies de *Candida* no-*albicans*, incluso por encima de aislamientos bacterianos. En diversos estudios, mencionan los factores de riesgo principales para que el hospedero humano desarrolle candidemia, teniendo ligera predilección por el sexo femenino y con pacientes en un rango de edad superior a los 65 años (Álvarez-Lerma *et al.*, 2003). En nuestro trabajo, realizado en un periodo de enero 2023 a mayo 2024, obtuvimos una media de edad de 58.5 años, y ligeramente mayor predilección por el sexo femenino con un 56% de la población contra un 44 % de sexo masculino. Por lo que podríamos considerar al sexo del hospedero como un factor de riesgo en nuestra población para el desarrollo de infección por *C. auris*.

Para este trabajo, analizamos muestras obtenidas de distintos sitios anatómicos de las cuales había una alta sospecha de enfermedad infecciosa, teniendo una mayor frecuencia en muestras de vías respiratorias bajas tomadas por lavado

broncoalveolar, biopsias de diferentes tejidos que tenían como antecedente una lesión normalmente con secreción purulenta, así como en muestras de orina y material metálico “prótesis”. Un estudio encontró que la candiduria puede aparecer de forma tardía posterior a la segunda semana de estancia en la unidad hospitalaria y solo del 1-8% de los pacientes con diagnóstico de candiduria, pueden desarrollar candidemia, con un mayor riesgo aquellos que se encuentran en estado crítico. (Álvarez-Lerma *et al.*, 2003; Bougnoux *et al.*, 2008).

De las 84 muestras positivas por cultivo, en 50 se aislaron distintas especies de *Candida*, con un 50% correspondiente a *Candida albicans*, siendo esta especie aun la más frecuente, seguido de un 16% de *Candida* spp, 10% de *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*, 8% *Candida glabrata*, 4% *Candida krusei*, 2% *Candida utilis* y 0 % de *Candida auris*. Observamos una gran presencia de *Candida* spp en las muestras analizadas, considerando que el 95.5% de los pacientes se encontraban hospitalizados, se cree que una gran cantidad de los pacientes estaba bajo tratamiento con antibióticos, lo que pudo haber favorecido la colonización e infección por *Candida* tras verse afectada la carga de microbiota bacteriana del hospedero. Distintas especies de *Candida* son comensales, pero pueden llegar a ser patógenos e invadir distintos sitios anatómicos, su morfología levaduriforme se asocia a la diseminación mientras que la fase de pseudohifas está involucrada con el proceso de adhesión, invasión y actividad proteolítica (Writeway *et al.*, 2007).

Determinamos el perfil de resistencia a antifúngicos y evaluamos la susceptibilidad de las cepas de *Candida* spp que fueron aisladas de las muestras, tomando como referencia los puntos de corte de susceptibilidad de la guía CLSI M27M44S-ED3:2022, considerando que solo *Candida krusei* (*P. kudriavzevii*) presenta IR a fluconazol. Observamos que cada vez incrementa la emergencia de cepas de *Candida* no-albicans con resistencia a antifúngicos, sobre todo en aquellos que están indicados como tratamiento para candidiasis invasivas o candidemia. El fluconazol es el principal antifúngico utilizado como tratamiento para las infecciones por *Candida* tanto en adultos como en pediátricos, debido a su elevada biodisponibilidad siendo superior al 90% (Bougnoux *et al.*, 2008). En este trabajo, solo *C. albicans* presento el mayor porcentaje de susceptibilidad a azoles y equinocandinas con un: 88%

susceptibilidad al fluconazol, 84% voriconazol, 92% caspofungina y 84% a micafungina en un total de 25 aislamientos. En un total de 4 cepas de *C. glabrata*, se obtuvo un resultado alarmante debido a que un 25% de los aislamientos presento resistencia a caspofungina y micafungina, 25% intermedio a caspofungina y solo el 50% de las cepas fueron susceptibles a estos antifúngicos considerando que CLSI recomienda el uso de estos fármacos como tratamiento de elección para infecciones causadas por esta especie. En cuanto a las otras especies encontradas, presentaron buenos porcentajes de susceptibilidad utilizando azoles y equinocandinas.

A los 50 aislamientos de *Candida* spp, se les realizo una identificación previa utilizando el sistema semiautomatizado Vitek2 compact, pudiendo llegar a género y especie en 42 cepas y 8 no pudieron ser identificadas, considerándolas como casos sospechosos a *C. auris*, debido a que cumplían con la definición de caso probable de infección por *C. auris* emitido por la CONAVE en México en septiembre de 2021, el cual cita que toda persona con una infección invasiva y donde se aislen levaduras, principalmente del género *Candida*, acorde a los siguientes criterios: levaduras identificadas erróneamente como *Candida haemulonii*, *Candida sake*, *Candida duobushaemolonii*, *Candida intermedia*, *Candida catenulata*, *Saccharomyces kluyveri*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis* por métodos fenotípicos o presenten colonias rosas o moradas en CHORMagar *Candida* o resistencia a fluconazol  $\geq 8$  mg/mL deben ser descartados mediante el uso de técnicas moleculares confirmatorias debido a que los sistemas como Vitek2 aun no son capaces de identificar con precisión a *C. auris* debido a una estrecha relación filogenética con el complejo *C. haemulonii*.

Al no obtener aislamientos de *C. auris* a partir de las muestras clínicas, pero si 8 casos sospechosos, continuamos con la caracterización fenotípica y detección molecular de estas 8 cepas sospechosas y 3 cepas de *C. auris* pertenecientes al clado III (Sudáfrica) aisladas de muestras de orina y sangre. La identificación de *C. auris* aun presenta un desafío en los laboratorios de microbiología clásica, frecuentemente es identificada de manera errónea. Cuando la identificación se hace mediante métodos

bioquímicos o automatizados, *C. auris* puede llegar a ser identificada como otras especies del género *Candida*.

Para comenzar la caracterización fenotípica de las cepas de *C. auris*, realizamos un análisis morfológico de *C. auris*, cuando es cultivada en diferentes medios de cultivo. La morfología colonial que presentó *C. auris* cuando se usó agar sangre de carnero y agar dextrosa Sabouraud fue de colonias cremosas, suaves de color blanco-amarillento, en tinción de Gram observamos células levaduriformes ovaladas y algunas en estado de gemación. En CHROMagar *Candida* Plus, se observó un fenotipo de colonias color azul con halo azul apreciable al reverso de la placa, siendo este último, un buen método para sospechar de un caso de infección por esta especie. En cuanto a la morfología microscópica, observamos células relativamente más redondas y pequeñas en comparación con los otros dos medios utilizados. Destacando de este análisis, que no se observaron pseudohifas. Diversas especies de *Candida* presentan múltiples formas celulares. En *Candida albicans*, estos cambios estructurales reversibles se asocian con la virulencia del hongo, de forma similar *C. auris*, expresa diversas morfologías celulares y coloniales en las que se incluyen la forma levaduriforme, filamentosa, fenotipo agregativo o alargada (Xu *et al.*, 2023). Estos cambios o plasticidad morfológica representan una estrategia importante que utilizan algunos hongos para poder adaptarse a distintos entornos (Fan *et al.*, 2021). Otra prueba realizada en este trabajo para la caracterización fenotípica de los aislados de *C. auris*, fue la inducción de tubo germinal también conocida como filamentación en suero, considerada una prueba sencilla y rápida para la identificación preliminar del complejo *C. albicans* (Morales *et al.*, 2023). Los resultados de esta prueba fueron negativos en el 100% de las cepas de *C. auris* como era lo esperado.

Diversos investigadores han demostrado que *C. auris* es incapaz de formar tubo germinal, clamidoconidios, clamidosporas y pseudohifas en condiciones estándar, no obstante, Borman *et al.*, 2016 y Sherry *et al.*, 2017, descubrieron la formación de pseudohifas rudimentarias en *C. auris* bajo ciertas condiciones específicas como altas temperaturas o una concentración incrementada de NaCl superior al 10% (Borman *et al.*, 2016; Sherry *et al.*, 2017). Por lo tanto, la ausencia de tubos germinativos,

clamidoconidios y clamidosporas en cepas de *Candida* que crecen a temperaturas de 42°C, podría ser sugestivo a pensar que se trate de *C. auris* (Osei, 2018).

Los aislamientos de *Candida auris* se sometieron a un análisis morfológico cuando fueron incubadas en diferentes medios de cultivo y distintas temperaturas. En este análisis se determinó que *C. auris* presenta dos morfologías celulares: células con fenotipo agregativo y no agregativo principalmente cuando se utilizó suero humano, algunos autores han demostrado que las células agregantes no se podían separar por acción mecánica utilizando vórtex o mediante la acción de tratamientos químicos, sugiriendo que esta agregación no se debe a la floculación o formación de biopelículas, sino a la incapacidad de separación de las células hijas después de la gemación (Ben-Ami *et al.*, 2017; Borman *et al.*, 2015; Sherry *et al.*, 2017). Estos mismos autores determinaron mediante estudios de infección en modelos por *G. mellonella*, que las células no agregadas son más virulentas y patógenas que las agregadas (Ben-Ami *et al.*, 2017).

En este mismo análisis fenotípico, pusimos de manifiesto la adaptación de *C. auris* a diferentes entornos ambientales. La mayoría de los hongos no pueden sobrevivir a temperaturas corporales humanas, por ende, no pueden colonizar y causar la enfermedad infecciosa, sin embargo, se ha observado que *Candida auris* puede crecer a temperaturas incluso superiores a los 40°C. Otra característica particular de *C. auris* es su osmotolerancia para soportar concentraciones de NaCl superiores al 10% en comparación con otras especies de *Candida* (Du *et al.*, 2020). En este trabajo observamos que las cepas de *C. auris* formaron estructuras similares a pseudohifas cuando los incubamos en medio YPD suplementado con 10% NaCl y a una temperatura de 42°C, algunas investigaciones sugieren que este cambio morfológico puede ser debido a su adaptación a condiciones estresantes. Estas dos características son únicas en esta especie y podrían contribuir a explicar su persistencia y supervivencia en diferentes superficies como dispositivos médicos durante tiempos prolongados (Welsh *et al.*, 2017).

La persistencia en condiciones ambientales adversas es una característica distintiva de *C. auris* que la distingue de la mayoría de los demás patógenos fúngicos humanos.

También evaluamos el fenotipo colonial de *C. auris* utilizando el medio CHROMagar *Candida* Plus. En el 100% de los aislados de *C. auris* observamos colonias color azul claro con halo azul visible al reverso de la placa, los resultados obtenidos fueron consistentes con lo que reporta la literatura. Utilizamos un único tiempo de incubación de 48 horas a una temperatura de 37°. El uso de CHROMagar *Candida* Plus puede llegar a ser una opción bastante útil para una identificación visual sugestivo a casos sospechosos de *C. auris*, sin embargo, algunos investigadores mencionan que este método puede tener una baja sensibilidad para *C. auris* cuando se trabaja una muestra primaria para cultivo que contenga una microbiota abundante, particularmente si existen otras levaduras en una alta cantidad (Bentz *et al.*, 2018). Estas características fenotípicas específicas como la ausencia de pseudohifas y la morfología colonial en CHROMagar *Candida* Plus contribuyen a diferenciar a *C. auris* de otras especies y podrían ser una estrategia para su diagnóstico temprano en los hospitales.

En caso de obtener un caso sospechoso para *Candida auris*, este siempre debe confirmarse por un método de identificación molecular como secuenciación, espectrometría de masas o detección por PCR especie específica la cual tiene una ventaja frente a los otros dos métodos debido a que es una técnica más rápida, accesible y económica que puede ser implementada por los laboratorios de microbiología clínica.

*Candida auris* presenta una transmisión nosocomial de forma descontrolada, siendo esto una señal alarmante, debido a que esta especie tiene rasgos únicos que pudieran estar involucrados en la rápida propagación a nivel hospitalario. Igual que otras especies, *C. auris* puede formar biopelículas, siendo este, un mecanismo involucrado en la capacidad de colonizar la piel, vivir en el ambiente hospitalario, resistencia a antifúngicos y causar una enfermedad infecciosa invasiva (Horton, 2020).

En este trabajo realizamos la determinación de formación de biopelículas, mediante la cuantificación de la biomasa producida, encontrándose que las 3 cepas de *C. auris* fueron débil formadores de biopelícula de acuerdo con la clasificación de Stepanovic *et al.* en 2007. En un estudio realizado por Larkin *et al.* en 2017, determinaron que 15

aislamientos de *Candida auris*, mostraron resultados consistentes a la formación de biopelículas, revelándose que las biopelículas formadas por *C. auris* son significativamente más delgadas a las de *C. albicans*, y tienen una cantidad limitada de matriz extracelular (Larkin *et al.*, 2017). Este método de análisis utilizando cristal violeta tiñe las células metabólicamente activas e inactivas de las biopelículas, considerándose una de las pruebas más recomendables y apropiadas para dicha determinación acorde con lo que mencionan Moreno *et al.* (Moreno *et al.*, 2020). También utilizamos un método cualitativo empleando medio SBD suplementado con colorante rojo Congo, que tiene como fundamento la discriminación de colonias de color rojo-negro en aquellos aislados capaces de producir exopolisacáridos y colonias blancas-amarillentas en aislamientos no formadores de esta matriz de acuerdo con lo especificado por Bravo *et al.* en 2005 adaptando este método para hongos. Se obtuvo por este método cualitativo que el 100% de los aislados fueron considerados como no formadores de biopelículas, al obtener colonias color blancas sin algún cambio en su tonalidad. Considerando a este método como poco efectivo para evaluar la formación de biopelículas en aislamientos de *C. auris*, ya que, ante un resultado negativo, la cepa debe ser analizada por el método de microplaca.

Uno de los factores más importantes, motivo por el cual *C. auris* representa una grave amenaza a la salud pública a nivel mundial, es su resistencia a múltiples fármacos antifúngicos utilizados rutinariamente, generando infecciones graves y altas tasas de mortalidad (Larkin *et al.*, 2017). Es indispensable que a cualquier caso confirmado de *C. auris*, se le realice el perfil de susceptibilidad a antifúngicos. Utilizamos para este trabajo, al menos un antifúngico de cada grupo y evaluamos el comportamiento de las cepas de *C. auris*. Las 3 cepas analizadas fueron resistentes al fluconazol, siendo importante este hallazgo debido a que este antifúngico es el más utilizado en la práctica clínica porque es el que tiene 90% de biodisponibilidad. Usando caspofungina, encontramos en las cepas analizadas, una susceptibilidad similar a lo reportado por otros investigadores, quienes informaron que *C. auris* generalmente es resistente a los azoles, pero susceptible a equinocandinas. También obtuvimos en nuestros resultados que la anfotericina B tiene menor actividad de inhibición en las

cepas de *C. auris*, en comparación con las equinocandinas, obteniendo resultados consistentes con lo que reporta la CDC, mencionando que los aislamientos de *C. auris* presentan en un 90% resistencia al fluconazol, 30% resistencia a los polienos y aproximadamente un 5% de resistencia a las equinocandinas. Actualmente las guías internacionales como el CLSI M27M44S-ED3:2022 no proporciona puntos de corte para concentración mínima inhibitoria en azoles y equinocandinas para esta especie de *Candida*, solamente indica el uso de rezafungina, siendo esta una equinocandina de nueva generación que aún no se encuentra disponible para su uso (Morales *et al.*, 2017). Esto limita el tratamiento y genera que la elección del antifúngico sea de forma empírica. Estos resultados, son considerados críticos, siendo necesarias más investigaciones acerca de nuevas moléculas que tengan un efecto inhibitor sobre aislamientos de *C. auris* y puedan ser utilizadas como tratamiento ante infecciones invasivas por esta especie, además conocer más sobre los mecanismos propuestos de resistencia a antifúngicos.

*Candida auris* representa una amenaza para la salud pública a nivel mundial y es de suma importancia que el diagnóstico sea rápido y preciso; sin embargo, esta especie es frecuentemente identificada de forma errónea mediante métodos fenotípicos convencionales, optando por los métodos moleculares como el estándar de oro para la confirmación de los casos sospechosos. Por ello, en este trabajo usamos un ensayo de PCR para la detección molecular de *C. auris*, utilizando oligonucleótidos específicos para un gen único que codifica para una proteína GPI especie específica de *C. auris*. La especificidad de estos oligonucleótidos fue verificada anteriormente por Ruiz-Gaitán *et al.*, Siendo esta PCR bastante útil para la identificación de *C. auris*. Inicialmente utilizamos los tres aislados de *C. auris* para corroborar la identidad de estas, obteniendo un producto de amplificación de 137 pb, coincidiendo con lo reportado por Ruiz-Gaitán *et al.* Así mismo, mediante este método, se confirmó que las ocho cepas sospechosas que aislamos de las muestras clínicas no son *C. auris* ya que no amplificaron el gen, pese a que el comportamiento fenotípico en CHROMagar de algunas de ellas fue bastante similar a lo reportado para *C. auris*. Este método molecular podría sugerirse e implementarse como parte de los

protocolos de identificación y diagnóstico preciso de *C. auris* a nivel hospitalario, sobre todo en aquellos países o regiones con menor acceso al uso de tecnologías avanzadas y costosas.

Otro aspecto importante a considerar a nivel hospitalario, es la capacitación constante por parte del personal de laboratorio, para realizar una mejora sobre los métodos de diagnóstico e identificación de hongos, en caso de no contar con el equipo necesario, saber cuándo sospechar de un caso de *C. auris* y remitir las cepas aisladas a un laboratorio estatal para la identificación oportuna, además de realizar un seguimiento oportuno constante de las infecciones por *Candida* spp., especialmente de *C. auris*, para así detectar o prevenir posibles brotes de manera oportuna.

En resumen, *Candida auris* es una especie emergente de levadura con resistencia a distintos antifúngicos. Con este proyecto, se caracterizó el comportamiento fenotípico de *Candida auris* comparándola con otras especies de *Candida*, realizamos la estandarización de algunas pruebas que pueden llegar a ser útiles como cribado ante casos sospechosos y finalmente utilizamos una PCR especie específica como prueba confirmatoria. Esta información es importante transmitirla para tomar las medidas adecuadas ante un caso sospechoso de *C. auris* y poder prevenir su propagación en los hospitales además de agilizar el diagnóstico por laboratorio.

## 9) CONCLUSIONES

- ✓ No se logró aislar a *Candida auris* de pacientes críticos en centros hospitalarios privados de la ciudad de Puebla.
- ✓ *C. auris* presenta cambios en su morfología cuando es cultivada en diferentes medios de cultivo.
- ✓ No tiene la capacidad de formar tubos germinales inducidos con SH a 37°C.
- ✓ El uso de CHROMagar® *Candida* Plus es un buen método para poder sospechar de *C. auris*.
- ✓ Cuando *C. auris* se incuba en condiciones de estrés (temperatura de 42°C y concentración de NaCl al 10%), se induce la formación de pseudohifas.
- ✓ Es termotolerante y halófila.
- ✓ Puede llegar a presentar un fenotipo agregativo.
- ✓ Es capaz de formar biopelículas.
- ✓ *C. auris* clado III presenta resistencia al fluconazol, medianamente resistente a la anfotericina B y susceptible a caspofungina.
- ✓ No es posible la identificación de *C. auris* mediante métodos fenotípicos convencionales o semiautomatizados, requiere su confirmación mediante el uso de técnicas moleculares.

## **10)PERSPECTIVAS**

- Con la información obtenida implementar métodos de diagnóstico más eficientes, oportunos y de fácil acceso para los laboratorios de rutina.
- El estudio y evaluación de nuevas opciones terapéuticas para reducir su toxicidad en pacientes en estado crítico, pues suelen ser los más susceptibles a contraer este tipo de enfermedades infecciosas fúngicas invasivas.
- Planear una estrategia para prevenir su propagación en los hospitales y encontrar su reservorio ambiental, incluyendo la creación de protocolos de limpieza específicos y el monitoreo constante de reservorios potenciales a nivel hospitalario.
- Estudiar y conocer mejor su biofisiología.
- Estudiar los mecanismos propuestos de resistencia a antifúngicos.
- Hacer difusión y promoción de la información a los laboratorios y centros hospitalarios locales y estatales sobre esta nueva especie emergente, así como la creación de talleres, capacitaciones y materiales educativos específicos.

## 11) BIBLIOGRAFÍA

**Ahmad S, Alfouzan W.** (2021). *Candida auris*: Epidemiology, Diagnosis, Pathogenesis, Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities. *Microorganisms*. 9(4):807. doi: 10.3390/microorganisms9040807. PMID: 33920482; PMCID: PMC8069182.

**Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, León C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N, Bobillo F; EPCAN Study Group.** (2003). Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med*. (7):1069-76. doi: 10.1007/s00134-003-1807-y. Epub 2003 May 16. PMID: 12756441.

**Arendrup MC, Patterson TF.** (2017). *Candida* resistente a múltiples fármacos: epidemiología, mecanismos moleculares y tratamiento. *J. Infect. Dis.* 216, S445–S451. doi: 10.1093/infdis/jix131

**Ayala-Gaytán JJ, Montoya AM, Martínez-Resendez MF, Guajardo-Lara CE, de J Treviño-Rangel R, Salazar-Cavazos L, Llica-Díaz JM, González GM.** (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. doi: 10.1007/s15010-020-01525-1. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32960418.

**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. *Emerg Infect Dis*. 23(1):195–203. doi: 10.3201/eid2302.161486. PMID: 28098529; PMCID: PMC5324804.

**Bentz ML, Le N, Min B, Nunnally NS, Sullivan V, Tran M, Lockhart SR, Litvintseva A, Berkow EL, Sexton DJ.** (2024). Evaluation of CHROMagar *Candida* Plus for the detection of *C. auris* with a panel of 206 fungal isolates and 83 colonization screening skin-swabs. *Microbiol Spectr*. 12(4): e0356423. doi: 10.1128/spectrum.03564-23. Epub 2024 Feb 16. PMID: 38364098; PMCID: PMC10986463

**Bing J, Guan Z, Zheng T, Ennis CL, Nobile CJ, Chen C, Chu H, Huang G.** (2024). Rapid evolution of an adaptive multicellular morphology of *Candida auris* during systemic infection. *Nat Commun.* 15(1):2381. doi: 10.1038/s41467-024-46786-8. PMID: 38493178; PMCID: PMC10944540.

**Borman AM, Szekely A, Johnson EM.** (2018). Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. *mSphere.* (4): e00189-16. doi: 10.1128/mSphere.00189-16. PMID: 27547827; PMCID: PMC4990711.

**Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon JY; CandiRea Study Group.** Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med.* 34(2):292-9. doi: 10.1007/s00134-007-0865-y. Epub 2007 Oct 2. PMID: 17909746.

**Bravo Fariñas L, Salazar Noblet D, Arce MA, García H, Ramírez M, Cabrera LE, et al.** (2005). Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de animales domésticos y afectivos. *REDVET Rev Electrónica Vet.* VI (10):1-12. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63617978021>

**Cadnum JL, Shaikh AA, Piedrahita CT, Sankar T, Jencson AL, Larkin EL, Ghannoum MA, Donskey CJ.** (2017). Effectiveness of Disinfectants Against *Candida auris* and Other *Candida* Species. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 38(10):1240-1243. doi: 10.1017/ice.2017.162. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28793937.

**Casadevall A, Kontoyiannis DP, Robert V.** (2019). On the Emergence of *Candida auris*: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds. *mBio.* 10(4):e01397-19. doi: 10.1128/mBio.01397-19. PMID: 31337723; PMCID: PMC6650554.

**Cázares-Núñez, C., Araiza, J., Arellano, I., & Bonifaz, A.** (2021). Alerta epidemiológica: infección por *Candida auris* Epidemiological alert: infection due to *Candida auris*. *Dermatol Rev Mex*, 61(6), 533-536.

**Chaabane F, Graf A, Jequier L, Coste AT.** (2019). Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Front Microbiol*. 10:2788. doi: 10.3389/fmicb.2019.02788. PMID: 31849919; PMCID: PMC6896226.

**Chatterjee S, Alampalli SV, Nageshan RK, Chettiar ST, Joshi S, Tatu US.** (2015). Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics*. 16(1):686. doi: 10.1186/s12864-015-1863-z. PMID: 26346253; PMCID: PMC4562351.

**Chatterjee S, Alampalli SV, Nageshan RK, Chettiar ST, Joshi S, Tatu US.** (2015). Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics*. 16(1):686. doi: 10.1186/s12864-015-1863-z. PMID: 26346253; PMCID: PMC4562351.

**Chow NA, de Groot T, Badali H, Abastabar M, Chiller TM, Meis JF.** (2018). Potential Fifth Clade of *Candida auris*, Iran, 2018. *Emerg Infect Dis*. 25(9):1780-1781. doi: 10.3201/eid2509.190686. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31310230; PMCID: PMC6711235.

**Chow NA, Muñoz JF, Gade L, Berkow EL, Li X, Welsh RM, Forsberg K, Lockhart SR, Adam R, Alanio A, Alastruey-Izquierdo A, Althawadi S, Araúz AB, Ben-Ami R, Bharat A, Calvo B, Desnos-Ollivier M, Escandón P, Gardam D, Gunturu R, Heath CH, Kurzai O, Martin R, Litvintseva AP, Cuomo CA.** (2020). Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. *mBio*. 11(2):e03364-19. doi: 10.1128/mBio.03364-19. PMID: 32345637; PMCID: PMC7188998.

**Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S, Tarai B, Singh A, Upadhyaya G, Upadhyay S, Yadav P, Singh PK, Khillan V, Sachdeva N,**

**Perlin DS, Meis JF.** (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. *J Antimicrob Chemother.* 73(4):891-899. doi: 10.1093/jac/dkx480. PMID: 29325167.

**Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, Agarwal K, Prakash A, Singh PK, Jain S, Kathuria S, Randhawa HS, Hagen F, Meis JF.** (2013). New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerg Infect Dis.* 19(10):1670-3. doi: 10.3201/eid1910.130393. PMID: 24048006; PMCID: PMC3810747.

**CLSI.** (2017). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.* 4th ed. CLSI standard M27. Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CLSI.** (2018). *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters.* 5th ed. CLSI guideline M23. Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CLSI.** (2018). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts.* 3rd ed. CLSI guideline M44. Clinical and Laboratory Standards Institute.

**Dominguez EG, Zarnowski R, Choy HL, Zhao M, Sanchez H, Nett JE, Andes DR.** (2019). Conserved Role for Biofilm Matrix Polysaccharides in *Candida auris* Drug Resistance. *mSphere.* 4(1):e00680-18. doi: 10.1128/mSphereDirect.00680-18. PMID: 30602527; PMCID: PMC6315084.

**Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G.** (2020). *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.* 16(10): e1008921. doi: 10.1371/journal.ppat.1008921. PMID: 33091071; PMCID: PMC7581363.

**Escandón P.** (2022). Novel Environmental Niches for *Candida auris*: Isolation from a Coastal Habitat in Colombia. *J Fungi (Basel).* 8(7):748. doi: 10.3390/jof8070748. PMID: 35887503; PMCID: PMC9320720.

**Espinosa-Texis AP, Lara-Ocotitla J, Santellán Olea MR, Valentín-Gomez E, Spezzia Mazzocco T.** (2024). Biofilm formation and antifungal sensitivity of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* E *Candida auris*. International Journal of Health Science ISSN 2764-0159. v. 4, n. 13. DOI <https://doi.org/10.22533/at.ed.1594132423017>

**Fan D, Coughlin LA, Neubauer MM, Kim J, Kim MS, Zhan X, Simms-Waldrip TR, Xie Y, Hooper LV, Koh AY.** (2015). Activation of HIF-1 $\alpha$  and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. Nat Med. 21(7):808-14. doi: 10.1038/nm.3871. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26053625; PMCID: PMC4496259.

**Fan S, Yue H, Zheng Q, Bing J, Tian S, Chen J, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G, Du H.** (2021). Filamentous growth is a general feature of *Candida auris* clinical isolates. Med Mycol. 59(7):734-740. doi: 10.1093/mmy/myaa116. PMID: 33485272; PMCID: PMC8257410.

**Forgács L, Borman AM, 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. Emerg Microbes Infect. 9(1):1160-1169. doi: 10.1080/22221751.2020.1771218. PMID: 32486923; PMCID: PMC7448943.

**Forsberg K, Woodworth K, Walters M, Berkow EL, Jackson B, Chiller T, Vallabhaneni S.** (2019). *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. Med Mycol. 57(1):1-12. doi: 10.1093/mmy/myy054. Erratum in: Med Mycol. 2019 Jun 1;57(4): e7. doi: 10.1093/mmy/myy156. PMID: 30085270.

**González-Durán E, Contreras-Pérez CU, Caceres DH, Ríos-Rosas C, Piñón-Ortega JJ, Téllez-Saucedo MD, Marín-Suro ES, Wong-Arámbula CE, Moreno-Escobar EA, Ramírez-González JE, Ramírez-Barríos JG, Montes-Colima NA, Lockhart SR, Martínez-Montiel N, Martínez-Contreras RD, García-Ruiz P, Salazar-Sánchez MI,**

**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. Arch Microbiol. 204(9):592. doi: 10.1007/s00203-022-03159-3. PMID: 36053373; PMCID: PMC9438372.

**Hernando-Ortiz A, Mateo E, Perez-Rodriguez A, de Groot PWJ, Quindós G, Eraso E.** (2021). Virulence of *Candida auris* from different clinical origins in *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* host models. Virulence. 12(1):1063-1075. doi: 10.1080/21505594.2021.1908765. PMID: 33843456; PMCID: PMC8043173.

**Hernando-Ortiz A, Mateo E, Perez-Rodriguez A, de Groot PWJ, Quindós G, Eraso E.** (2021). Virulence of *Candida auris* from different clinical origins in *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* host models. Virulence. 12(1):1063-1075. doi: 10.1080/21505594.2021.1908765. PMID: 33843456; PMCID: PMC8043173.

**Horton MV, Nett JE.** (2020). *Candida auris* infection and biofilm formation: going beyond the surface. Curr Clin Microbiol Rep. 7(3):51-56. doi: 10.1007/s40588-020-00143-7. Epub 2020 Jul 17. PMID: 33178552; PMCID: PMC7654955.

**Jackson BR, Chow N, Forsberg K, Litvintseva AP, Lockhart SR, Welsh R, Vallabhaneni S, Chiller T.** (2019). On the Origins of a Species: What Might Explain the Rise of *Candida auris*? J Fungi (Basel). 5(3):58. doi: 10.3390/jof5030058. PMID: 31284576; PMCID: PMC6787658.

**Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A; Candida auris Incident Management Team; Manuel R, Brown CS.** (2017). *Candida auris*: a Review of the Literature. Clin Microbiol Rev. 31(1):e00029-17. doi: 10.1128/CMR.00029-17. PMID: 29142078; PMCID: PMC5740969.

**Jiménez-Guerra G, Casanovas Moreno-Torres I, Gutiérrez-Soto M, Vazquez-Alonso F, Sorlózano-Puerto A, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J.** (2018). Candiduria en pacientes hospitalizados: etiología, sensibilidad a los fármacos antifúngicos y factores

de riesgo [Inpatient candiduria: etiology, susceptibility to antifungal drugs and risk factors]. Rev Esp Quimioter. 31(4):323-328. Spanish. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29927214; PMCID: PMC6172686.

**Kean R, Delaney C, Sherry L, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, Rautemaa-Richardson R, Williams C, Ramage G.** (2018). Transcriptome Assembly and Profiling of *Candida auris* Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance. mSphere. 3(4): e00334-18. doi: 10.1128/mSphere.00334-18. PMID: 29997121; PMCID: PMC6041501.

**Kean R, Ramage G.** (2019). Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*. mSphere. 4(4):e00458-19. doi: 10.1128/mSphere.00458-19. PMID: 31366705; PMCID: PMC6669339.

**Keighley C, Garnham K, Harch SAJ, Robertson M, Chaw K, Teng JC, Chen SC.** (2021). *Candida auris*: Diagnostic Challenges and Emerging Opportunities for the Clinical Microbiology Laboratory. Curr Fungal Infect Rep. 15(3):116-126. doi: 10.1007/s12281-021-00420-y. Epub 2021 Jun 23. PMID: 34178208; PMCID: PMC8220427.

**Kim SH, Iyer KR, Pardeshi L, Muñoz JF, Robbins N, Cuomo CA, Wong KH, Cowen LE.** (2019). Genetic Analysis of *Candida auris* Implicates Hsp90 in Morphogenesis and Azole Tolerance and Cdr1 in Azole Resistance. mBio. 10(1): e02529-18. doi: 10.1128/mBio.02529-18. Erratum in: mBio. 2019 Mar 19;10(2): PMID: 30696744; PMCID: PMC6355988.

**Kim SH, Iyer KR, Pardeshi L, Muñoz JF, Robbins N, Cuomo CA, Wong KH, Cowen LE.** (2019). Genetic Analysis of *Candida auris* Implicates Hsp90 in Morphogenesis and Azole Tolerance and Cdr1 in Azole Resistance. mBio. 10(1):e02529-18. doi: 10.1128/mBio.02529-18. Erratum in: mBio. 2019 Mar 19;10(2):e00346-19. doi: 10.1128/mBio.00346-19. PMID: 30696744; PMCID: PMC6355988.

**Ku TSN, Walraven CJ, Lee SA.** (2018). *Candida auris*: Disinfectants and Implications for Infection Control. *Front Microbiol.* 9:726. doi: 10.3389/fmicb.2018.00726. PMID: 29706945; PMCID: PMC5906573.

**Kullberg BJ, Arendrup MC.** (2015). Invasive Candidiasis. *N Engl J Med.* 2015 Oct 8;373(15):1445-56. doi: 10.1056/NEJMra1315399. PMID: 26444731.

**Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK, 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. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(5): e02396-16. doi: 10.1128/AAC.02396-16. PMID: 28223375; PMCID: PMC5404565.

**León C., Ruiz-Santana S., Saavedra P., et al.** (2006). A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*, 24(3): 730-737.

**Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, Colombo AL, Calvo B, Cuomo CA, Desjardins CA, Berkow EL, Castanheira M, Magobo RE, Jabeen K, Asghar RJ, Meis JF, Jackson B, Chiller T, Litvintseva AP.** (2017). Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis.* 64(2):134-140. doi: 10.1093/cid/ciw691. Epub 2016 Oct 20. Erratum in: *Clin Infect Dis.* 2018 Aug 31;67(6):987. doi: 10.1093/cid/ciy333. PMID: 27988485; PMCID: PMC5215215.

**Lockhart SR, Guarner J.** (2019). Emerging and reemerging fungal infections. *Semin Diagn Pathol.* 36(3):177-181. doi: 10.1053/j.semmp.2019.04.010. Epub 2019 Apr 17. PMID: 31010605.

**Maldonado I, Arechavala A, Guelfand L, Relloso S, Garbasz C; de la Red de Micología de la Ciudad de Buenos Aires.** (2016). Infecciones urinarias nosocomiales por levaduras. Estudio multicéntrico de 14 hospitales de la red de micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires [Yeast urinary tract infections. Multicentre study in 14 hospitals belonging to the Buenos Aires City Mycology Network]. *Rev Iberoam Micol.* 33(2):104-9. Spanish. doi: 10.1016/j.riam.2015.07.004. Epub 2016 Jan 23. PMID: 26810887.

**Martins IM, Cortés JC, Muñoz J, Moreno MB, Ramos M, Clemente-Ramos JA, Durán A, Ribas JC.** (2011). Differential activities of three families of specific beta(1,3)glucan synthase inhibitors in wild-type and resistant strains of fission yeast. *J Biol Chem.* 286(5):3484-96. doi: 10.1074/jbc.M110.174300. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21115488; PMCID: PMC3030354

**Mendoza<sup>1</sup>, Mireya.** (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15-23. Recuperado en 24 de septiembre de 2022.

**Morales-López S, Ustate K, Pedrozo Z, Torres Y.** (2023). Biochemical typing and evaluation of pathogenicity in vulvovaginal isolates of *Candida albicans* complex. *Biomedica.* 43(Sp. 1):194-205. English, Spanish. doi: 10.7705/biomedica.6861. PMID: 37721915; PMCID: PMC10588967.

**Morales-López SE, Parra-Giraldo CM, Ceballos-Garzón A, Martínez HP, Rodríguez GJ, Álvarez-Moreno CA, Rodríguez JY.** (2017). Invasive Infections with Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris*, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 23(1):162-164. doi: 10.3201/eid2301.161497. PMID: 27983941; PMCID: PMC5176232.

**Moreno X, Marcano E, Panizo M, Ferrara G.** (2020). Formación de biopelículas por *Candida parapsilosis* sensu estricto y su perfil de susceptibilidad en Venezuela. *Casmera.* 48 :1–7. doi: 10.5281/zenodo.3660110.

**Osei Sekyere J.** (2018). *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *Microbiologyopen*. (4):e00578. doi: 10.1002/mbo3.578. Epub 2018 Jan 18. Erratum in: *Microbiologyopen*. 8(8): e00901. doi: 10.1002/mbo3.901. PMID: 29345117; PMCID: PMC6079168.

**Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ.** (2018). Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. ;4:18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26. PMID: 29749387.

**Pharkjaksu S, Boonmee N, Mitrpant C, Ngamskulrungrroj P.** (2021). Immunopathogenesis of Emerging *Candida auris* and *Candida haemulonii* Strains. *J Fungi (Basel)*. 7(9):725. doi: 10.3390/jof7090725. PMID: 34575763; PMCID: PMC8469599.

**Rhodes J., Abdolrasouli A., Farrer RA, Cuomo CA, Aanensen DM, Armstrong-James D., et al.** (2018). Epidemiología genómica del brote en el Reino Unido del patógeno fúngico humano emergente *Candida auris*. *Emerg. Microbes Infect.* 7:43 10.1101/201343

**Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP.** (2000). Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 21(8):510-5. doi: 10.1086/501795. PMID: 10968716.

**Rivera-Toledo, Evelyn, Jiménez-Delgadillo, Alan Uriel, & Manzano-Gayosso, Patricia.** (2020). Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 63(2), 7-17. Epub 05 de marzo de 2021. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02>

**Rodrigues ML.** (2018). The Multifunctional Fungal Ergosterol. *mBio*. 9(5):e01755-18. doi: 10.1128/mBio.01755-18. PMID: 30228244; PMCID: PMC6143734.

**Rossato L, Colombo AL.** (2018). *Candida auris*: What Have We Learned About Its Mechanisms of Pathogenicity? *Front Microbiol.* 9:3081. doi: 10.3389/fmicb.2018.03081. PMID: 30631313; PMCID: PMC6315175.

**Ruiz-Gaitán AC, Fernández-Pereira J, Valentín E, Tormo-Mas MA, Eraso E, Pemán J, de Groot PWJ.** (2018). Molecular identification of *Candida auris* by PCR amplification of species-specific GPI protein-encoding genes. *Int J Med Microbiol.* 308(7):812-818. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.06.014. Epub 2018 Jul 8. PMID: 30025998.

**Sabino R, Veríssimo C, Pereira AA, Antunes F.** (2020). *Candida auris*, an Agent of Hospital-Associated Outbreaks: Which Challenging Issues Do We Need to Have in Mind? *Microorganisms.* 8(2):181. doi: 10.3390/microorganisms8020181. PMID: 32012865; PMCID: PMC7074697.

**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. *Microbiol Immunol.* 53(1):41-4. doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x. Erratum in: *Microbiol Immunol.* 2018 Mar;62(3):205. doi: 10.1111/1348-0421.12568. PMID: 19161556.

**Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, Ryan L, Shackleton J, Trimlett R, Meis JF, Armstrong-James D, Fisher MC.** (2016). First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control.* 5:35. doi: 10.1186/s13756-016-0132-5. PMID: 27777756; PMCID: PMC5069812.

**Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, Rautema-Richardson R.** (2017). Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis.* 23(2):328-331. doi: 10.3201/eid2302.161320. PMID: 28098553; PMCID: PMC5324806.

**Sikora A, Hashmi MF, Zahra F.** (2023) *Candida auris*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563297/>

**Sobel JD.** (2006). The emergence of non-albicans *Candida species* as causes of invasive candidiasis and candidemia. *Curr Infect Dis Rep.* 8(6):427-33. doi: 10.1007/s11908-006-0016-6. PMID: 17064635.

**Spivak ES, Hanson KE.** (2018). *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. *J Clin Microbiol.* 56(2):e01588-17. doi: 10.1128/JCM.01588-17. PMID: 29167291; PMCID: PMC5786713.

**Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GDI, Djukić S, Ćirković I, et al.** (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x PMID 17696944

**Vila T, Montelongo-Jauregui D, Ahmed H, Puthran T, Sultan AS, Jabra-Rizk MA.** (2020). Comparative Evaluations of the Pathogenesis of *Candida auris* Phenotypes and *Candida albicans* Using Clinically Relevant Murine Models of Infections. *mSphere.* 5(4):e00760-20. doi: 10.1128/mSphere.00760-20. PMID: 32759340; PMCID: PMC7407074.

**Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA.** (2020). *Candida auris*: a fungus with identity crisis. *Pathog Dis.* 78(4):ftaa034. doi: 10.1093/femspd/ftaa034. PMID: 32643757; PMCID: PMC7371155.

**Villanueva-Lozano H, Treviño-Rangel RJ, González GM, Ramírez-Elizondo MT, Lara-Medrano R, Aleman-Bocanegra MC, Guajardo-Lara CE, Gaona-Chávez N, Castilleja-Leal F, Torre-Amione G, Martínez-Reséndez MF.** (2021). Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. *Clin Microbiol Infect.* 27(5):813–6. doi:

10.1016/j.cmi.2020.12.030. Epub ahead of print. PMID: 33429028; PMCID: PMC7835657.

**Wang X, Bing J, Zheng Q, Zhang F, Liu J, Yue H, Tao L, Du H, Wang Y, Wang H, Huang G.** (2018). The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg Microbes Infect.* 7(1):93. doi: 10.1038/s41426-018-0095-0. PMID: 29777096; PMCID: PMC5959928.

**Wang X, Bing J, Zheng Q, Zhang F, Liu J, Yue H, Tao L, Du H, Wang Y, Wang H, Huang G.** (2018). The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg Microbes Infect.* 7(1):93. doi: 10.1038/s41426-018-0095-0. PMID: 29777096; PMCID: PMC5959928.

**Watkins RR, Gowen R, Lionakis MS, Ghannoum M.** (2022). Update on the Pathogenesis, Virulence, and Treatment of *Candida auris*. *Pathog Immun.* 7(2):46-65. doi: 10.20411/pai.v7i2.535. PMID: 36329818; PMCID: PMC9620957.

**Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, Litvintseva AP.** (2017). Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol.* 55(10):2996-3005. doi: 10.1128/JCM.00921-17. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28747370; PMCID: PMC5625385.

**Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, Litvintseva AP.** (2017). Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol.* 55(10):2996-3005. doi: 10.1128/JCM.00921-17. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28747370; PMCID: PMC5625385.

**Whiteway M, Bachewich C.** (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 61:529-53. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093341. PMID: 17506678; PMCID: PMC4452225

**Xu Z, Zhang L, Han R, Ding C, Shou H, Duan X, Zhang S.** (2023). A Candidemia Case Caused by a Novel Drug-Resistant *Candida auris* with the Y132F Mutation in Erg11 in Mainland China. *Infect Drug Resist.* 16:3065-3072. doi: 10.2147/IDR.S409708. PMID: 37222986; PMCID: PMC10202200.

**Xu Z, Zhang L, Han R, Ding C, Shou H, Duan X, Zhang S.** (2023). A Candidemia Case Caused by a Novel Drug-Resistant *Candida auris* with the Y132F Mutation in Erg11 in Mainland China. *Infect Drug Resist.* 16:3065-3072. doi: 10.2147/IDR.S409708. PMID: 37222986; PMCID: PMC10202200.

**Zhai B, Rolling T, Hohl TM.** (2021). Exploring *Candida auris* in its habitat. *Cell Host Microbe.* 29(2):150-151. doi: 10.1016/j.chom.2021.01.010. PMID: 33571440; PMCID: PMC9088162.

**Zuluaga-Rodríguez A.** (2020). *Candida auris*: estrategias y retos para prevenir un brote. *Biomédica.* 40(1):5-10. Spanish. PMID: 32220157; PMCID: PMC7357378.

## 12)ANEXOS

**Anexo 1. Tabla de medios de cultivo utilizados por tipo de muestra**

Tipo de muestra	Medios de cultivo							
	Agar sangre de carnero 5%	Agar MacConkey	Agar gelosa chocolate	Agar dextrosa Sabouraud pico de flauta	Agar dextrosa Sabouraud en placa	Agar feniletilalcohol	Caldo tioglicolato	Botella de hemocultivo anaerobio
Aspirado endotraqueal	X	X	X	X				
Biopsia de tejido	X	X		X		X	X	
Secreción de heridas e hisopados	X	X						
Lavado broncoalveolar	X	X	X	X				X
Hemocultivo								X
Catéter intravascular	X	X			X			
Líquido pleural				X				X
Piezas metálicas "prótesis" por sonicado	X	X		X		X		X
Expectoración	X	X	X	X				
Urocultivo chorro medio	X	X			X			
Urocultivo por sonda	X	X			X			
Abscesos o aspirados	X	X		X		X		X

**Anexo 2. Tabla de funcionalidad del CHROMagar *Candida* Plus de acuerdo con los procedimientos internos MCD LAB S.A. de C.V.**

Control microbiológico		Especificación		
Microorganismo		Crecimiento	Color de colonia	% de recuperación
<i>Candida albicans</i>	ATCC 60193	Bueno	Verde – azul	≥50%
<i>Candida auris</i>	CDC B11903	Bueno	Azul claro con halo azul, visible en el reverso de la placa	≥50%
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 1369	Bueno	Azul metálico con halo rosa	≥50%
<i>Candida krusei</i>	ATCC 14243	Bueno	Rosas y rizadas	≥50%
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001	Bueno	Malva	≥50%
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Inhibido	-	-

Condiciones de incubación: 48 horas a 30-37°C.