UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización genética mediante secuenciación de siguiente generación de *Candida auris* aislada de infecciones invasivas en Hospitales de Bogotá

Elizabeth Gutiérrez Vásquez

Universidad Nacional de Colombia

Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá, Colombia

2022

Caracterización genética mediante secuenciación de siguiente generación de *Candida auris* aislada de infecciones invasivas en Hospitales de Bogotá

Elizabeth Gutiérrez Vásquez

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Ciencias: Microbiología

Director:

María del Socorro Chalá Palacios B.Sc., MSc

Codirector:

Andrés Pinzón Velasco B.Sc., DrSc

Línea de Investigación:

Biología Molecular de Agentes Infecciosos

Grupo de Investigación:

Grupo de Laboratorios de Salud pública (SDS)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias-Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2022

La fuerza de todo, el amor

A mis padres, en primera instancia porque son mis Ángeles en esta tierra, son mi polo a tierra y son La composición de mis raíces, este logro es de mi familia, a la energía creadora que me dio la posibilidad de vivir cada día y seguir esforzándome por mis sueños, mi hermanito, Nicolás, que adoro con todo mi corazón y me Ayuda cada día a ser una mejor persona.

Declaración de obra original

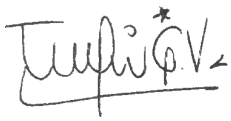
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



_____

Elizabeth Gutiérrez Vásquez

Fecha 19/10/2021

Agradecimientos

En el día a día de nuestra vida nos encontramos con personas, situaciones y decisiones que al conocerlas nos dejan una gran enseñanza y nos cambian la vida de una manera totalmente inexplicable, por ello, quiero agradecer desde el centro de mi corazón en primera instancia a la energía creadora por darme la oportunidad de estar aquí y seguir cumpliendo mis sueños, a mis padres Jesús Gutiérrez y María Vásquez por su apoyo y amor incondicional. A mi hermano Nicolás Gutiérrez, que me alegra los días y la vida con su existencia, a mi familia materna Vásquez Bello por todo su apoyo en cada momento.

A Sandra Liliana Gómez y María del Socorro Chála, profesionales de la Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, a quienes quiero agradecer eternamente por su confianza, calidez y responsabilidad en el proceso, a la Institución que me aporto lo necesario para culminar el trabajo.

Al profesor Andrés Pinzón de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo, responsabilidad y disposición a la hora de ayudarme en mi proceso.

A mi profesor, colega y amigo Diego Garzón por tener un corazón e inteligencia de la cual todos deberíamos aprender, por ayudarme siempre, enseñarme y estar siempre en esta linda labor de ser un maestro y una muy buena persona.

A mis compañeros que he conocido en el ámbito laboral e investigativo y que sin ellos no hubiese sido esto posible, Andrea Camargo, Paola Buitrago, Daniela Ortiz, Melissa Rodríguez, Andrés Moreno por sus enseñanzas, tiempo y disponibilidad a la hora de compartir sus conocimientos y experiencias que me han ayudado a construirme de manera profesional. A mi amiga y colega Laura Ricaurte por su apoyo, amistad y paciencia, que no solo he aprendido de ella en el ámbito laboral sino también en el personal.

A la Universidad Nacional de Colombia y a todos y cada uno de los profesores del Posgrado de Ciencias-Microbiología por el apoyo que le dan a cada estudiante, al Profesor Daniel Uribe, a la Profesora María Teresa Reguero y a la Profesora Martha Fontanilla por su dedicación, profesionalismo y tiempo que nos dan no solo como estudiantes si no como personas, a Jeisson por su gestión, disposición y responsabilidad en el proceso.

Resumen

Caracterización genética mediante secuenciación de siguiente generación de *Candida auris* aislada de infecciones invasivas en Hospitales de Bogotá

Candida auris es un hongo patógeno emergente y oportunista caracterizado por su difícil identificación con pruebas de diagnóstico convencionales, lo cual retrasa el tratamiento del paciente. Además, es común que éste patógeno presente resistencia a la primera línea de antimicóticos utilizados habitualmente en el tratamiento de infecciones por hongos (azoles, polienos y equinocandinas). Está resistencia ha sido asociada a mutaciones genómicas, las cuales también han sido encontradas en otras especies patógenas del género *Candida*. Por otro lado, la falta de información sobre su diversidad genética en la mayoría de aislamientos ha impedido estudiar a fondo el impacto de estas mutaciones y de la epidemiologia genómica de este microorganismo. En este estudio se buscó caracterizar aislamientos de *C. auris* enviados al laboratorio de salud pública de Bogotá como parte del programa de vigilancia epidemiológica. En un estudio descriptivo y de corte trasversal, 20 aislamientos obtenidos de hospitales de Bogotá fueron identificados como *C. auris* mediante técnicas fenotípicas y caracterizados molecularmente usando espectometría de masas maldiTOF y NGS (Secuenciación de Nueva Generación). La identificación de los 20 aislamientos se confirmó mediante análisis filogenéticos. La diversidad genética observada fue baja y sugirió la existencia del efecto de selección direccional o selección de fondo. Se identificaron cuatro genotipos por sus perfiles MLST que podrían optimizarse ya que no describeron la totalidad de la diversidad genética en los aislamientos bogotanos. Aunque no se encontraron mutaciones asociadas a resistencia, sí se encontraron duplicaciones en varios genes, incluyendo *adp1, pmi1, zwF1b* y se presentaron cambios de mutaciones parsimoniosas vps13, zwF1b, cdr1 y erg3. También se observaron sustitución de aminoácidos en algunos de estos genes: erg3 (H771R), erg11

(G459S) y rpn2 (K898E). Los análisis de diversidad genética y filogenéticos mostraron una baja diversidad genética en los 20 aislamientos bogotanos, todos estos agrupándose dentro del clado IV de Suramérica y presentando un número relativamente bajo de diferencias de SNP entre ellos, aunque lo suficientemente alto como para sugerir ausencia de clonalidad en estos aislamientos. Además, las desviaciones del modelo de neutralidad selectiva sugieren que la baja diversidad podría explicarse por un modelo de expansión de la población. A partir de estos hallazgos, se sugiere que *C. auris* ha tenido una trasmisión continua y generalizada en el territorio colombiano.

Palabras clave: *Candida auris*, resistencia antimicótica, diagnóstico erróneo, mutaciones.

Abstract

Genetic characterization by next generation sequencing of Candida auris isolated from invasive infections in Hospitals of Bogotá

Candida auris is an emerging, opportunistic and pathogenic fungus characterized by its difficult identification through conventional diagnostic tests, thus delaying the treatment of the patient. Furthermore, it is usual for this pathogen to be resistant to the antifungals of first line utilized commonly for treating fungal infections (azoles, polyenes and echinocandins). This resistance has been associated to genomic mutations, which have also been found in other pathogenic species of *Candida*. On the other hand, the lack of information about the genetic diversity in the great majority of isolates has hampered to deeply study the impact of this mutations and the genomic epidemiology of this pathogen. This study aimed at characterizing *C. auris* isolates sent to the public health laboratory of Bogotá as part of an epidemiological surveillance program. In this descriptive and cross-sectional study, 20 isolates obtained from hospitals in Bogotá were identified as C. auris through phenotypic techniques and molecularly characterized using MALDI-TOF mass spectrometry and NGS (Next Generation Sequencing). The identification of the 20 isolates was confirmed by phylogenetic analysis. The genetic diversity observed was low and suggested the presence of effects of directional selection or background selection. Four genotypes were identified using their MLST profiles, as though this technique could be optimized since these profiles did not describe the complete genetic diversity presented by Bogota isolates. Although resistance-associated mutations were not found, duplications were found in several genes, including adp1, pmi1, zwF1b, and parsimonious mutation changes vps13, zwF1b, cdr1, and erg3. Some of these genes also presented the following amino acid substitutions: erg3 (H771R), erg11 (G459S), and rpn2 (K898E). The genetic diversity and phylogenetic analyzes showed a low genetic diversity in the 20 Bogotá isolates, all of them grouped within the clade IV of South America and presenting a

relatively low number of SNP differences between them, although this number was high enough to suggest the absence of clonality in these isolates. Furthermore, the deviations from the model of selective neutrality suggest that a population expansion model could explain the low diversity. From these findings, it is suggested that *C. auris* has had a continuous and generalized transmission in the Colombian territory.

Keywords: *Candida auris,* antifungal resistance, misdiagnosis, mutations.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **XI**

Lista de figuras ..... **XVII**

Lista de tablas ..... **XIX**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XX**

Introducción **1**

1. Planteamiento del problema **5**

2. Justificación **9**

3. Pregunta de investigación **11**

4. Objetivos **1**
4. 1 Objetivo general 1
4.2 Objetivos específicos 1

5. Marco de referencia **3**
5.1 Microorganismo fúngico *Candida auris* 3
5.2 Características generales de *C. auris* 4
5.3 Identificación de aislamientos de *C. auris* por NGS y MALDI-TOF 7
5.4 Mecanismos de resistencia molecular antifúngica y factores de virulencia 10
5.4.1 Genes asociados a la virulencia 14
5.5 Epidemiología 16
5.6 Metabolismo 17
5.7 Genoma 18
5.8 Aspectos clínicos de la infección en personas 20
5.9 Prevención y control 21

1. Materiales y Métodos **23**
5.10 Tipo de investigación 23
5.11 Población de estudio 23
5.12 Aislamiento e identificación microbiológica 25
5.13 Extracción de ADN, secuenciación mediante NGS, análisis de las secuencias y análisis filogenético 25

5.14 Análisis de tipificación de secuencia de múltiple *locus* (MLST) 27
5.15 Evaluación de mecanismos moleculares asociados a resistencia antimicótica..... 27
5.16 Análisis de diversidad genética y estructura de la población de los aislamientos *C. auris* 28

2. Resultados 33
5.17 Identificación de los aislamientos de Bogotá por MALDI-TOF y VITEK-2..... 33
5.18 Identificación de los aislamientos de Bogotá por NGS, filtración de lecturas 35
5.19 Perfiles para la tipificación por MLST en *C. auris*..... 37
5.20 Mutaciones presentes en los genes de resistencia en los 20 aislamientos de *C. auris* 40
5.21 Diversidad genética de los aislamientos de *C. auris* en Bogotá 41
5.21.1 Diversidad genética de los aislamientos de *C. auris* del mundo 44

3. Discusión 55

4. Conclusiones y recomendaciones 62
Conclusiones 62

5. Anexos 64

6 Anexo 1: Datos de las 20 secuencias que llegaron de Illumina, Directo (R1) y Reverso (R2) por medio de un MultiQC 64

7 Anexo 1: Reporte deQuast de las 20 secuencias luego de su respectivo ensambjale en Spades 67

8 Anexo 1 Reporte de FastQC, en donde reportó las profundidades de las 20 secuencias 68

9 Anexo 1: Arboles filogenéticos 70

Bibliografía 77

Lista de figuras

Pág.
Figura 1. Características microcópicas de *Candida auris*. 6
Figura 2. Mecanismos de resistencia a antifúngicos. 103..... 14
Figura 3. Mapa de las localidades de Bogotá con la ubicación de los hospitales origen de las muestras. 24
Figura 4. Filogenia inferida usando la región del rRNA. La filogenia fue inferida usando un análisis bayesiano con el modelo Kimura 2-parameter+G. Los soportes de los grupos (valores en las ramas) fueron evaluados mediante *bootstrap* con 1000 réplicas. La rama del clado de *C. auris* se resalta en color naranja, visualizando un grupo monofilético junto con la cepa de referencia B844. 37
Figura 5. Filogenia inferida usando SNP identificados a lo largo del genoma de *C. auris*.39
Figura 6. Diferencias en el número de SNP entre las secuencias de los 20 aislamientos de Bogotá. 43
Figura 7. Matriz simétrica de valores F_{ST} pareados entre poblaciones. Colores más intensos representa menor diferenciación. Todos los valores fueron estadísticamente significativos (Anexo). 48
Figura 8. Árbol filogenético y análisis de componentes principales de los 281 aislamientos de *C. auris* del mundo. 51
Figura 9. Árbol filogenético y análisis de componentes principales de los aislamientos de *C. auris* del clado de Suramérica. 52

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Mapa de las localidades de Bogotá con la ubicación de los Hospitales origen de las muestras. 24
Tabla 2. Origen de las muestras y resultados de las pruebas de identificación. 34
Tabla 3. Matriz alélica de los 20 aislamientos de *C. auris* y de la cepa de referencia. 38
Tabla 4. Descripción de las mutaciones encontradas en los 20 aislamientos de Bogotá.... 41
Tabla 5. Estimadores de diversidad genética para los aislamientos de *C. auris*..... 43
Tabla 6. Estimadores de la diversidad genética en las poblaciones de secuencias de *C. auris*. 45
Tabla 7. Pruebas de neutralidad aplicadas en las (sub)poblaciones de *C. auris*..... 47
Tabla 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA). 48

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
pb	Pares de bases
h	Horas
°C	Grados centígrados
Y	Tirosina
F	Fenilalanina
T	Treonina
K	Lisina
R	Arginina
G	Glicina
E	Glutámico
S	Serina
Ss	Número de sitios segregantes
S	Número de sitios singleton
Ps	Número de sitios parsimoniosos informativos
π	Diversidad nucleotidica por sitio
Mb	Mega base
C	Citosina
U	Uracilo
G	Guanina
A	Adenina
T	Timina
H	Número de haplotipos

Abreviatura	Término
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (*Matrix-Assisted Desorption/Inonization and Time-of-Flight*)
VITEK-2	Tarjeta de identificación para levaduras
MEGA	Programa para análisis estadístico y evolución molecular
MUSCLE	Servidor en línea para realizar alineamientos
LSP	Laboratorio de Salud Pública
SDS	Agente desnaturalizante
INS	Instituto Nacional de Salud
UCI	Cuidados Intensivos

NGS	Secuenciación de nueva generación
DC	Distrito Cápital
loci	El plural de locus es "loci".
CDC	Centro de Control y la Prevención de Enfermedades
OMS	Organización Mundial de la Salud
SDA	Sabouraud
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
API 200 AUXI	Sistema de idetificacicón de levaduras
UV-C	Descontaminación de luz ultravioleta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)
ARN	Ácido ribunocleico *(ribonucleic acid)*
ADN	Ácido desoxirribunucleico
AFLP	Polimorfismo de longitud fragmento amplificado *(Amplified Fragment Length Polymorphism)*
PFGE	Técnica de la electroforesis en campo pulsado *(Pulsed Field Gel Electrophoresis)*
Hog 1	Gen implicado en la regulación del estrés en *Candida auris*
ITS	El espaciador transcrito interno *(Internal transcribed spacer)*
MDR1	Proteína de resistencia a múltiples fármacos 1
ERG	Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1
ATP	Adenosin Trifosfato *(adenosine triphosphate)*
MFS	Proteina transportadora de sustrato general *(general substrate transporter)*
CDR1	Proteina asociado a la suceptibilidad del triazol para *Candida albicans y Candida auris (Protein associated with triazole susceptibility)*
MDR1	Proteina asociado a la resistencia a múltiples fármacos para *Candida albicans y Candida auris (multidrug resitence protein)*
FKS	Proteina 1,3-beta-d-sintetasa glucano
MADS	Familia de factores de transcripción basada en la similitud de las secuencias de sus genes *(Family of transcription factors based on the similarity of the sequences of their gen*es)
STE	Serina/enzima treonina)
MAT	Proteina asociado al apariamiento sexual en *Candida auris*
NCBI	*National Center for Biothecnology information*
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple (*Single Nucleotide Polymorphism)*
FUR 1	Gen de uracilfosforribosiltransferasa *(gen uracil phosphoribosyltransferase)*
H202	Peróxido de hidrógeno
IFF4	Proteina de la pared celular *(cell wall protein)*
CSA1	Proteina de la pared celular *(cell wall protein)*
PGA	Proteina de la pared celular *(cell wall protein)*
GPI	Glicosilfosfatidilinosito
RDC	Implicados en la formacuión de biopeliculas
SNQ2	Implicados en la formacuión de biopeliculas
YHD3	Implicados en la formacuión de biopeliculas
CE	Comisión de enzimas

ABC	Transportadores dependientes de ATP *(ATP-binding cassette)*
MFS	Transportadores de la Superfamilia de facilitadores principales *(Major Facilitator Superfamily)*
TAC1B	Gen que codifica el factor de transcripción del grupo de zinc y esta asociado a la resistencia al fluconazol en *Candida auris (resistence of fluconazol)*
HYR3	Implicados en la formacuión de biofilm maduro *(GPI-anchored protein)*
ALS	Implicados en la formacuión de biofilm maduro *(family protein putative)*
STE12	Familia de proteínas del factor de transcripción fúngica
AmB	Anfotericina
SRR	Salón de la Recuperación y el Reciclaje
AMOVA	Análisis de varianza molecular
MLST	Tipificación Multilocus de Secuencias *(Multi-locus Sequence Typing)*
adp1	Putative ATP-dependent permease
gln	Glutamine-tRNA ligase
icl	Isicutrate lyase 1
pdh1	Pyruvate dehydeogenase complex putative
rpn2	Proteosome regulatory particle base subnit
zwF1b	Glusos-6-phosphate dehydeogenase, partial
vps13	Membrane morphigenesis protein
FCT/FSC	Indices de fijación
d.f	Grados de libertad
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

Introducción

La candidiasis es la infección provocada por un tipo de hongo conocido como *Candida* que puede llegar afectar a distintas partes del cuerpo humano, como piel y mucosas. Un tipo de candidiasis se denomina candidiasis invasiva, en la que se ve implicada la invasión del torrente sanguíneo (fungemia asociada a la atención en salud), el líquido cefalorraquídeo y los órganos internos. Estas infecciones pueden ser causadas por diferentes especies de *Candida*, entre estas, *Candida auris*, la infección por este último microorganismo suele ser muy similar a las infecciones causadas por otras especies de *Candida* o por otros hongos [1]. *C. auris* es una levadura perteneciente al grupo de los *Ascomicetos*, que fue reportada por primera vez en 2009 de un aislamiento de canal auditivo de una mujer japonesa de 70 años en Tokio [2].

Datos en la última década señalan que los patógenos fúngicos oportunistas, particularmente las especies de *Candida*, son los hongos más frecuentes y representan más de 400.000 casos de infecciones del torrente sanguíneo cada año, convirtiéndose en la tercera causa más común de infecciones fúngicas invasivas en todo el mundo. Es de resaltar que 66% de los casos asociados a candidemia son causados por *C. auris* [6]. Desde su primer reporte, y especialmente en el año 2016, *C. auris* es la causa de brotes en entornos hospitalarios y en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Los reportes de casos de candidiasis por *C. auris* abarcan desde niños de un año de edad que se encuentran con cateterismo central o linfohistiocitosis hemofagocítica, hasta personas adultas de 70 años en adelante [3]. Estos casos de enfermedad por *C. auris* son además preocupantes debido a la resistencia que presenta a múltiples fármacos antimicóticos usados comúnmente, tal como los grupos de los azoles, equinocandinas y poliones entre otros [4].

Otro factor relacionado con la importancia de este microrganismo, es la compleja identificación con métodos de laboratorio clínico convencionales, debido a que no es totalmente efectiva, haciendo así necesario el uso de tecnologías específicas. Varios investigadores han centrado sus esfuerzos en diferentes enfoques genómicos [7][5] que pueden facilitar su identificación de forma molecular y dar un diagnóstico preciso. Sin embargo, uno de los mayores obstáculos para el desarrollo de un diagnóstico rápido y asertivo es la carencia de la anotación funcional de genes de *C. auris* y su importancia, lo que impide llegar a generar análisis filogenéticos que pueden ayudar a la identificación de microorganismos fúngicos difíciles de tipificar con las herramientas convencionales de identificación [6].

Por otro lado, es importante saber con exactitud cuáles genes están implicados en la resistencia a múltiples fármacos, tal como se ha realizado en otras partes del mundo, por ejemplo en la India [7, 8]. Se ha estudiado sobre la resistencia, virulencia y los genes implicados, pero aún siguen existiendo vacíos por la falta de información de aislamientos de distintos lugares geográficos, los cuales tienden a diferenciarse según su proveniencia y al mismo tiempo tener características genéticas particulares, aun siendo aislamientos de *C. auris* [9]. En el ámbito de la identificación fenotípica, los laboratorios de microbiología utilizan normalmente la identificación convencional como por ejemplo la prueba micromorfológica en agar harina de maíz con 1% de Tween (harina de maíz) y en agar cromogénico para levaduras (CHROMagarTM *Candida*). También se utilizan pruebas para asimilación de azucares y pruebas bioquímicas [10], las cuales, aunque son confiables para identificar las especies más frecuentes y usuales de *Candida* en muestras clínicas, presentan baja eficacia cuando se trata de especies de *Candida* poco comunes o crípticas, entre estas *C. auris.* Esto ha llevado al uso de tecnologías para confirmación como MALDI-TOF MS Burker [11] [12] [13] y Vitek 2, las cuales son actualmente utilizadas en algunos laboratorios de instituciones pertenecientes a la red Distrital de Bogotá. La implementación de técnicas moleculares [12] como la secuenciación de nueva generación (NGS) [14, 15] junto con análisis filogenéticos puede contribuir a desarrollar métodos asequibles basados en las características específicas del genoma de *C. auris*.

Por ser un microorganismo multirresistente de difícil identificación y por su asociación a brotes es importante profundizar en la caracterización de nuevos genes de *C. auris* que puedan ser usados para la identificación molecular con técnicas estándar [3,4], Por esto, es necesario llevar a cabo estudios de caracterización molecular de aislamientos clínicos de este microorganismo que se encuentra circulando en las instituciones de salud para así obtener información que permita tanto abordar la resistencia hacia algunos antimicóticos como entender la mejor forma de identificación en el laboratorio clínico. Esto permitirá ayudar a encontrar las herramientas adecuadas para controlar los brotes debido a las infecciones asociadas a la atención en salud [1]. Considerando lo anterior, este estudio busca caracterizar mediante secuenciación de siguiente generación aislamientos de *C. auris* obtenidos de infecciones invasivas en la red de hospitales del laboratorio de Salud Pública de Bogotá, durante el período comprendido entre los años 2018 y 2019.

Para profundizar en el conocimiento de las infecciones de *Candida* en Bogotá, 20 aislamientos de *C. auris* obtenidos de distintas localidades de esta ciudad entre los años 2018 y 2019 fueron identificados mediante secuenciación de genoma completo usando NGS. La diversidad genética de estos aislamientos en comparación con aislamientos previos de Colombia y del mundo, genes candidatos para la identificación de *Candida auris* por MLST y mutaciones asociadas a resistencia a antimicóticos son analizadas en este estudio.

1. Planteamiento del problema

La candidiasis es un problema de salud pública que en la última década ha causado brotes asociados a la atención en salud, infecciones invasivas y fungemia en más de 30 países en los cinco continentes [16]. Los pacientes afectados van desde recién nacidos hasta ancianos o pacientes con enfermedades que son factor de riesgo, y su errónea identificación tiene un papel importante en la mortalidad de estos pacientes [17].

Se han reportado infecciones por *Candida auris* en Japón [2], Corea del Sur [3] [18], India [5, 7], Pakistán [9], Sudáfrica [9, 19], Kuwait [20] Venezuela [21], Irán [22] y Colombia [23]. Estos reportes describen pacientes con candidemia y con otras enfermedades invasivas o colonización. En Colombia se han realizado estudios en donde hacen una aproximación a la posible trasmisión y resistencias moleculares para anfotericina B de aislamientos de *C. auris*. Por otro lado, los casos de infección por *C. auris* en el torrente sanguíneo en Colombia se asociaron con casi a un 60% de muertes por todas las causas en hospital y un 43% de mortalidad a los 30 días [24, 25]; sin embargo, en Bogotá no hay estudios que incluyan la caracterización de *C. auris*.

Muchas especies patógenas dentro del clado de *Candida*, como *Candida albicans* y *Candida glabrata*, se han estudiado ampliamente a nivel del genoma, mientras que los hongos patógenos emergentes *C. auris* y *Candida haemulonii* permanecen sin explorar. Las características básicas del genoma de *C. auris* se pusieron a disposición recientemente [26]. En el Instituto Nacional de Salud (INS) en el último año se publicó un estudio en donde realizan la identificación de aislamientos de *C. auris* recuperados por laboratorios

en Colombia en donde evaluaron diferentes sistemas de identificación para dar un buen diagnóstico; en ese estudio encontraron que existe una estrecha relación filogenética entre *C. auris* y *C. haemulonii*. Por tal razón, se le identifica muchas veces como esta especie de *Candida*, lo que conlleva a las deficiencias de los sistemas comerciales para la identificación de *C. auris* sugiriendo que deben ser complementados con otros sistemas como MALDI-TOF o pruebas moleculares [27].

En los últimos años, las pruebas de diagnóstico VITEK 2 que es una tarjeta de identificacicón, incluyeron en sus bases de datos a *C. auris*, junto con otros tres taxones (*C. haemulonii var, vulnera, C. doubushaemulonii* y *Cryptococcus gatti*) (versión 8.01) [28]. En Colombia, esta información se pudo implementar para la identificación desde el 2018, cuyos resultados arrojaron 29,3% (77/263 aislamientos identificados con VITEK 7.01) y 77,4% (195/252 aislamientos identificados con VITEK 8.01) de identificaciones correctas. Como se puede observar, la última versión arrojó un mayor porcentaje de identificaciones acertadas, lo cual implica que la capacidad de discriminar entre *C. auris* y otras especies de *Candida* estrechamente relacionadas sigue siendo un reto debido a falta de información adecuada en estas base de datos [29].

Lo anterior pone de manifiesto que es indispensable tener información sobre la caracterización de nuevos aislamientos de *C. auris*. Los ensamblajes del genoma de *C. auris* disponibles hasta el momento (disponibles en GenBank) están altamente fragmentados o anotados de manera inconsistente y no proporcionan una representación completa de todos los clados de este microorganismo [5]. Esto conlleva a implementar nuevas estrategias bioinformáticas, utilizando aislamientos de diferentes zonas donde se presentan y reportan casos de candidemia por este microrganismo fúngico [1] [30]. De esta manera se podría generar información que lleve a nuevas técnicas moleculares para dar un diagnóstico preciso y así atenuar y evitar la muerte de los pacientes infectados. Por otro lado, el estudio genómico puede aportar detalles sobre los genes relacionados con la resistencia a diferentes fármacos utilizados eventualmente en hospitales de Bogotá [31].

Sin embargo, las limitaciones actuales en relación con los subregistros, la identificación inadecuada por falta de caracterización o conocimiento de la anotación funcional de su genoma, así como la asociación de estos detalles según la proveniencia del aislamiento podrían sumarse a la dificultad de controlar los brotes [32].

Los factores antes mencionados han conllevado a que las medidas preventivas sean mínimas. Por eso la importancia de implementar el conocimiento de genomas y caracterización de *loci* para obtener más información, facilitando la identificación y tratamientos adecuados basados en información sobre resistencia a fármacos [33]. Para esto a nivel mundial, se han estudiado genomas obtenidos de algunos aislamientos de distintos lugares geográficos, los cuales han brindado información valiosa sobre los genes relacionados con la virulencia o resistencia a fármacos [9]. Sin embargo, la variabilidad propia de estos microorganismos actualmente no es muy clara; soló en aislamientos de la India se reportó baja diversidad genética [5, 34] dificultando el diseño adecuado para la óptima identificación, ya que los genes conocidos no son suficientes para solucionar el problema. Esto también reduce la eficiencia de la identificación, e impacta el tratamiento del paciente por ser resistente a antimicóticos, además del control de la persistencia en lugares como hospitales en la UCI [7, 12, 35]. Considerando esto, es fundamental estudiar e incluir nuevas caracterizaciones cuyos aislamientos puedan proporcionar información sobre la relación genética de los casos de *C. auris* provenientes de Bogotá.

2. Justificación

La candidiasis sigue siendo una infección emergente e importante. En los últimos años, la fungemia por *Candida auris* se asocia con una alta tasa de mortalidad (66%), tanto por la falla terapéutica por su identificación errónea como por la resistencia antimicótica. La prevalencia de brotes en varios países, incluidos los que se han presentado en Chile recientemente, demuestran que en América Latina han incrementado los casos [36, 37].

Por otro lado, en Colombia ha habido casos de brotes asociados a *C. auris* en las ciudades de Santa Marta, Barranquilla, Cartagena, Bogotá y en la región Norte de Colombia. Los aislamientos recuperados en Barranquilla fueron confirmados por el Centro de Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta [38]. Por tal razón, es importante conocer más sobre aislamientos provenientes de Bogotá debido a que no existe información puntual sobre aislamientos recolectados en esta área geográfica del país en donde se efectué un análisis genómico. Una de las estrategias en donde falta implementar más estudios, es en el conocimiento de nuevos genes que pueden estar implicados en la resistencia a múltiples fármacos o metabolismo, de esta manera aportar e innovar en nuevas estrategias con bases sólidas.

La identificación con ensayos fenotípicos convencionales [39] puede llegar a ser difícil por falta de información de genoma completo de *C. auris*, lo cual se constituye en un factor limitante del control de su diseminación. A pesar de la baja diversidad genética reportada para aislamientos de lugares específicos del mundo (como India) [34], las comparaciones con aislamientos de otros lugares diferentes han permitido identificar cambios puntuales en su genoma. Esto hace evidente la importancia de obtener información de genomas

completos de diferentes lugares geográficos de este microorganismo para la correcta identificación, una eficiente prescripción terapéutica y por consiguiente una exitosa resolución de los brotes [40].

Es esencial comprender los genes y las vías o mecanismos moleculares que le confieren al patógeno la capacidad de resistencia a múltiples fármacos mediante la secuenciación del genoma completo. La característica de *C. auris* de un genoma altamente divergente comparado con las otras especies de *Candida* patógenas y el hecho de que gran parte de su genoma no está completamente caracterizado [41] ha evitado el avance en el entendimiento de los posibles genes asociados a su agresividad como patógeno [28].

3. Pregunta de investigación

¿Cuáles son las características genómicas de los aislamientos de *Candida auris* obtenidos de la red de hospitales del laboratorio de Salud Pública de Bogotá, recolectados durante el período comprendido entre los años 2018 y 2019?

4. Objetivos

4. 1 Objetivo general

Caracterizar mediante secuenciación de siguiente generación aislamientos de *Candida auris* obtenidos de infecciones invasivas en la red de hospitales del laboratorio de Salud Pública de Bogotá, recolectados durante el período comprendido entre los años 2018 y 2019.

4.2 Objetivos específicos

1. Establecer la especie de los aislamientos del género *Candida* obtenidos de la red de hospitales del laboratorio de Salud Pública de Bogotá mediante Secuenciación de Nueva Generación NGS y análisis genómicos.

2. Identificar genes candidatos a ser utilizados en un sistema de tipificación de secuencia multilocus para la identificación de *C. auris* mediante análisis genómicos.

3. Evaluar la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia antifúngica de los aislamientos de *Candida auris* de la red de hospitales del laboratorio de Salud Pública de Bogotá.

4. Analizar la relación genética de los aislamientos de *Candida auris* provenientes de la red de hospitales del laboratorio de Salud Pública de Bogotá y de diferentes orígenes geográficos.

5. Marco de referencia

5.1 Microorganismo fúngico *Candida auris*

Candida es un género de hongos unicelulares *basidiomicete* también llamados levaduras. Dentro de este género se encuentra *Candida auris*, especie que se ubica dentro del clado *Clavispora* de la familia *Metschnikowiaceae* del orden *Saccharomycetales*, que son levaduras ascomicetas (hemiascomicetas) que se reproducen por gemación [14]. Su ciclo de reproducción aún sigue siendo un misterio, pero al ser haploide al igual que *C. lusitanie* y *Candida guillermondii*,[42] y tener un perfil genómico parecido a *C. lusitanie*, se puede llegar a decir que *C. auris* es heterotálica (significa que el hongo requiere dos parejas compatibles para realizar la reproducción sexual) [41]. Se ha reportado que *C. auris* al tener un perfil haploide se ha observado una variabilidad cariotípica sustancial [43]. Entre las especies más significativas por su importancia clínica esta *Candida albicans*, entre las especies no *albicans*, las especies de *C. tropicalis* y *C. glabrata* han surgido como importantes patógenos oportunistas [44]; Pero en la última década *Candida auris* se ha convertido en un agente importante de fungemia [45], siendo identificada erróneamente en el complejo de *Candida haemulonii* con técnicas convencionales [32]. Actualmente es de gran importancia debido a su identificación errónea [15], resistencia a múltiples fármacos [9] y su trasmisión hospitalaria (persistente y colonización) [46].

El primer reporte fue en el año 2009 en un Hospital Japonés [2], desde entonces se ha presentado una dispersión global, por su rápida diseminación que ha sido reconocido en brotes de infecciones asociadas a la atención en la salud, en los cinco continentes

abarcando más de 30 países. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2016 dictaminó que debe ser un microorganismo de vigilancia en la salud pública [16, 47]. En Corea del sur, en el año 2011 se reportó por parte de unos estudios multicéntricos retrospectivos de vigilancia de hongos inusuales [18]. Para el año 2013, se reportaron casos en la India en aislamientos de sangre [35]. Por último, en Kuwait y Sur África en los años 2014 y 2015 se reportaron casos de infección por este microorganismo[19, 20], en el Reino Unido se presentaron casos en el año 2018 [46].

En América, uno de los varios reportes fue en Venezuela, Maracaibo dentro del período de 2012 a 2013, fue el primer brote por *C. auris* en UCI en este país [33]. En Colombia se notificaron casos de infección en varias ciudades (Santa Marta, Bogotá y Valledupar) desde el año 2012. En Barranquilla se notificaron 27 aislamientos entre los años 2015-2016. En Cartagena y Medellín también se presentaron casos en UCI en el año 2016 y 2019 [38].

5.2 Características generales de *C. auris*

Se encuentra en el Reino *Fungi,* es una especie de hongo *Ascomiceto*, del género *Candida*. Crece como levadura. Su nombre en latín proviene de oído, *auris*. Forma colonias viscosas, lisas y brillantes en el medio de crecimiento cromogénico (CHROMagar), observándose colonias de color purpura pálido o rosadas y en el agar dextrosa de Sabouraud (SDA) se ven blanquecinas y se forman colonias de color beige en el agar *Candida* Brilliance [35, 48, 49]. En estudios en donde su objetivo es identificar *C. auris* han utilizado sus diferencias entre la fermentación y asimilación del azúcar, la utilización de fuentes de nitrógeno y la alta tolerancia a la sal en *C. auris* y otras especies de *Candida*, para formular un caldo de dextrosa / dulcitol / manitol de sal sabouraud altamente sensible y específico y caldos de base de nitrógeno de levadura de sal dulcitol / manitol en los cuales pueden aislarse *C. auris* de muestras clínicas y ambientales [50].

Microscópicamente la célula tienen forma elipsoide (ovales) a veces alargadas [51], emparejadas y/o agrupadas, casi nunca forma hifas pero se ha demostrado que puede llegar a formar pseudohifas rudimentarias (Figura 1) [52], crece bien de 30°C a 42ºC, pero puede llegar hacer termorresistente y crecen de forma muy lenta a 42°C [2, 53, 54] característica única que no se ve en otras especies de *Candida* , posee una tasa de crecimiento comparada con *C. glabrata* [55], pero sus patrones de crecimientos son similares a *C. albicans* [56]. Hasta el momento se sabe que *C. auris* es resistente a la primera línea de antimicóticos que se usa frecuentemente en los hospitales, por ejemplo, es altamente resistente a fluconazol (CIM90 > 64 mg/L) y un tercio de los aislamientos presentan una Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) elevada a voriconazol (≥ 2 mg/L) para anfotericina B, equinocandinas y a análogos de nucleósidos, existen puntos de corte tentativos para la susceptibilidad de *C. auris*, los cuales los ha reportado el Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) [57], respaldado por estudios en un modelo de ratón neutropénico para evaluar rangos objetivo antifúngicos [58].

Al mismo tiempo en la ciudad de Cartagena, Colombia el Instituto Nacional de Salud (INS) realizó una investigación con aislamientos de la zona para evaluar la sensibilidad antifúngica utilizando la técnica de microdilución en caldo y establecer el perfil de susceptibilidad antifúngica, En donde se observó un 98% de sensibilidad a los cuatro antifúngicos evaluados frente a un 2% de resistencia de *C. auris* a voriconazol, lo que evidencia que las instituciones de salud han venido realizando seguimiento adecuado de los protocolos en el tratamiento de infecciones fúngicas [59].

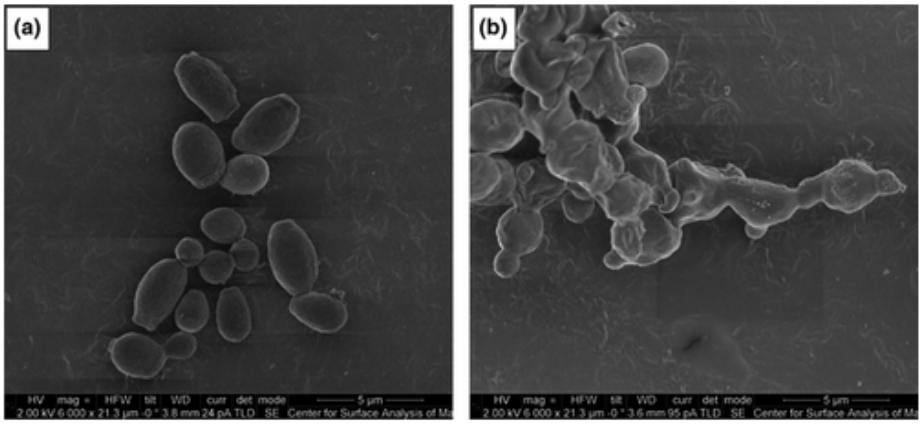


Figura 1. Características microcópicas de *Candida auris*.
Micrografía electrónica de barrido de *Candida auris* tratada sin fármaco (control) (a) y con SCY -078 a 1 × MIC (0.5 mg / L) (b). Referencia 54.

Los aislamientos de *C. auris* han sido previamente identificados por métodos fisiológicos como *C. haemulonii* en la mayoría de los casos, también es tanto fenotípicamente como filogenéticamente cercana a el complejo de especies de *C. haemulonii* (*Candida pseudohaemulonii, Candida duobushaemulonii* y *C. haemulonii)* conocido como grupo I y II, *Candida lusitanie* y *Candida krusei* [12, 53, 60, 61], muchos laboratorios identifican erróneamente *C. auris* con *Candida sake, Candida guilliermondi, Candida famata, Saccharomyces* especies o *Rhodotorula glutini* y *Rhodotorula mucilaginosa* por API 200 AUXI, Vitek-2 por MicroScan [1, 12, 13, 30, 48]. *C. auris* coloniza diferentes sitios del cuerpo, incluidas, la ingle, la axila y el recto, y se ha aislado durante 3 meses o más después de la detección inicial a pesar de los exámenes negativos y el tratamiento con equinocandina en el período intermedio [40, 48]. Estas incertidumbres sugieren la necesidad de múltiples pantallas con aislamiento continuo del paciente después del tratamiento y al reingreso a los centros de atención médica [62]. Se ha aislado en fómites hospitalarios, como el suelo de las habitaciones con pacientes colonizados o infectados, de las superficies del mobiliario, pantallas y teclados, y en los marcos de las ventanas, superficies y objetos nosocomiales cercanos a los pacientes que podrían actuar como reservorios [50]. La mayor preocupación con relación a *C. auris* es que puede permanecer

en superficies por mucho tiempo, en superficies de plástico puede sobrevivir hasta por dos semanas y en el ambiente hasta meses [63], hasta se ha investigado la descontaminación de luz ultravioleta-C (UV-C) en pruebas de laboratorio y se concluye que *C. auris* como otras dos especies de *Candida* fueron significativamente menos susceptibles a la muerte por UV-C [64]. por lo anterior las medidas de limpieza y desinfección del ambiente hospitalario deben ser prioridad de todas las instituciones de salud; se ha demostrado de forma *in vitro* la efectividad de desinfectantes como gluconato de clorhexidina [65], povidona yodada, cloro y vapor de peróxido de hidrógeno a concentraciones utilizadas en la práctica clínica [66, 67].

5.3 Identificación de aislamientos de *C. auris* por NGS y MALDI-TOF

La dificultad para la identificación de *C. auris* con herramientas y metodologías microbiológicas convencionales en los centros hospitalarios ha sido díficil, ya que, el acertado tratamiento para combatir la infección por *C. auris* depende en gran medida de su identificación precisa. En las primeras etapas de la infección, los síntomas son inespecíficos y los hemocultivos generalmente siguen siendo negativos [68]. El retraso resultante en el diagnóstico se traduce directamente en una disminución de las posibilidades de supervivencia; en el estudio del brote de *C. auris* en un hospital europeo entre los años 2016 y 2017, el 41% de los pacientes fallecieron en el plazo de 1 mes por infección [69], por tal razón, es imprescindible utilizar herramientas moleculares, como, NGS, y MALDI-TOF, para ayudar a complementar el resultado de las métodologias de identificación microbiológicas y/o bioquímicas utilizadas en la actualidad. En donde estos nuevos diagnósticos moleculares pueden llegar a ser confiables e innovadoras para la identificación de microorganismos como los hongos [13, 70, 71].

La principal ventaja de la secuenciación del genoma completo es que permite conocer la información funcional y genética [72]. Además, gracias a la secuenciación de todo el

genoma también se pueden identificar las mutaciones genéticas que provocan el aumento de la virulencia y/o resistencia. Por último, los laboratorios de microbiología clínica y salud pública están comenzando a utilizar NGS, para reemplazar y complementar muchas pruebas de laboratorio, para ello necesitan un conjunto de estándares, como requisitos reglamentarios y de acreditación [73]. Una limitación de las tecnologías de nueva generación NGS es que las lecturas tan cortas producidas por la mayoría de las plataformas actuales limitan severamente la capacidad de caracterizar con precisión grandes regiones repetidas, dejando porciones significativas del genoma con una baja calidad, por tal razón se deben implementar nuevas plataformas de secuenciación y para dar solución al problema, es recomendable utilizar una combinación de tecnologías para los análisis de las secuencias [74]. Los laboratorios de microbiología clínica necesitan herramientas bioinformáticas fáciles de usar, capacitación suficiente, bases de datos microbianas curadas integrales y materiales de referencia estándar [75]. El desarrollo de estos estándares y herramientas requerirá la colaboración de un equipo multidisciplinario, que incluye laboratorios, médicos, fabricantes de plataformas y reactivos, desarrolladores de software entre otros [76].

Por otro lado, MALDI-TOF Bruker ó bioMéreux, la cual es un método de espectrometría de masas para identificación de microorganismos (bacterias, mohos, levaduras, virus) depende de procesos metabólicos que requieren de tiempos de incubación mínimos para alcanzar resultados confiables. Varios estudios, han reportado que para la identificación de *C. auris,* es totalmente exitoso el uso de MALDI-TOF Burker [77]. Una recopilación de estudios, dieron como terminado una exitosa identificación al trabajar con MALDITOF Bruker y Vitek 2 [5, 12, 78], en algunos casos la utilización de Vitek 2, no ha generado el resultado esperado, por ejemplo, cuando se utilizan métodos bioquímicos comunes, como las tiras de índice de perfil analítico, *C. auris* a menudo se identifica erróneamente con otras levaduras comúnmente con: *C. haemulonii*, *C. famata, Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula glutinis*), pero en la actualidad Vitek-2 bioMéreux ha funcionado de manera adecuada [11].

Se han utilizado otras herramientas de tipificación basadas en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), como polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados AFLP y MLST con las secuencias de ADN ITS y / o D1 / D2 [79] y *RPB1*, *RPB*2 [80], pero actualmente no se ha propuesto un juego adecuado de genes para la técnica de tipificación por MLST en la identificación de *C. auris*. Otras técnicas como PCR o enzimas de restricción como PFGE se han utilizado ocasionalmente para ayudar en la tipificación de esté patógeno [81]. Sin embargo, estas herramientas de tipificación mencionadas anteriormente (basadas en PCR y no basadas en PCR) requieren mucha mano de obra con tiempos de respuesta más largos.

NGS se usa cada vez más para ayudar en la identificación y tipificación simultánea o el análisis evolutivo de los casos de *C. auris* [34, 40, 41, 82, 83]. Debido a su mayor resolución, ésta técnica puede proporcionar mejor información para el análisis evolutivo y epidemiológico de los casos de *C. auris* en comparación con los demás métodos y en un tiempo relativamente corto (8–72 h), excepto que es más costoso y requiere mayor habilidad y capacidad de procesamiento de datos [82]. Mientras que MALDI-TOF MS actualmente contribuye a la identificación rápida y asertiva (en algunos estudios identificando correctamente hasta el 100%) [11, 18, 77, 78, 84-86], la PCR puede tener un tiempo más prolongado, pero, ambas técnicas poseen las limitantes del costo, adquisición y operación, siendo un obstáculo para la mayoría de los laboratorios de micología con pocos recursos [70, 87, 88].

Tambien es importante saber que Illumina realiza la secuenciación por medio de la amplificación clonal del ADN ligado al adaptador que se encuentra en una superficie de vidrio en donde las bases se leen usando una terminación reversible cíclica estratégica, que secuencia la hebra molde un nucleótido a través de rondas progresivas de incorporación de base, lavado, formación de imágenes y escisión. En esta estrategia, hay fluorescencia en la estructura química 30-O-azidometil-dNTP, los cuales se encuentran marcados y se utilizan para pausar la reacción de polimerización, que permite la eliminación de bases no

incorporadas e imágenes fluorescentes para determinar el nucleótido agregado [89]. Después de escanear la celda de flujo con una cámara de carga acoplada, la fracción fluorescente y el bloque 30-O-azidometil-dNTP se eliminan, y se repite el proceso. En todos los modelos de Illumina, las tasas de error generales están por debajo del 1 % y el tipo de error más común es la sustitución, por tal razón, es una técnica molecular muy avanzada y muy recomendada para diversos análisis genéticos [90].

Una técnica de tipificación multilocus MLST permite caracterizar aislamientos de diferentes especies, utilizando siete genes los cuales son secuenciados y se tipifican. No se evalúa la similitud de secuencia total entre cepas, sino que se examina cada secuencia para un locus dado. Si la secuencia es diferente, se considera que es un nuevo alelo y se le asigna un número único (arbitrario). El análisis de los siete genes permite discernir que cada cepa es caracterizada por un perfil de siete alelos, con cada perfil único teniendo su propio tipo de secuencia designado. Los perfiles alélicos se pueden considerar como un conjunto de genes de 7 caracteres categóricos. MLST se ha utilizado con éxito para estudiar genética de poblaciones y reconstruir microevolución de bacterias epidémicas y otros microorganismos [91-96].

5.4 Mecanismos de resistencia molecular antifúngica y factores de virulencia

La resistencia molecular se puede definir como los medios en que las células individuales pueden disminuir su sensibilidad a los antifúngicos debido a la utilización de varios factores, incluidas las mutaciones puntuales de la célula diana, la sobreexpresión de las moléculas diana y la irrupción, implicación y sobreexpresión de genes de la bomba de flujo de antifúngicos como MDR1 (proteína de resistencia a múltiples fármacos 1) [97], esté, último implicado en *Candidas* patógenas principalmente [98, 99]. Además, al recopilar información de los mecanismos de resistencia a los principales antifúngicos (azoles, poliones, equinocandinas y ácidos nuecleosidos) en *C. auris* se puede dilucidar que tienen un genoma que es altamente divergente de los de otras especies de *Candida* [41, 100], aunque se ha demostrado que comparte genes de patogenicidad y virulencia con

C. albicans como por ejemplo, los genes ERG1 y ERG11 (Siglas Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1) con *C. lusitanie* comparte un porcentaje considerable de proteínas [9, 101], pero cabe aclarar, que la mayoría de sus genes aún no se han caracterizado.

Las bombas de flujo, es la encargada de transportar proteínas a través de la membrana celular, también pueden bombear drogas fuera de la célula, se encuentran dos familias principales de bombas de flujo involucradas en la resistencia a los antimicóticos: El transportador de unión ATP (ABC) y los transportadores de la Superfamilia de facilitadores principales (MFS) [102]. Rybak y colaboradores, examinaron la expresión de cuatro genes homólogos a genes principales de la bomba de flujo (CDR1 y MRD1 de *C. albicans*) en *C. auris* en donde encontraron expresión alta de estos genes en aislamientos clínicos resistentes a triazol, la sobreexpresión y deleción de CDR1 es un contribuyente significativo para la susceptibilidad a triazol [103]. También, en cepas de *C. auris* provenientes de la India, encontraron genes homólogos de las bombas de flujo ABC y MFS [34], por último, en un estudio comparativo con *C. auris, C. haemulonii y C. glabrata* de cepas de Israel, se demostró experimentalmente un actividad intrínsecamente alta de la bomba transportadora ABC en *C. auris* en comparación con las otras especies de *Candidas* utilizadas en el estudio [22].

El ergosterol es un componente indispensable para los hongos y hace parte su membrana, los antimicóticos del grupo de los azoles inhiben el lanosterol 14-alfa-desmetilasa (LD), la proteína que cataliza la conversión de lanosterol a ergosterol afectando la membrana celular del hongo directamente, debilitándola, inhibiendo el crecimiento y sensibilizando al sistema inmunitario del huésped [102]. En *C. auris* se ha demostrado que mutaciones puntuales (Y132F, K143R Y F126T) en el gen ERG11 están asociadas a la resistencia a azoles y que cada una de estás a su vez se presentan en cepas de un origen geográfico en particular, (Y132F India, Pakistán y Venezuela), (K143R India) y (F126T Sudáfrica) [9], Muñoz también encontró mutaciones (Y132F y K143R) en ERG11 [104]. Varios estudios recientes han demostrado que esta especie, junto con otras especies de *Candida* patógenas

tendría copias únicas de varios genes relacionados con resistencia a los antifúngicos como ERG3, ERG11, FKS1, FKS2 y FKS3 [105]. En otro estudio, se encontraron mutaciones (F214S y R495G) en TAC1B asociadas a la resistencia a fluconazol y también mutaciones para ERG11, mencionadas anteriormente [106].

El beta (1,3) D-glucano es un componente esencial de la pared celular fúngica y está codificado por los genes FKS1 y FKS2, dos subunidades de la beta (1,3) D-glucano sintasa [102]. Las equinocandinas inhiben esta enzima, disminuyendo la cantidad de glucano en la pared celular [107]. Tanto Kordalewska como Chowdhary, encontraron una mutación puntual (S639F) en el gen FKS1 asociada a la resistencia a equinocandinas, debido a que se presentaba en las cepas resistentes y no en las susceptibles, por otro lado, en el segundo estudio, les confería resistencia a los tres fármacos de equinocandina probados en los aislamientos de origen indio [88, 108]. Para FKS2, se encontró en una sola copia en el genoma de *C. auris,* pero sin mutaciones asociadas a la resistencia a equinocandinas [34].

El objetivo de los polienos es unirse a las moléculas de ergosterol en la membrana citoplasmática, afectando así la permeabilidad de la membrana al formar poros multiméricos y causar daño oxidativo [102]. En Colombia, las elevadas CIM a anfotericina B eran realmente notables en aislamientos de la región norte, demostrando la variedad de resistencia que pueden llegar a tener estos según su distribución geográfica, por otro lado, en los aislamientos de *C. auris* resistentes a anfotericina B, se asociaron alrededor de 5 mutaciones no anónimas, menos utg3_385439 (G / A) en regiones codificantes de proteínas, las cuales 2 mutaciones (utg5_821828 (C / T) y utg4_968953 (T / C)) están altamente asociadas a la formación de biopelículas y resistencia a anfotericina B en *C. albicans* [24].

Por último, los análogos de nucleósidos transforman en la célula fúngica dos productos que inhiben, respectivamente la timidina sintasa y se incorporan al ARN, inhibiendo la

síntesis de ADN y ARN [102]. Uno de los pertenecientes a este grupo es la flucitosina que debe activarse para tener un efecto antifúngico. Esta activación requiere, entre otras, la proteína codificada por el gen FUR1 en donde, Rhodes y colaboradores descubrieron que al secuenciar una cepa de *C. auris* resistente a la flucitosina había una mutación en el gen FUR1, el cambio de (Fenilalanina) F por (Isoleucina) I en la posición 211 [46].

Se debe realizar más énfasis en el descubrimiento de nuevos mecanismos moleculares, en particular en los análogos de nucleósidos, como, por ejemplo, saber si está mutación está totalmente asociada a la resistencia debido a que otras especies de *Candida* no se ha presentado este mismo cambio.

Una investigación importante, arrojó que las cepas de *C. auris* resistentes mostraron un perfil de proteoma de biopelícula mejorado, un fenotipo asociado con resistencia adaptativa. Al comparar estos aislamientos con *C. albicans* ATCC 90028, se demostró que ambos aislamientos de *C. auris* tenían diferencias importantes con respecto a su utilización de carbono y los contenidos de lípidos y proteínas aguas abajo. En conjunto, estos datos indican que *C. auris* muestra un perfil de resistencia específico de la especie [100].

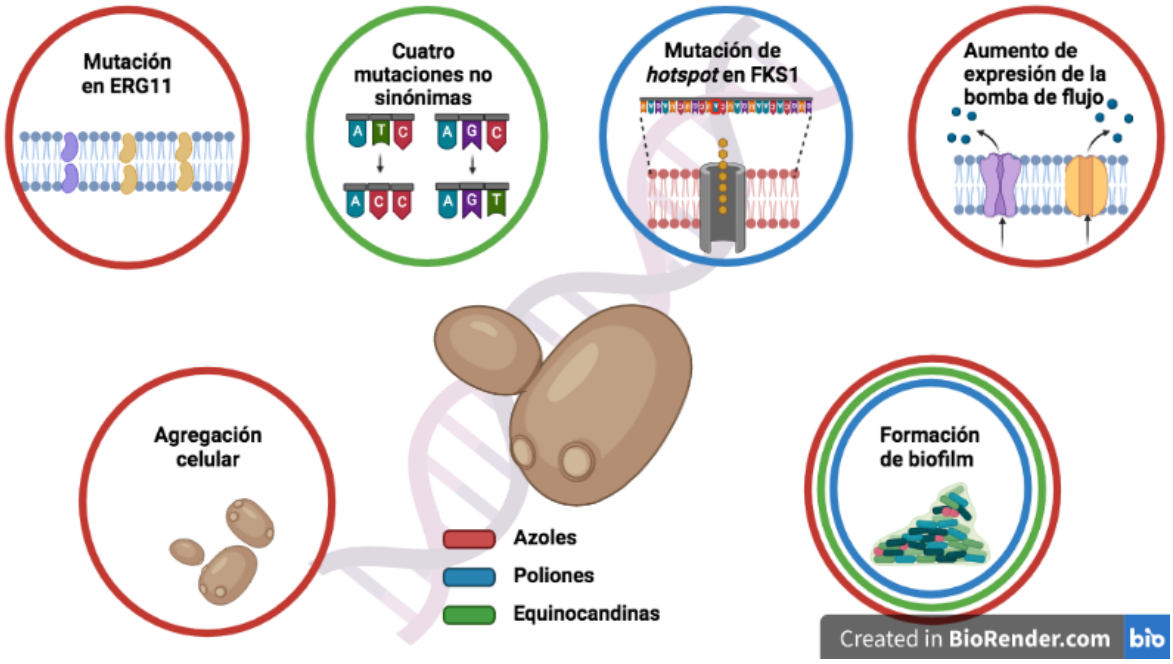


Figura 2. Mecanismos de resistencia a antifúngicos. 103.

5.4.1 Genes asociados a la virulencia

La formación de biopelículas es un mecanismo que utilizan la mayoría de microorganismos, en donde las comunidades biológicas, se empiezan a diferenciar y particularmente las células se adhieren y crecen tanto en superficies biológicas como inanimada [56]. Recientemente, *C. auris* ha demostrado ser persistente en superficies plásticas comunes en entornos de atención médica [50]. Posiblemente asociado a su capacidad de formación de biopelículas que pueden estar implicados en la resistencia de adaptación para muchos antifúngicos y están vinculadas a un exceso de morbilidad y mortalidad [109], por otro lado se encontró que *Hog1*, el cuál es un gen asociado a la resistencia, estrés y virulencia en *C. auris*, también, se pudo evidenciar el desempeño de *Hog1* en papeles claves como: la morfología celular, la agregación y la estructura de la pared celular en *C. auris*, en conclusión, *Hog1* está más estrechamente implicado en promover la resistencia al estrés ante diversos estímulos, incluido el estrés osmótico, el agente oxidante H2O2 y el agente desnaturalizante SDS [110].

Un estudio realizado por Sherry y sus colegas identificó por primera vez que *C. auris* pudo producir cantidades intermedias de biomasa en comparación con *C. albicans* y *C. glabrata.* A pesar de no producir biopelículas tan robustas como las de *C. albicans*, se demostró que estas comunidades toleran las tres clases principales de antifúngicos, incluida la anfotericina B y la micafungina, la terapia recomendada para las infecciones por biopelículas de *C. albicans.* El grupo realizó también un análisis transcripcional para determinar los mecanismos subyacentes asociados con el desarrollo y la tolerancia de biopelículas [109], en donde demostró que la tolerancia a todas las clases de antifúngicos dependía de la fase de biopelícula, con biopelículas maduras (24 h) que exhiben resistencia a las tres clases de antifúngicos. La matriz de las biopelículas de las especies de *Candida* patógenas como *C. albicans, C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, es rica en polisacáridos de manano-glucano al igual que *C. auris*, demostrando que su hidrólisis reduce la tolerancia a los medicamentos, en particular al triazol [111]. En el modelo *Galleria mellonella*, se evidenció que los aislamientos de *C. auris* exhibieron una virulencia significativa comparada con otras especies de *Candida* patógenas. Además, también se evidenció que los cultivos de *C. auris* forman agregados que generan una ventaja para el patógeno. Por otro lado, en el modelo de ratón murino, la virulencia en *C. auris* fue mayor que en *C. haemulonii*, aunque menor la virulencia observada en *C. albicans* [54, 112].

Investigadores, como Kean y su grupo de trabajo, descubrieron que estos genes IFF4, CSA1, PGA26, PGA52, PGA7 de la pared celular anclados con GPI ayudan a la formación de biopelículas, los genes: HYR3, ALS5, ALS1, MDR1 están implicadas en la adherencia celular y soló en biofilm maduro, por otro lado, los genes RDC3, SNQ2, CDR1, YHD3 en donde, a medida que la biopelícula pasa a etapa intermedia y madura se regulan estos (Figura 1) [113].

5.5 Epidemiología

C. auris se ha extendido globalmente en los últimos años, debido a que es un microorganismo oportunista, emergente y multirresistente [114], cuya primera identificación se realizó en 2009 al aislarse del conducto auditivo de un paciente en Japón [2]. El primer reporte de infección hemática causada por *C. auris* se realizó en 2011 en Corea del Sur, resaltando la persistencia de fungemia a pesar de que los pacientes recibían tratamiento con fluconazol y anfotericina B [3], en febrero del 2015, los colegas de Pakistán preocupados por un brote de infecciones por *S. cerevisiae*, reportaron el caso, pero eran aislamientos de *C. auris*, en donde se evidencia la dificultad para ser bien identificada. En 2019, los pacientes con *C.auris* mostraron una alta mortalidad de 42,4%, que es similar a la tasa de mortalidad observada en otros estudios que van del 35,2 al 60% [9, 23, 115].

Se presentaron casos en: Sudáfrica (2014) [19], Reino Unido (2015), España (2016) [116, 117], Israel (2016) [22]. En Austria se han notificado casos únicos de *C. auris* [118], Alemania [15, 116], Irán [119, 120], Suiza [121], Taiwán [122]. También se han informado casos esporádicos de *C. auris* desde Austria, Bélgica, Malasia, los Países Bajos, Noruega, Rusia y los Emiratos Árabes Unidos [123, 124]. En China en el año 2018 se notificó casos de aislamiento tomados entre 2011 y 2017 [125]. La ocurrencia de casos múltiples de *C. auris* ha sido descrita en Canadá [126], Colombia [23], India [5], Japón [127], Kenya [84], Kuwait [20], Omán [51], Panamá [128], Singapur [129], los Estados Unidos (principalmente del área de la ciudad de Nueva York, Nueva Jersey, el área de Chicago) [130] y Houston, Texas [71].

En Venezuela (Maracaibo) se notificó en marzo de 2012 a julio de 2013, el primer brote por *C. auris*, en Unidad de Cuidados Intensivos, afectó 18 pacientes, 13 eran pediátricos, con una tasa de letalidad del 28%, otros en el 2013 [33]. En Colombia se notificaron casos de infección por *C. auris* de forma aislada en varias ciudades (Ciudad de Santa Marta, Bogotá y Valledupar) desde el año 2012. Barranquilla notificó 27 aislamientos entre los

años 2015-2016. De manera adicional, un brote en el distrito de Cartagena en agosto de 2016, en una Unidad de Cuidados Intensivos Pediátrica. Se identificaron 5 casos de infección diseminada de *C. auris*, en la región norte y central, además de que se evidenció colonización en pacientes, trabajadores de la salud y ambientes, pero no es claro cuáles son los hospitales puntualmente [38]. En Medellín, Colombia se han presentado dos brotes de *C. auris*, el primero al inicio de agosto del 2018 y el segundo al inicio de abril del 2019 [65].

Es importante resaltar que mediante secuenciación del genoma completo se determinó la presencia de cuatro clados específicos dentro de la especie de *C. auris*: Asia oriental, Asia meridional, Sudáfrica y América del sur, en donde se resalta la diseminación mundial de este patógeno pero también la estructuración genética, ya que cada clado se caracteriza por distintos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) [9, 46, 71].

5.6 Metabolismo

La anotación funcional del genoma completo de *C. auris,* no existe aún, pero si se han realizado investigaciones con NGS principalmente en cepas de origen Indio [7, 9, 34, 41], pero solo tres investigaciones dieron características puntuales de cepas de la India, en donde se evidencio que una proporción importante del genoma se dedica a procesos celulares y metabólicos, aunque gran parte del genoma permanece sin caracterizar, un gran número de proteínas posee un transportador junto con la actividad de unión y catalítica, otras proteínas están involucradas en la transducción de señales [41], también se comprueba que existen muchos genes ortólogos entre *C. auris* y *C. albicans* implicados en su virulencia y en algunos procesos metabólicos [34]. En un análisis de clasificación enzimática basados en predicciones de números de la Comisión de Enzimas (CE) para cada secuencia se encontró que las hidrolasas son el grupo más grande de enzimas en *C. auris* 6684 (42%), seguidas por las transferasas (25%) y las oxidorreductasas (19%), el análisis revela que las vías centrales relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos se conservan [34]. Por otro lado, otro análisis predijo un arsenal de

transportadores ortólogos de *C. albicans*, pertenecientes principalmente a la superfamilia facilitadora principal y la superfamilia ABC (casete de unión a ATP), se descubrió que el genoma contenía factores de transcripción como las proteínas relacionadas con (serina / enzima treonina) STE y la caja MADS (familia de factores de transcripción basada en la similitud de las secuencias de sus genes) [131], que previamente se ha demostrado que están involucradas en la virulencia de los patógenos fúngicos, como por ejemplo, la familia de proteínas del factor de transcripción fúngica Ste12 altamente conservada desempeña papeles críticos en la regulación de muchos procesos celulares, incluidos el apareamiento, la biosíntesis de la pared celular, la filamentación y el crecimiento invasivo también es un importante mediador de la virulencia fúngica en *C. glabrata* y *C. auris* [41, 132]. Posee fosfolipasas y proteinasas para realizar hemólisis [133].

5.7 Genoma

Actualmente, el genoma completo de *C. auris* no se ha identificado completamente y se han realizado algunos estudios con genomas de aislamientos de algunos lugares geográficos [9, 34, 41, 71, 134], faltando aun información relevante de la proteómica de este microorganismo de otros lugares geográficos. *C. auris* posee siete cromosomas hallados con mapas ópticos, y confirmado por medio de lecturas largas y ensambles de telómero a telómero para el recuento de cromosomas, visualizando reordenamiento cromosómico entre clados [135] y evidenciaron que se encuentran los locus MAT a y MATα que controlan el apareamiento sexual [104]. Por otro lado, un estudio demostró que los aislamientos provenientes de Pakistán, India, Sudáfrica, Japón y Venezuela formaron un clado por lugar geográfico es decir 5 clados sugiriendo que cada uno de estos clados surgió casi simultáneamente en diferentes lugares del mundo, en donde resalta que los aislamientos de cada país estaban altamente relacionados. Sin embargo, se observaron grandes diferencias genéticas entre aislamientos en diferentes regiones del mundo, lo que indica que *C. auris* tiene una estructura geográfica sustancial [9], lo mismo se pudo evidenciar con aislados de Reino Unido [46] y EE.UU [71]. En otro estudio de secuenciación del genoma completo utilizaron 74 aislamientos de otros países entre estos Irán, en donde se evidenciaron 5 clados agrupados geográficamente: Este Asiático, Sur de

Asia, Africano, Sudamericano e Irán, que quedó a parte generando el quinto clado, el cual era más cercano al clado del Este Asiático, con una diferencia de > 200 000 polimorfismos de un solo nucleótido [119]. En otro estudio se presentaron los mismo clados utilizando aislados de los países anteriormente expuestos y con aislados recolectados de varios estados de EE.UU, en donde, estaban relacionados con aislados de Pakistán, India y Venezuela finalmente reportando que tiene un origen Asiático y otro Sudamericano, posiblemente por la exposición de atención médica en el extranjero que han presentado los pacientes [136].

Aunque se han hecho esfuerzos para proporcionar una vista inicial de todo el genoma de *C. auris* [34, 41]. Los ensamblajes disponibles en GenBank están altamente fragmentados, anotados de manera inconsistente y no proporcionan una representación completa de todos los clados de *C. auris* [104], filogenéticamente está relacionada al clado de *C. haemulonii*, (88% de identidad de nucleótidos por pares promedio) , en donde dos de las tres especies del grupo *C. haemulonii* y *C. duobushaemulonii* fueron recientemente secuenciadas [137, 138]. Para obtener resultados más puntuales, es importante aclarar que la relación filogenética de *C. auris* con otras especies conocidas aún no se ha resuelto por completo, principalmente debido a la rareza de algunos de sus parientes más cercanos cómo: *C. heveicola* y *C. ruelliae* [2, 139].

Un estudió reporto que un 99.5% de las lecturas genómicas de *C. auris* no se alinearon con las secuencias genómicas completas (o borradores) actuales de *C. albicans, C. lusitaniae, C. glabrata* y *S. cerevisiae*; indicando así su divergencia del clado activo de *Candida* [34, 104]. El genoma se extiende alrededor de 12.1-12.7 Mb con 8527 genes predichos [41]. La anotación funcional reveló que entre las especies de *Candida* secuenciadas, está más cerca de las especies de hemiascomicetes *Clavispora lusitaniae*. La comparación con la especie bien estudiada *C. albicans* mostró que comparte atributos de virulencia significativos con otros agentes patógenos [128].

Aunque una proporción importante del genoma de *C. auris* permanece sin caracterizar, un gran número de proteínas posee un transportador junto con la actividad de unión y catalítica involucrada en los procesos celulares y metabólicos seguidos por proteínas involucradas en la transducción de señales, *C. albicans* comparte rasgos con *C. auris* que vienen dado por determinados genes ortólogos [41]. El análisis del uso de codones en *C. auris* parece ser más similar y superpuesto con *C. lusitaniae* que con otra especie de *Candida*, lo que indica que *C. auris* es parte del clado CUG. Esta similitud ha sido respaldada por los datos filogenéticos y funcionales [34, 119].

5.8 Aspectos clínicos de la infección en personas

La caracterización fenotípica de *C. auris* se asemeja a la de *C. haemulonii* por tal motivo, tiene una errónea identificación con técnicas convencionales (métodos morfológicos y fisiológicos) [53, 70]. La infección invasiva y la colonización se han detectado en pacientes con múltiples comorbilidades, en entornos hospitalarios y de cuidado crónico [140]. Por otro lado, hay diferentes estudios que demuestran su permanencia y sobrevida desde semanas hasta meses en el ambiente hospitalario [40, 48].

Este hongo corresponde a un problema de salud mundial debido a la seriedad de las infecciones que causa, tales como infecciones sanguíneas y otras invasivas, incluso fatales [84], presenta alta resistencia a los antifúngicos, medicamentos con los que se da tratamiento usualmente a las Candidas [83]. *C. auris* se presentan principalmente en forma de: Infecciones del torrente sanguíneo, heridas, otitis, orina, vías respiratorias [141]. Los aislamientos encontrados en orina, tracto respiratorio, heridas o canal auditivo externo son difíciles de diferenciar entre enfermedad invasiva o colonización de esos sitios [117].

Los factores de riesgo en los que se puede llegar a adquirir una candidemia son: compromiso del estado inmune, estancia prolongada en UCI, cirugía abdominal, uso de catéteres, diabetes mellitus, teniendo una mortalidad del 30% al 50%, se le es llamada la “enfermedad del enfermo” [142, 143]. Como consecuencia es importante saber sobre su

caracterización y poder así, solucionar los problemas que conllevan a una excelente prevención y control [47].

5.9 Prevención y control

Los pacientes a quien se les sospeche una infección por *C. auris*, se les debe implementar medidas de aislamiento estándar y de contacto, como describe el Instituto Nacional de Salud (INS) [38]. Se ha demostrado que la utilización conjunta de alcohol y clorhexidina ayuda a destruir todas las especies de *Candida* [62]. Por otro lado, es necesario mantener una buena higiene como el lavado de manos, usar todos los implementos de protección como, guantes, bata, gafas etc. y la limpieza del área por medio de desinfección o esterilización es indispensable [65]. En Colombia y Reino unido [24, 46], se ha encontrado que se presenta una trasmisión continua entre los pacientes colonizados, los ambientes hospitalarios y los trabajadores de la salud respaldando la idea de una contaminación ambiental, es fundamental el cumplimiento del control adecuado de infecciones y la desinfección ambiental para limitar la transmisión, por ejemplo, el buen manejo del paciente colonizado por esté patógeno dejarlo en una habitación individual [144], el lavado continuo de las manos, la desinfección ambiental utilizando una Agencia de Protección Ambiental - desinfectante de grado hospitalario registrado como efectivo contra *Clostridium difficile* esporas. La limpieza y desinfección diaria y terminal de las habitaciones y áreas de pacientes donde un paciente con *C. auris* reside o recibe atención es necesario [145].

Es importante tener al paciente aislado o con personas que igualmente posean el mismo microorganismo, pero con tres metros de distancia entre cada una, además se deben tener en cuenta las recomendaciones universales para la inserción y cuidado de los catéteres venosos centrales, así el uso racional de antimicrobianos de amplio espectro [146]. Los CDC recomiendan el desoxicolato de AmB como el tratamiento inicial de elección para recién nacidos y lactantes <2 meses de edad con *C. auris* infección. Para adultos y niños> 2 meses de edad, se recomienda un medicamento de equinocandina como el tratamiento

inicial de elección, y si el paciente no responde clínicamente, se puede considerar cambiar a AmB liposomal. Las recomendaciones de los CDC para el tratamiento se encuentran en [147].

Para mitigar el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos, varios estudios *in vitro* han investigado la posibilidad de combinaciones antifúngicas. De hecho, se demostró que la combinación de micafungina con voriconazol exhibe efectos sinérgicos [148], como también se ha informado para combinaciones de sulfametoxazol-azol [149]. Por último, se están realizando medicamentos como el: SCY-078 [56], para poder manejar de manera efectiva el tratamiento contra *C. auris.*

1. Materiales y Métodos

5.10 Tipo de investigación

Este estudio es de tipo descriptivo, retrospectivo y de corte transversal. Aislamientos de *Candida auris* fueron enviados al Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, desde instituciones que conforman la red Distrital, dando cumplimiento a la vigilancia epidemiológica establecida desde el nivel Nacional entre los años 2018-2019.

5.11 Población de estudio

Los aislamientos de *Candida* spp se obtuvieron a partir de 20 muestras clínicas de pacientes de edades que oscilan de 1 a 71 años de edad provenientes de diferentes localidades del centro del país del (Distrito Capital) DC (Tabla 1). Las muestras clínicas consistieron de sangre total, líquido cefalorraquídeo, secreción orotraqueal y catéter de pacientes infectados con *Candida* spp. Los aislamientos fueron incluidos si provenían de infecciones invasivas. Los datos mencionados fueron recolectados por la red de hospitales del Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá durante los años 2018 y 2019.

Tabla 1. Mapa de las localidades de Bogotá con la ubicación de los Hospitales origen de las muestras.

# Muestras	Localidades de Bogotá
1A	Localidad Teusaquillo- Norte
2,6,7,9,13,16,18A	Localidad Puente Aranda-Sur Occidente
3,4A	Localidad Teusaquillo-Norte
5A	Localidad Los Mártires-Centro Oriente
8,10,11A	Localidad Chapinero Alto-Norte
12A	Localidad Teusaquillo-Norte
14A	Localidad Santa Fe-Centro Oriente
15A	Localidad Usaquén-Norte
17A	Localidad de Kennedy-Sur Occidente
19A	Localidad Barrios Unidos-Norte
20A	Localidad Tunjuelito-Sur

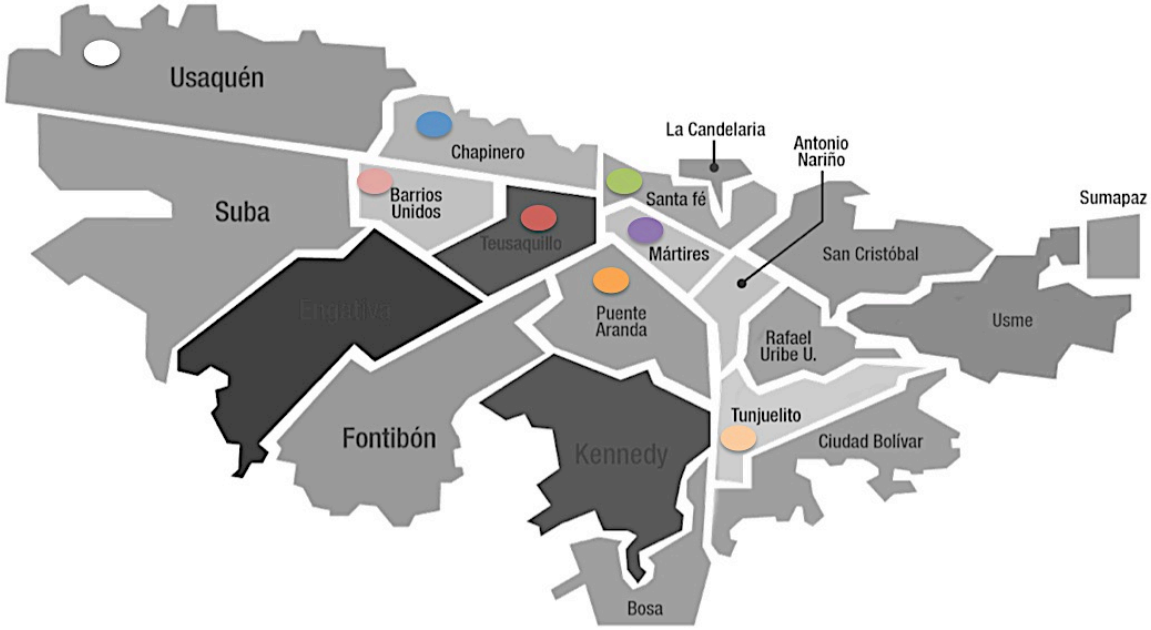


Figura 3. Mapa de las localidades de Bogotá con la ubicación de los hospitales origen de las muestras.

5.12 Aislamiento e identificación microbiológica

Las muestras microbiológicas fueron aisladas por el laboratorio de cada hospital origen de cada una de las muestras usando técnicas microbiológicas estándar. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, donde se realizó el protocolo de diagnóstico convencional y automatizado por el sistema VITEK 2 bioMéreux [27]. Dichos aislamientos fueron enviados al Instituto Nacional de Salud (INS) para su re-confirmación utilizando espectrometría de masas por desorción-ionización asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (BD Bruker). Posteriormente, los resultados se enviaron al Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá.

5.13 Extracción de ADN, secuenciación mediante NGS, análisis de las secuencias y análisis filogenético

El ADN fue extraído usando el kit QIAamp for isolation of genomic, mitochondrial, bacterial, parasite or viral DNA, de la siguiente manera, se dejó creciendo cada uno de los caldos con la inoculación de su respectivo aislamiento de *C. auris*, durante 32 h a 35-35ºC, luego, se centrifugaron los inóculos a 16.000g x 12 minutos, se descarto el sobrenadante con una pipeta, seguido a estó se centrifugó el pellet para remover residuos de sobrenadante a 16.00g x 1 minuto, se resuspendio y se adicionó 50 µL de la solución 1 del kit, se dio vortex durante 1 a 3 minutos, seguido a esto, se agrego 100 µL de la solución 2 y se agitó manuelmente en 8 tiempos, posteriormente, se agrego 325 µL de a solución 3 y se agito en 8 tiempos, se centrifugo por 5 minutos a 16.000g. Se transfirió el sobrenadante al filtro y se centrifugo solo por 1 minuto a 16.000g, descartamos sobrenadante y se adiciona 300 µL de la solución 4, se centrifugó por 1 minuto a 16.000g, se descartó sobrenadante y se centrifugó solo para remover residuos de sobrenadante a 16.000g x1 minuto. Por último, se adicionó 15 µL de la solución 5 y se centrifugó a 16.000 x1 minuto. El ADN fue almacenado a 4ºC hasta su envío a GENEWIZ (Nueva Jersey) para su secuenciación con la plataforma Illumina (Illumina HiSeq 2500), usando el HiSeq Rapid SBS Kit v2 de 500 ciclos (Illumina). Los resultados de la secuenciación fueron obtenidos entre finales del año 2020 y el primer semestre del año 2021. La calidad de las secuencias

se evaluó examinando la calidad de las lecturas (archivos tipo *Raw data reads* – archivos FastQ). La calidad de estas lecturas fueron evaluadas por el programa FastQC v0.7 [150]. Se utilizaron secuencias con cobertura de al menos 50 x. A partir de los resultados de este análisis y usando el programa Trimmomatic [151], se realizó la limpieza de las lecturas para mejorar su calidad. Una vez realizado este procedimiento, estas lecturas fueron ensambladas *de novo* usando los programas Velvet [152] y SPAdes v3.12 [153]. La calidad de los ensamblajes se evaluó con el programa Quast v5.0 [154, 155].

Posteriormente, a partir de los ensamblajes obtenidos se realizó un llamado y filtrado de SNP (del inglés Single Nucleotide Polymorphism) con la herramienta CSI Phylogeny 1.4 [156]. El archivo conteniendo estos SNP (en formato fasta) fue convertido a un archivo Nexus. Mediante el programa JModelTest 2 [157], se seleccionó el mejor modelo evolutivo que explicará los datos. Para confirmar que los 20 aislamientos secuenciados pertenecieran a *C. auris*, se obtuvieron secuencias de la región genómica que incluye a la subunidad pequeña del rRNA (parcial), a los ITS1 y ITS2, al rRNA 5.8s y de la región de la subunidad grande del rRNA, y de otras especies patógenas de *Candida* las cuales se obtuvieron por medio de un alineamiento múltiple por medio de la herramienta BLAST, delimitando así solo la parte de ínteres. Estas secuencias fueron alineadas con secuencias homólogas de diferentes especies de *Candida* obtenidas del GenBank [158, 159] usando el método MUSCLE [160]. A partir de este alineamiento se infirió el mejor modelo evolutivo con el programa JModelTest [161, 162] y se construyó una filogenia con el método *neighbor-joining* en el programa MEGA v0.7 [163] y su confiabilidad fue medida mediante *bootstrapping* (1000 réplicas) [164]. También se infirieron las relaciones filogenéticas de los aislamientos usando el programa MrBayes 3.2 [165].

Secuencias de genoma completo provenientes de diferentes lugares geográficos, incluyendo 102 aislamientos de Colombia, de las cuales 53 son de Bogotá (incluidas las secuencias de los 20 aislamientos de la Secretaría Distrital de Salud), 29 de Barranquilla y

20 de Cartagena. Las restantes son de diferentes lugares del mundo: 5 de Venezuela, 16 de Pakistán, 6 de Japón, 17 de India, 10 de Sudáfrica, 105 de Estados Unidos y 18 de Reino Unido. Fueron usadas para el análisis comparativo de la diversidad genética. Las secuencias de los aislamientos utilizados se obtuvieron mediante sus números de acceso (SRR) en los respectivos proyectos de secuenciación (BioProyect PRJNA328792 [9], PRJNA470683 [24], PRJEB20230 [24], PRJNA541007 [119]) disponibles en el NCBI, ingresando con su respectivo SRR en NCBI, se pueden encontrar cada una de estás secuencias.

5.14 Análisis de tipificación de secuencia de múltiple *locus* (MLST)

Se identificaron estudios previos que han utilizado genes para la tipificación usando MLST en varias especies de *Candida* patógenas [83, 93, 166-168]. Con base en los distintos conjuntos de genes analizados, se escogió un conjunto de siete genes que se usan para esto en otras especies de *Candida* [92, 96, 169, 170]. Estos genes fueron identificados en los ensamblajes de cada uno de los 20 aislamientos y en el genoma de referencia para *C. auris*, cepa B844, depositado en la base de datos http://www.candidagenome.org/. Para cada gen se realizó un alineamiento múltiple con MUSCLE y se determinó el número de alelos presentes. A estos alelos se les asignó un número y se construyó una matriz alélica para cada aislamiento (Tabla 3). A partir de esa matriz, se establecieron los genotipos de *C. auris* (Tabla 3), siguiendo los mismos parámetros de la tipificación por MLST.

5.15 Evaluación de mecanismos moleculares asociados a resistencia antimicótica

Basado en estudios previos en *C. albicans* y en diferentes especies de *Candida* [101], varios genes asociados a resistencia (*adp1, cdr1, erg11, fsk1, gln4, icl1, mdr1, mrr1, pdh1, pmi1, rpn2, erg3, flu1* y *tac1*) fueron seleccionados. Estos fueron rastreados e identificados en cada uno de los asilamientos de *C. auris*, así como en el genoma de referencia. La secuencia de referencia de *C. auris* fue comparada con todas las secuencias completas de

los aislamientos para investigar cambios de nucleótidos previamente asociados a resistencia antimicótica en este patógeno.

5.16 Análisis de diversidad genética y estructura de la población de los aislamientos *C. auris*

El análisis de diversidad genética se realizó para los 20 aislamientos pertenecientes a la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá así como para todas las secuencias de genoma completo obtenidas del GenBank de diferentes lugares del mundo. Se calcularon el número total de sitios segregantes (Ss), los sitios singleton (S), los sitios parsimoniosos (Ps), el número promedio de sitios diferentes entre pares de secuencias (k) y la diversidad nucleotídica (π). Adicionalmente, se estimaron diversos estadísticos que evalúan el ajuste al modelo neutral de evolución molecular. El estadístico D de Tajima considera la diferencia entre el número de sitios diferentes entre pares de secuencias y el número de sitios segregantes [171]. Los estadísticos D* y F* de Fu & Li consideran la distribución de las mutaciones en la genealogía de las muestras evaluadas [172]. El D* evalúa la diferencia entre la cantidad de mutaciones en las ramas internas y la de mutaciones en las ramas externas, mientras que el F* evalúa la diferencia entre el número promedio de sitios diferentes entre pares de secuencias y la cantidad de mutaciones singleton. El estadístico Fs de Fu considera el número de haplotipos diferentes condicional al número promedio de sitios diferentes entre pares de secuencias [173]. Todas estas diferencias deben cero bajo el modelo neutral de evolución, y las desviaciones sugieren distintos procesos evolutivos. Estos análisis se realizaron con los programas DnaSP y Arlequín [174]. Por último, los aislamientos presentes en el mundo fueron evaluados mediante un análisis filogenético con el algoritmo *neighbour-joining* y un análisis de componentes principales mediante el programa MEGA v7.0 y la herramienta R [175].

2. Resultados

5.17 Identificación de los aislamientos de Bogotá por MALDI-TOF y VITEK-2

La identificación de los 20 aislamientos pertenecientes a diferentes localidades del país se realizó en cada hospital de donde provienen las muestras con diferentes pruebas microbiológicas y métodos automatizados que se encontraban en cada hospital. Estos métodos identificaron el microorganismo en las muestras como *Candida auris* y *Candida haemulonii* (Tabla 2). Mientras que en 16 aislamientos ambos métodos identificaron la muestra como *C. auris*, en 2 aislamientos ambos métodos la identificaron como *C. haemulonii*. En los otros 2 aislamientos un método identificó la muestra como *C. auris* y el otro como *C. haemulonii*. Adicionalmente, los resultados de la identificación de los aislamientos por MALDI-TOF, realizados en el Instituto Nacional de Salud, mostraron que todos los aislamientos corresponden a *C. auris*.

Tabla 2. Origen de las muestras y resultados de las pruebas de identificación.

Muestra	Localidad-Zona geográfica	Origen de la muestra	Microorganismo enviado*	Microorganismo VITEK-2**
1A	Localidad Teusaquillo-Norte	Sangre	*C. haemulonii*	*C. haemulonii*
2A	Localidad Puente Aranda-Sur Occidente	Líquido Cefaloraquídeo	*C. auris*	*C. auris*
3A	Localidad Teusaquillo-Norte	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
4A	Localidad Teusaquillo-Norte	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
5A	Localidad los Mártires-Centro Oriente	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
6A	Localidad Puente Aranda-Sur Occidente	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
7A	Localidad Puente Aranda-Sur Occidente	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
8A	Localidad Chapinero Alto-Norte	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
9A	Localidad Puente Aranda-Sur Occidente	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
10A	Localidad Chapinero Alto-Norte	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
11A	Localidad Chapinero Alto-Norte	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
12A	Localidad Teusaquillo-Norte	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
13A	Localidad Puente Aranda-Sur Occidente	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
14A	Localidad Santa Fe-Centro Oriente	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
15A	Localidad Usaquén-Norte	Catéter	*C. haemulonii*	*C. auris*
16A	Localidad Puente Aranda-Sur Occidente	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
17A	Localidad de Kennedy-Sur Occidente	Sangre	*C. haemulonii*	*C. auris*
18A	Localidad Puente Aranda-Sur Occidente	Secreción orotraqueal	*C. auris*	*C. auris*
19A	Localidad Barrios Unidos-Norte	Sangre	*C. auris*	*C. auris*
20A	Localidad Tunjuelito-Sur	Sangre	*C. haemulonii*	*C. haemulonii*

**Resultado de la prueba llevada a cabo por cada hospital de origen de la muestra por un método no reportado. **Prueba biquímica practicada en el LSP de Bogotá para este estudio.*

5.18 Identificación de los aislamientos de Bogotá por NGS, filtración de lecturas

Se conoce que los errores de identificación o tipificación por los métodos tradicionales son comunes, ya que en ocasiones éstos suelen tener un porcentaje de confiabilidad bajo y es necesario corroborar el resultado con una técnica molecular y análisis de las secuencias. Por consiguiente, para confirmar los anteriores resultados obtenidos mediante métodos tradicionales (Tabla 2), se realizó la identificación de los aislamientos mediante (NGS) junto con herramientas bioinformáticas.

Las secuencias de los 20 aislamientos obtenidas mediante NGS como archivos FastQC (40 archivos, dos por cada aislamiento) fueron analizadas mediante FastQC para evaluar su calidad. En términos generales se observaron lecturas entre los 25 y 250 pb con inconsistencias en el contenido de secuencias por base, contenido GC y sobreexpresión de secuencias, pero en su totalidad llegaron de buena calidad. Antes del ensamblaje, las lecturas fueron filtradas con el fin de mejorar la calidad (Anexo 1) usando la herramienta Trimmomatic con los siguientes parámetros:

CROP: Corta la secuencia a una determinada longitud especificada, eliminando las bases del final de la lectura, cortando de las 239 pb en adelante según el análisis.

HEADCROP: Corta un número específico de bases del inicio de las lecturas; se cortaron las primeras 10 pb.

SLIDINWINDOW: Evalúa con el método de “ventana deslizante” la calidad de la región comenzando desde el extremo 5´. Cuando la calidad promedio de la ventana disminuye al valor umbral permitido se elimina el resto de la secuencia.

Posteriormente, las lecturas obtenidas después de la limpieza fueron ensambladas mediante Velvet y SPades, y la calidad de los ensamblajes se evaluó con Quast. Los ensamblajes obtenidos por Velvet no mostraron la calidad esperada ya que el número de

contigs superó los 1500 y el valor N50 no alcanzó a superar los 4000 pb. Por su parte, el número de contigs obtenidos por Spades varió entre 298 y 2000, con solo tres aislamientos sobrepasando los 823 contigs. El valor N50 fue mayor de 23 000 y las profundidades de los 20 aislamientos pueden ser visualizadas en general que la mayoría de los aislamientos tuvieron más de 5Mb con unacobertura mayor a 7X (Anexo 8). Por otro lado, cuatro aislamientos mostraron valores bajos. Los ensamblajes de los 20 aislamientos mostraron una longitud de aproximadamente 12 mega bases (Mpb), que es lo esperado para *C. auris*.

La secuencia de rRNA fue usada para confirmar que estos asilamientos correspondieran a *C. auris*. Las regiones genómicas (parciales) que codifican para el rRNA para cada uno de los aislamientos fueron alineadas con secuencias del rRNA de diferentes especies de *Candida* utilizando el algoritmo MUSCLE (Anexo 2). Sus relaciones filogenéticas fueron establecidas mediante la herramienta bioinformática MEGA v7.0 La filogenia mostró que los 20 aislamientos formaron un grupo monofilético con la secuencia de referencia de *C. auris*, confirmando así la identidad de estos aislamientos (Figura 4).

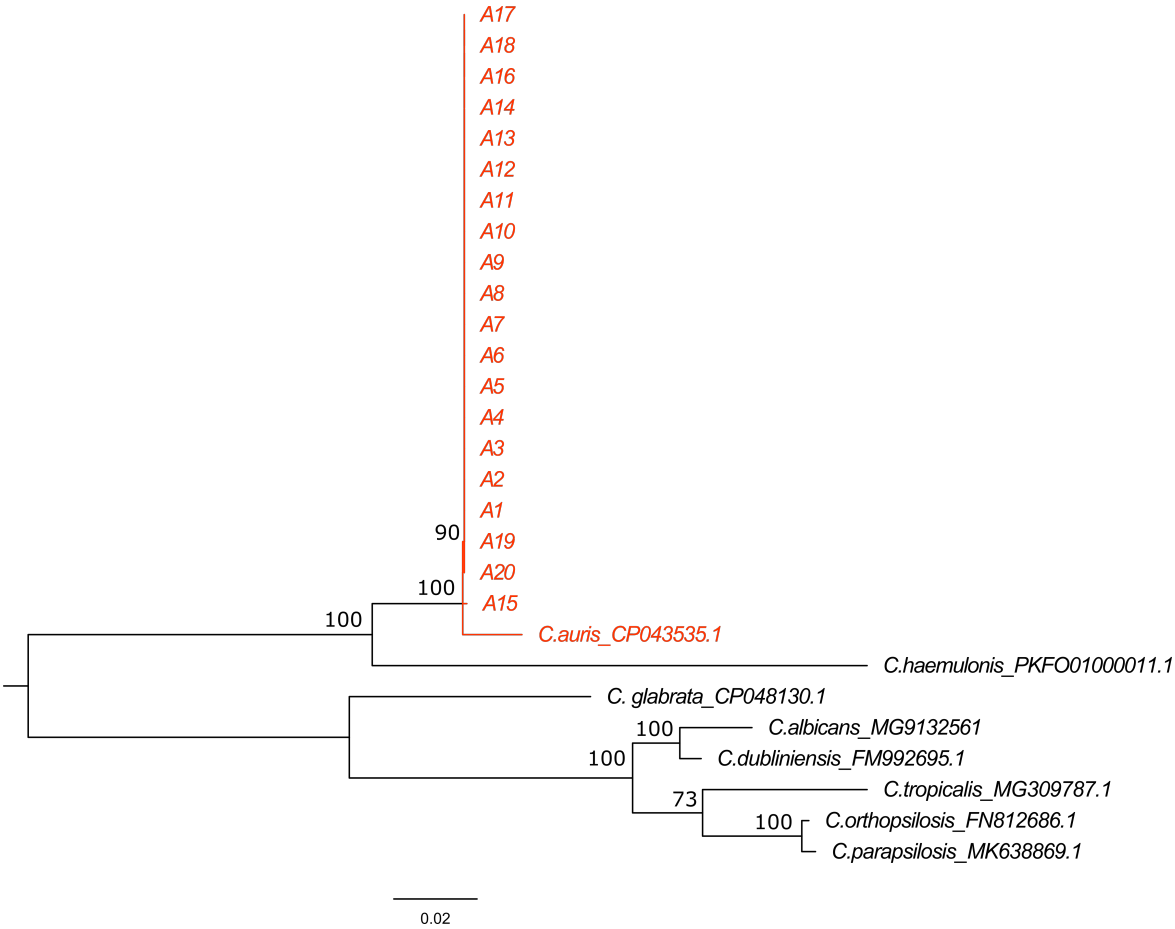


Figura 4. Filogenia inferida usando la región del rRNA. La filogenia fue inferida usando un análisis bayesiano con el modelo Kimura 2-parameter+G. Los soportes de los grupos (valores en las ramas) fueron evaluados mediante *bootstrap* con 1000 réplicas. La rama del clado de *C. auris* se resalta en color naranja, visualizando un grupo monofilético junto con la cepa de referencia B844.

5.19 Perfiles para la tipificación por MLST en *C. auris*

Dado que no se han reportado perfiles para la tipificación por MLST en *C. auris*, se seleccionaron 7 genes que se usan para esto en otras especies de *Candida* [92, 96, 169, 170]. Estos genes fueron identificados en los 20 aislamientos y alineados con el algoritmo MUSCLE. El número de alelos por cada gen así como el alelo presente en cada aislamiento fueron identificados y con base en estos datos se generó un perfil genotípico para *C. auris*.

De acuerdo a la Tabla 3, la cepa de referencia porta el genotipo “1”, mientras que los aislamientos analizados muestran diferentes perfiles alélicos a la cepa de referencia. Estos se agrupan en 3 genotipos diferentes. Los aislamientos 1A, 2A, 5A-11A, 17A, 18A y 20A mostraron “2”, el aislamiento 3A, pertenece al genotipo “3” y los aislamientos 4A, 12A-14A, 16A y 19A se agrupan en el genotipo “4” (Anexos).

Tabla 3. Matriz alélica de los 20 aislamientos de *C. auris* y de la cepa de referencia.

Aislamientos	**Gen**							**Genotipo**
	aat1a	***acc1***	***adp1***	***ala1***	***pmi1***	***vps13***	***zwf1b***	
B844	1	1	1	1	1	1	1	1
1A	2	2	2	2	2	2	2	2
2A	2	2	2	2	2	2	2	2
3A	2	3	2	2	2	2	3	3
4A	2	2	2	2	2	3	2	4
5A	2	2	2	2	2	2	2	2
6A	2	2	2	2	2	2	2	2
7A	2	2	2	2	2	2	2	2
8A	2	2	2	2	2	2	2	2
9A	2	2	2	2	2	2	2	2
10A	2	2	2	2	2	2	2	2
11A	2	2	2	2	2	2	2	2
12A	2	2	2	2	2	3	2	4
13A	2	2	2	2	2	3	2	4
14A	2	2	2	2	2	3	2	4
15A	2	2	2	2	2	2	2	2
16A	2	2	2	2	2	3	2	4
17A	2	2	2	2	2	2	2	2
18A	2	2	2	2	2	2	2	2
19A	2	2	2	2	2	3	2	4
20A	2	2	2	2	2	2	2	2

Para cada gen se identificó el número de alelos presentes. Posteriormente, se determinó cual era el alelo que portaba cada aislado en cada uno de los 7 genes. A partir de los alelos presentes en cada gen se estableció un perfil alélico (genotipo) para la cepa de referencia y los 20 aislamientos analizados.

Además, con el fin de confirmar la presencia de diferentes genotipos, se realizó el mapeo de SNP a lo largo del genoma usando a *C. auris* B844 como referencia, en el cual fueron identificados 91 199 SNP (Figura 5).

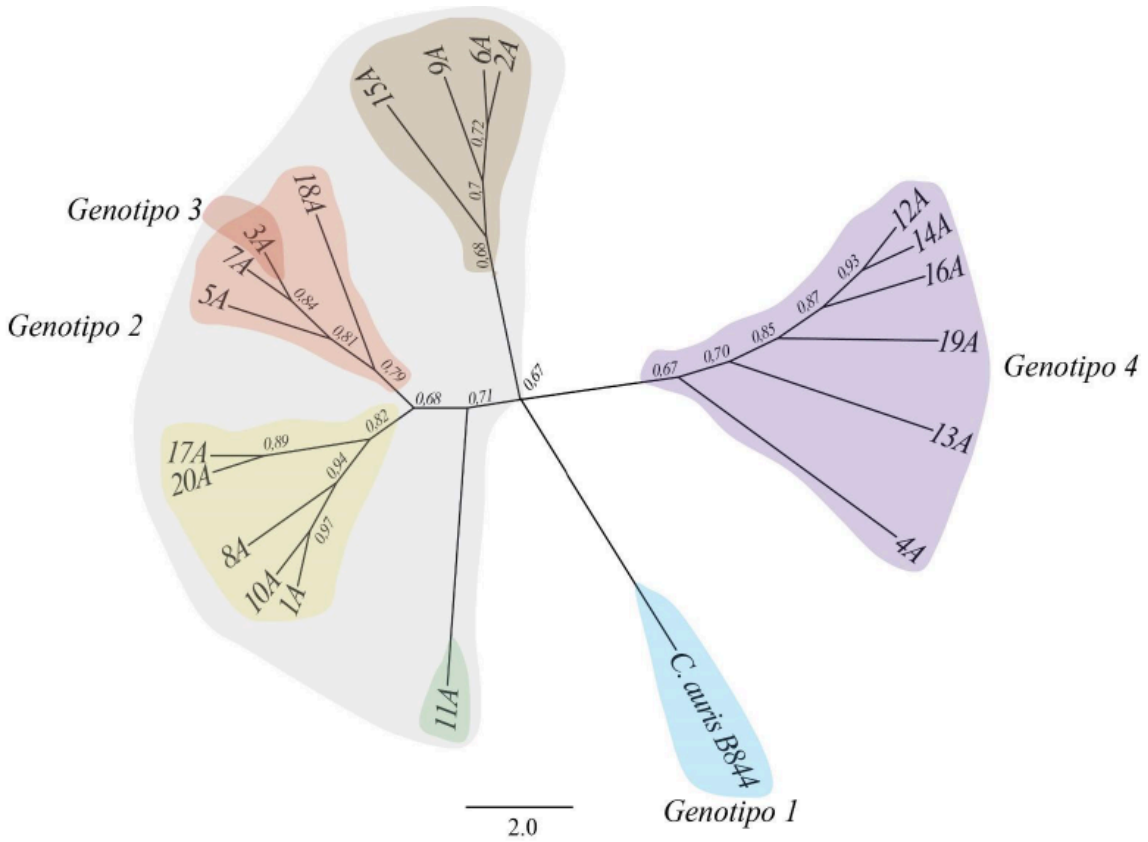


Figura 5. Filogenia inferida usando SNP identificados a lo largo del genoma de *C. auris*. La filogenia fue inferida usando 91.199 SNP mapeados a lo largo del genoma. Se observaron 6 grupos; sin embargo, los soportes estadísticos (número sobre las ramas) son bajos. Un buen soporte estadístico se considera cuando es mayor a 95 para una rama del árbol filogenético.

La filogenia mostró 3 grandes grupos (el tercero se subdivide en 4 clados), aunque con bajos soportes estadísticos, reflejan en gran medida los genotipos encontrados (Figura 5). *C. auris* B844, que tiene el genotipo 1, aparece como grupo separado (clado azul). Todos los aislamientos pertenecientes al genotipo 4 formaron un grupo monofilético (clado púrpura). Las secuencias de los aislamientos con el genotipo 2 no se agruparon en un solo

grupo sino en 4 clados diferenciados (mostrados de color gris). El primero estuvo formado por los aislamientos 2A, 6A, 9A y 15A (marrón). El segundo incluyó a los aislamientos 5A, 7A y 18A, así como los aislamientos 3A que pertenecen al genotipo 3 (rojo). Los aislamientos 1A, 8A, 10A, 17A y 20A forman el tercer sub-clado (amarillo). Finalmente, el último clado lo formó el aislamiento 11A (verde). Esto sugiere que si bien los genes usados en la tipificación por MLST permiten discriminar entre varios genotipos, esta estrategia de tipificación podría optimizarse con genes más polimórficos a los acá usados, (es decir mirar el grado de polimorfismo de cada gen, que sean lo suficientemente polimórficos para que cada aislamiento fuera un alelo diferente y así mejorar el resultado).

5.20 Mutaciones presentes en los genes de resistencia en los 20 aislamientos de *C. auris*

La resistencia a antimicóticos se evaluó mediante la búsqueda de genes asociados a resistencia en diferentes especies de *Candida* patógenas y la presencia de mutaciones descritas a la fecha en estos genes. En los veinte aislamientos de la Secretaría Distrital de Salud Pública, la mayoría de estos genes no mostraron polimorfismo, siendo completamente conservados entre ellos sin embargo, algunos genes sí mostraron variaciones (Tabla 4). Los cambios que se encontraron en algunos de los genes no están asociados a resistencia según lo reportado hasta el momento, pero si se presentaron duplicaciones en varios genes como lo son *adp1* (3 copias), *pmi1* (3 copias), *zwF1b* (dos copias), por otro lado, se presentaron cambios de mutaciones parsimoniosas (es decir, cuando se presenta un solo cambio dentro de una de las secuencias y las otras poseen el mismo nucleótido, se llama mutación singleton, mientras que, cuando hay un cambio de por lo menos dos nucleótidos en un par de secuencias se llama una mutación parsimoniosa) en los genes *vps13, zwF1b, cdr1* y *erg3* este último con sustitución de aminoácido (H771R), *erg11* (G459S) y *rpn2* (K898E), algunos aislamientos portan estos cambio y en algunos pocos aislamientos unos de estos genes no se encontraron, por lo cual se puede entender que los cambios encontrados en los genes de estos 20 aislamientos de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá tienen un perfil de cambios independiente a los ya descritos posiblemente por el origen geográfico de las muestras (Tabla 4). Los aislamientos recolectados por medio de NCBI, ninguno de ellos presentaron cambios a los

aquí reportados. Hay diferentes tipos de mutaciones, como lo son: delación, sustitución e inserción. En el presente estudio se encontraron mutaciones parsimoniosas y de sustitución.

Tabla 4. Las mutaciones son indicadas siguiendo la nomenclatura estándar. Se incluyen los genes usados en MLST, así como aquellos asociados a resistencia (GR) a diferentes antimicóticos. Algunos genes no fueron identificados en determinados aislamientos, esto puede ser porque el gen no esta presente o por inconsistencias en el ensamblaje. Descripción de las mutaciones encontradas en los 20 aislamientos de Bogotá.

Tipo	Gen	Mutaciones				Aislamiento que la porta	Aislamiento donde el gen no fue identificado
		Parsimoniosa	Singleton	Sustitución en la proteína	Duplicación		
MLST	AAT1		g.705_713ins			6A	
			n.635_638ins			11A	
MLST	ACC1		g.7601_7602ins			2A	
			g.5730 T>C			3A	
MLST/GR	ADP1				3 copias	20A	
MLST	ALA1						
MLST/GR	PMI1				3 copias	2A	
MLST	VPS13	g.4052A>G				4A,12A-14A,16A,19A	
MLST	ZWF1b	g.132C>T			2 copias	3A	
GR	CDR1	g.2312A>G		H771R	1A-3A,5A-11A,15A,17A,18A,20A		A12
GR	ERG3	g.395A>G				4A,12A-14A,16A,19A	
GR	ERG11		g.428A>G			3A	
		g.137G>A					
			g.1398T>G	G459S			
GR	FSK1						A2
GR	FLU1						
GR	GLN4						
GR	ICL1						
GR	MDR1						A6
GR	MRR1						
GR	PDH1						
			g.1471T>A				2A
GR	RPN2		g.2692A>G	K898E			10A
GR	TAC1						

5.21 Diversidad genética de los aislamientos de *C. auris* en Bogotá

La diversidad genética de los 20 aislamientos de Bogotá fue evaluada usando las diferencias en el número de SNP entre pares de secuencias (Figura 6). Las diferencias entre pares de secuencias variaron entre 33 y 534 SNP con un promedio de 260 diferencias entre las 20 secuencias. Se observaron tres agrupaciones. El primer grupo incluyó los aislamientos A13, A12, A14, A16, A19 y A4, el segundo a los aislamientos A10, A15, A17 y A20, y el tercer grupo a los aislamientos A7, A18, A1, A8, A11, A5, A3 y A9. Al

analizar la identidad de cada uno de los aislamientos se observaron las mismas tres agrupaciones (Anexo). Adicionalmente, los estimadores de diversidad genética mostraron que de 2574 sitios polimórficos entre los aislamientos, la mayoría de ellos son sitios parsimoniosos. Los bajos valores de diversidad nucleotídica (π=0,0007) (

Tabla 5) así como las diferencias de SNP entre pares de secuencias (en promedio 392) (Figura 6) demostró la baja diversidad genética que existe en estos aislamientos. Para determinar si existen desviaciones del modelo neutral de evolución molecular, fueron calculados los estimadores de Tajima y Fu & Li, los cuales mostraron valores significativamente diferentes de cero (

Tabla 5). Los valores negativos en estas pruebas sugieren el efecto de selección direccional o selección de fondo, donde un determinado genotipo está siendo seleccionado debido a una ventaja adaptativa, mientras los genotipos menos aptos reducen su frecuencia, disminuyendo la diversidad genética de la población. Esto también podría indicar una expansión poblacional, lo cual se caracteriza por un exceso de polimorfismos con bajas frecuencias. Este mecanismo explicaría el exceso de polimorfismo singleton (2030/2574) observados en estos aislamientos. Dado que este análisis se realizó a partir de SNP mapeados a lo largo del genoma, el aumento poblacional podría ser la causa más probable. Sin embargo, teniendo en cuenta que las especies de *Candida* tienen un carácter clonal, que permite que genotipos ventajosos aumenten en frecuencia en detrimento de otros genotipos, la selecciona direccional no puede ser descartada del todo. Análisis en genes específicos podría aclarar este problema.

	A20	A10	A17	A15	A8	A1	A18	A7	A9	A11	A3	A5	A19	A13	A4	A14	A12	A16	A6	A2
A20	0	73	114	128	165	166	174	176	192	230	234	245	333	332	327	384	410	434	376	404
A10	73	0	107	117	138	137	163	163	179	211	223	234	320	329	314	371	397	423	365	393
A17	114	107	0	92	203	194	204	206	220	262	270	265	361	370	359	416	442	466	412	434
A15	128	117	92	0	215	200	212	218	172	258	264	279	359	364	353	408	436	456	362	390
A8	165	138	203	215	0	33	63	61	77	113	123	138	216	221	214	273	295	323	267	291
A1	166	137	194	200	33	0	50	58	64	106	118	125	215	222	209	264	292	314	254	282
A18	174	163	204	212	63	50	0	66	76	122	128	133	221	232	217	276	300	326	264	296
A7	176	163	206	218	61	58	66	0	82	122	130	139	223	230	219	276	300	326	272	296
A9	192	179	220	172	77	64	76	82	0	128	130	147	223	226	217	274	298	322	222	246
A11	230	211	262	258	113	106	122	122	128	0	178	191	271	276	267	322	348	372	316	340
A3	234	223	270	264	123	118	128	130	130	178	0	201	273	280	265	322	344	372	312	340
A5	245	234	265	279	138	125	133	139	147	191	201	0	298	301	292	344	373	397	337	367
A19	333	320	361	359	216	215	221	223	223	271	273	298	0	93	102	143	165	187	413	437
A13	332	329	370	364	221	222	232	230	226	276	280	301	93	0	113	146	172	194	420	440
A4	327	314	359	353	214	209	217	219	217	267	265	292	102	113	0	156	181	205	405	431
A14	384	371	416	408	273	264	276	276	274	322	322	344	143	146	156	0	210	240	460	484
A12	410	397	442	436	295	292	300	300	298	348	344	373	165	172	181	210	0	266	486	504
A16	434	423	466	456	323	314	326	326	322	372	372	397	187	194	205	240	266	0	510	534
A6	376	365	412	362	267	254	264	272	222	316	312	337	413	420	405	460	486	510	0	440
A2	404	393	434	390	291	282	296	296	246	340	340	367	437	440	431	484	504	534	440	0

Figura 6. Diferencias en el número de SNP entre las secuencias de los 20 aislamientos de Bogotá.
Un color más intenso indica una menor diferencia de SNP entre secuencias. Visualizando la presencia de tres agrupaciones con menos diferencias de SNP entre estas.

Tabla 5. Estimadores de diversidad genética y del modelo neutral de evolución molecular para los 20 aislamientos de *C. auris* de Bogotá.

Sitios	**Ss**	**S**	**Ps**	**π**	**K**	**Tajima D**	**Fu & Li D***	**Fu & Li F***	**Fu Fs**
91 199	2574	2030	544	0,0043 (0,0007)	392	-1,92*	-3,05**	-2,89**	0,49

*Sitios: número de sitios analizados (SNP con respecto a la cepa de referencia), Ss: total de sitios segregantes, S: total de sitios singleton, Ps: total de sitios parsimoniosos, π: diversidad nucleotídica, K: número promedio de diferencias nucleotídicas por pares de secuencias. *= p < 0,05, **= p < 0,02.*

5.21.1 Diversidad genética de los aislamientos de *C. auris* del mundo

Además de esto, la diversidad genética de los 20 aislamientos fue evaluada usando otros aislamientos reportados en diferentes partes del mundo. En total, se utilizaron 281 secuencias del genoma completo de *C. auris,* Para analizar la diversidad genética y señales de selección natural, se alinearon todas las secuencias y se obtuvieron un total de 202 648 sitios variables (SNP). Los estimadores de diversidad mostraron que la población de Estados Unidos presenta el mayor grado de polimorfismo (π 0,11042; Ss 99575), seguido por Japón (π 0,00133; Ss 772) y Bogotá (π 0,00116; Ss 2937) (Tabla 6). Las poblaciones con el menor grado de polimorfismo fueron el Reino Unido y Sudáfrica (π 0,0002, Ss 179; π 0,00013, Ss 112). Cuando se tuvieron en cuenta todas las secuencias de Colombia, se pudo observar que esta población tiene un grado de polimorfismo intermedio, similar a las secuencias pertenecientes a Pakistán e India. Dentro de Colombia, la subpoblación de Barranquilla tuvo la menor diversidad seguida de Cartagena, que presentó una π dos veces mayor, mientras que Bogotá tuvo la mayor diversidad. Por último, es notable que todos los haplotipos son distintos, únicos, es decir ningún genoma es idéntico a otro.

Tabla 6. Estimadores de la diversidad genética en las poblaciones de secuencias de *C. auris* pertenecientes a diferentes origenes geográficos.

Población	n	Sitios	Ss	S	Ps	H	π (SD)
Bogotá	53	202648	2937	2171	766	53	0,00116 (0,00010)
Barranquilla	29	202648	640	468	172	29	0,00042 (0,00005)
Cartagena	20	202648	848	569	279	20	0,00081 (0,00010)
Colombia	102	202648	3721	2740	979	102	0,00091 (0,00007)
Japón	6	202648	772	714	58	6	0,00133 (0,00167)
Pakistán	16	202648	1168	1016	152	16	0,00094 (0,00045)
Sudáfrica	10	202648	112	91	21	10	0,00013 (0,00005)
India	17	202648	449	266	183	17	0,00047 (0,00004)
EE.UU.	105	202648	99575	10337	89065	105	0,11042 (0,02127)
Venezuela	5	202648	188	69	119	5	0,00049 (0,00010)
Reino Unido	18	202648	179	109	70	18	0,0002 (0,00002)

n: Número de secuencias analizadas; Sitios: total de sitios analizados, excluyendo gaps, Ss: número de sitios segregantes (polimórficos); S: número de sitios singleton; Ps: número de sitios parsimoniosos; π: diversidad nucleotídica; SD: desviación estándar.

Además, la mayoría de las poblaciones posee más sitios singleton que parsimoniosos, exceptuando las poblaciones de Venezuela y Estados Unidos. Este último país llama la atención por su alto número de sitios parsimoniosos y su alta diversidad.

Para evaluar si la diversidad de las poblaciones proviene de diferentes fuerzas evolutivas (deriva, selección y migración) se realizaron pruebas basadas en el modelo neutral de evolución molecular (Tabla 7). Se encontró que las (sub)poblaciones Bogotá, Barranquilla,

Colombia, Japón, Pakistán, Sudáfrica e India, arrojaron valores significativamente negativos para la prueba de Tajima D y Fu & Li y Cartagena dio estadísticamente significativo solo en la prueba de Fu & Li. Esto sugiere que el patrón de diversidad puede ser causado por un aumento de la población o por la presencia de mutaciones deletéreas y/o selección negativa. Por otro lado, las poblaciones de Estados Unidos y Venezuela no presentaron valores estadísticamente significativos, indicando que no se puede rechazar la neutralidad selectiva de las mutaciones presentes. Por último, se observaron valores negativos estadísticamente significativos en las (sub)poblaciones de Colombia, Barranquilla y Bogotá en la prueba Fs de Fu, sugiriendo un aumento reciente en el tamaño de la población o un barrido selectivo. De la misma manera que lo observado en las pruebas de neutralidad para los 20 aislamientos, una expansión de la población podría ser la causa más probable de la diversidad observada. Las otras poblaciones no presentaron valores estadísticamente significativos.

Para evaluar la diversidad genética entre países y ciudades, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) considerando agrupaciones por poblaciones (países) y subpoblaciones (ciudades dentro de países). Los grupos fueron los siguientes: Grupo 1, Colombia (Bogotá, Barranquilla y Cartagena); Grupo 2, Estados Unidos (Massachusetts, Nueva Jersey, Nueva York e Illinois); Grupo 3, India; Grupo 4, Japón; Grupo 5, Pakistán; Grupo 6, Sudáfrica; Grupo 7, Reino Unido y Grupo 8, Venezuela.

El AMOVA (Tabla 8) mostró que existe una marcada estructuración de la población entre países (F_{CT}: 0,712; valor p=0,03) y entre ciudades (F_{SC}: 0,963; valor p<0,0001). La mayor proporción (71,28%) de la variación genética total observada entre todos los aislamientos fue explicada por la variación entre poblaciones (países), mientras que la variación promedio entre subpoblaciones dentro de poblaciones (entre ciudades dentro de países; 27,66%) fue menor. Solamente el 1,06% de la variación genética total fue explicada por la diferencias dentro de las poblaciones (ciudades). Estos resultados indican que entre países existe una gran diferenciación y que ésta es menor entre ciudades dentro de un mismo país,

así como la máxima diferenciación se observa cuando se consideran las poblaciones (ciudades) con respecto a la población total (F_{ST}: 0,989; valor p<0,0001). Esto permite sugerir que se han formado grupos a nivel mundial y que los diferentes brotes pertenecientes a cada país no han tenido un gran intercambio genético a través del tiempo.

Tabla 7. Pruebas de neutralidad aplicadas en las (sub)poblaciones de *C. auris* pertenecienes a diferentes lugares geográficos.

		Tajima	**Fu & Li**		**Fu**
Población	**n**	**D (valor p)**	**D* (valor p)**	**F* (valor p)**	**Fs (valor p)**
Bogotá	53	-2,31459 (**0,0001**)	-5,29655 (**0,0001**)	-4,6678 (**0,0001**)	-5,45 (**0,014**)
Barranquilla	29	-1,88306 (**0,0001**)	-3,5049 (**0,0001**)	-3,24145 (**0,0001**)	-4,314 (**0,02**)
Cartagena	20	-1,30115 (0,086)	-2,31088 (**0,028**)	-2,14458 (**0,033**)	-0,711 (0,256)
Colombia	102	-2,53071 (**0,0001**)	-7,70587 (**0,0001**)	-6,19833 (**0,0001**)	-23,862 (**0,0001**)
Japón	6	-1,32091 (**0,008**)	-1,34479 (**0,008**)	-1,34485 (**0,008**)	2,868 (0,509)
Pakistán	16	-2,00273 (**0,001**)	-3,0091 (**0,0001**)	-2,87192 (**0,0001**)	0,173 (0,29)
Sudáfrica	10	-1,61978 (**0,006**)	-1,77217 (**0,007**)	-1,77953 (**0,007**)	-1,269 (0,152)
USA	105	0,59404 (0,798)	1,28761 (0,978)	1,12456 (0,924)	1,288 (0,476)
Venezuela	5	0,7402 (0,899)	0,7402 (0,899)	0,7402 (0,899)	2,257 (0,502)
India	17	-1,19488 (**0,027**)	-1,57006 (**0,02**)	-1,54773 (**0,022**)	-1,038 (0,15)
Reino Unido	18	-0,94384 (**0,019**)	-1,73386 (**0,019**)	-1,59534 (**0,025**)	-3,295 (0,044)

*Las pruebas basadas en el modelo neutral de evolución molecular. Los valores estadísticamente significativos son mostrados en negrilla. *= p < 0,05, **= p < 0,02.*

Tabla 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para ver si hay mayor o menor diferenciación entre las secuencias de un mismo origen geográfico o de diferente orígen geográfico.

Fuente de variación	d.f	Suma de cuadrados	Componente de la variación	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	7	5130817,587	21250,77088	71,28
Entre subpoblaciones dentro de poblaciones	5	998929,097	8247,97164	27,66
Dentro de subpoblaciones	260	82223,964	316,24601	1,06
Total	272	6211970,648	29814,98853	
Índices de fijación		**Valor p**		
$\mathbf{F_{SC}}$	0,96307	0,0001		
$\mathbf{F_{ST}}$	0,98939	0,0001		
$\mathbf{F_{CT}}$	0,71275	0,03226		

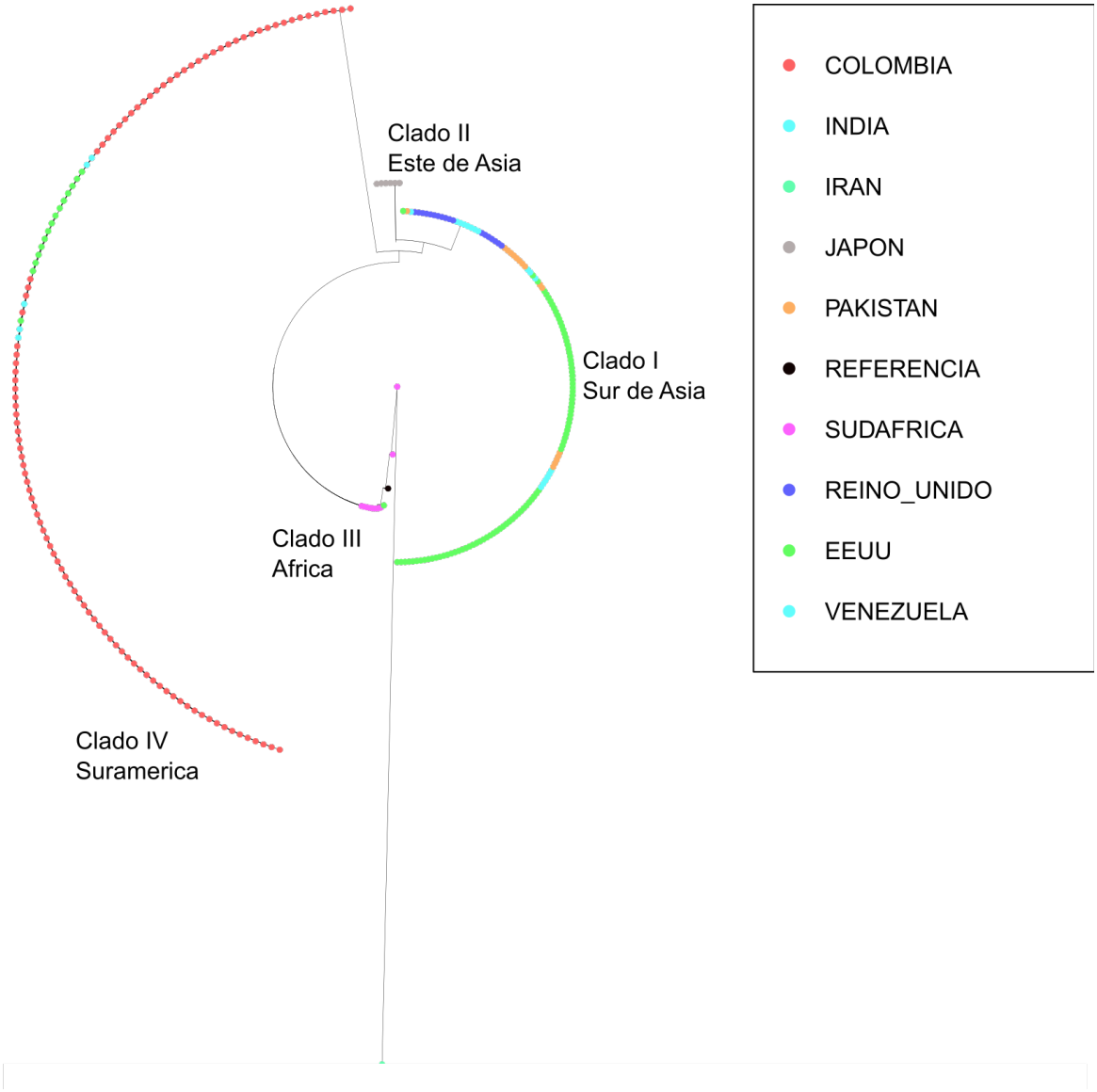
	Bogotá	Cartagena	Barranquilla	Venezuela	Illinois	Sudáfrica	Japón	Reino Unido	Massachussets	NuevaYork	NuevaJersey	Pakistán	India
Bogotá	0	0,032	0,04	0,281	0,342	0,998	0,997	0,998	0,949	0,998	0,998	0,997	0,998
Cartagena	0,032	0	0,071	0,468	0,474	0,999	0,998	0,999	0,888	0,999	0,999	0,998	0,999
Barranquilla	0,04	0,071	0	0,598	0,585	0,999	0,999	0,999	0,918	0,999	0,999	0,999	0,999
Venezuela	0,281	0,468	0,598	0	0,608	0,999	0,998	0,999	0,705	0,999	0,999	0,998	0,999
Illinois	0,342	0,474	0,585	0,608	0	0,999	0,998	0,999	0,844	0,999	0,999	0,998	0,999
Sudáfrica	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	0	0,997	0,999	0,651	0,998	0,997	0,995	0,997
Japón	0,997	0,998	0,999	0,998	0,998	0,997	0	0,998	0,654	0,998	0,997	0,995	0,996
Reino Unido	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,998	0	0,409	0,691	0,656	0,28	0,338
Massachussets	0,949	0,888	0,918	0,705	0,844	0,651	0,654	0,409	0	0,691	0,503	0,369	0,388
NuevaYork	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	0,998	0,998	0,691	0,691	0	0,42	0,42	0,441
NuevaJersey	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	0,997	0,997	0,656	0,503	0,42	0	0,354	0,398
Pakistan	0,997	0,998	0,999	0,998	0,998	0,995	0,995	0,28	0,369	0,42	0,354	0	0,041
India	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	0,997	0,996	0,338	0,388	0,441	0,398	0,041	0

Figura 7. Matriz simétrica de valores F_{ST} pareados entre poblaciones. Colores más intensos representa menor diferenciación. Todos los valores fueron estadísticamente significativos (Anexo).

En la matriz de valores de F_{ST} pareados se pueden observar principalmente dos grupos. El primero está conformado por Bogotá, Cartagena y Barranquilla los cuales tuvieron bajos valores de F_{ST}, lo cual indica una muy baja diferenciación, es decir, que son poblaciones muy similares entre sí. Además de esto, se observaron bajos valores de F_{ST} entre las subpoblaciones colombianas (Bogotá, Barranquilla y Cartagena) y las (sub)poblaciones de Venezuela e Illinois, indicando poca diferenciación (Figura 7). El segundo grupo con bajos valores de F_{ST} estuvo conformado por Reino Unido, Massachusetts, Nueva York, Nueva Jersey, Pakistán e India, mostrando una gran similitud entre estas poblaciones. Por otro lado, las poblaciones de Sudáfrica y Japón tuvieron altos valores de F_{ST} en las comparaciones con las otras poblaciones, indicando una gran diferenciación con todas las demás poblaciones analizadas. De manera similar a lo observado en el AMOVA, los dos grupos observados incluyeron por un lado a las ciudades colombianas y por otro a las ciudades estadounidenses. Los resultados anteriores concuerdan con el hecho general de que las poblaciones ubicadas a una mayor distancia geográfica presentan mayor diferenciación.

Por último, un análisis filogenético y uno de componentes principales usando los SNP entre las secuencias genómicas fueron realizados para explorar más detalladamente las relaciones entre los aislamientos de Bogotá y los del resto del mundo. El análisis filogenético de todos los aislamientos del mundo mostraron que los 20 aislamientos de Bogotá se ubican en el clado IV, denominado Suramérica (incluye aislamientos de los países Colombia, Estados Unidos y Venezuela) (Figura 8), indicando que los casos de Bogotá no correspondieron a introducciones nuevas desde otras regiones geográficas. Un análisis detallado de este clado mostró que los aislamientos identificados en este estudio no forman un grupo monofilético, sino que se agruparon con secuencias de diferentes partes de Colombia, indicando que no pertenecen a un único brote restringido localmente sino que existe transmisión entre las diferentes ciudades (Figura 9). Notablemente, algunas secuencias estuvieron separadas por una mayor distancia genética, como lo indicaron las largas ramas en el árbol filogenético. Adicionalmente, algunas secuencias identificadas en este estudio (los aislamientos A4, A14, A12, A13, A19, y A16) se agruparon con

secuencias de Venezuela y Florida, sugiriendo que estos aislamientos pueden derivar del brote de esta región de Colombia de 2017 y que ha habido una transmisión continúa posiblemente no identificada.



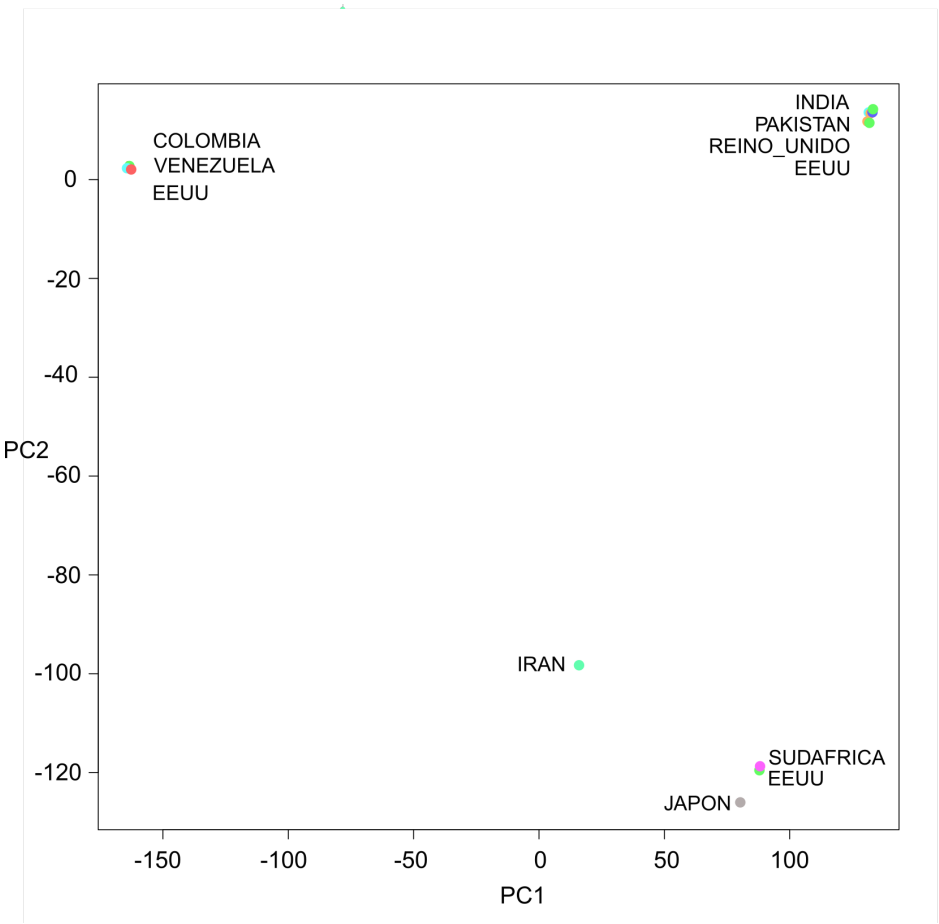


Figura 8. Árbol filogenético y análisis de componentes principales de los 281 aislamientos de *C. auris* del mundo. El árbol fue inferido con el algoritmo *neighbor-joining*. Los colores son los mismos para el árbol (arriba) y el análisis de componentes principales (abajo).

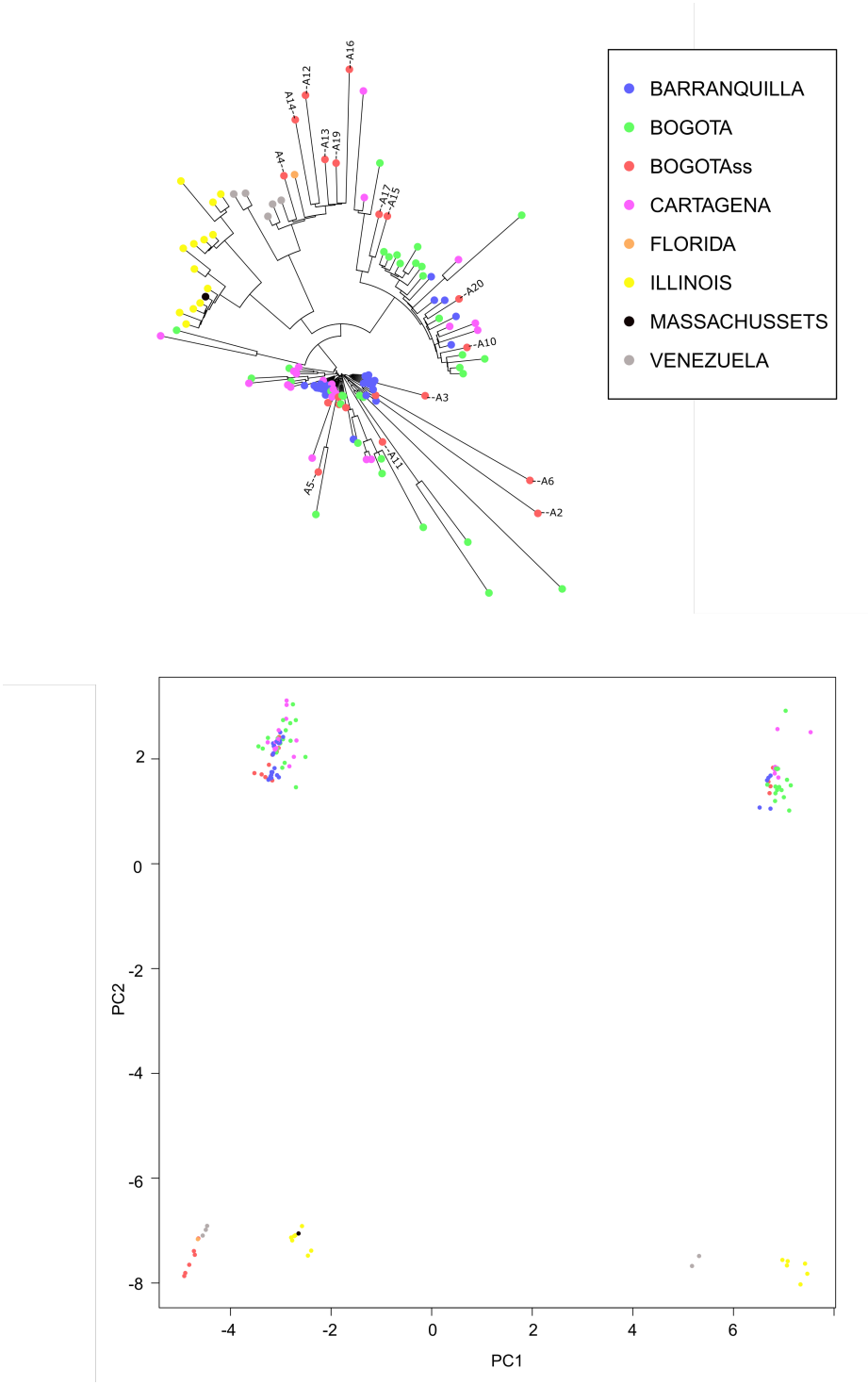


Figura 9. Árbol filogenético y análisis de componentes principales de los aislamientos de *C. auris* del clado de Suramérica.
El árbol fue inferido con el algoritmo *neighbor-joining*. Los nombres de los 20 aislamientos de Bogotá (grupo BOGOTÁss) son incluidos en el árbol. Los colores son los mismos para el árbol (arriba) y el análisis de componentes principales (abajo).

3. Discusión

Candida auris empezó a identificarse de manera global desde hace diez años en diferentes hospitales del mundo, presentándose en forma de brotes. Tal acontecimiento provocó una alarma a la OMS. Desde ese entonces, se han presentado algunos inconvenientes en el control de este patógeno, tal como su difícil identificación de forma rápida y eficaz, la ausencia de información genética sobre el origen y procedencia de los aislamientos y, por último, su resistencia a múltiples antimicóticos así como la falta de conocimiento sobre los mecanismos moleculares o genes que pueden contribuir con ésta. Por tal razón, en el presente estudio, se buscó dar a conocer la caracterización de la diversidad genética y la presencia de mutaciones asociadas con resistencia a antimicóticos de aislamientos de *C. auris* obtenidos de infecciones invasivas en la red de hospitales del laboratorio de Salud Pública de Bogotá entre los años 2018 y 2019. Esto contribuirá a aportar en el conocimiento para el control de *C. auris*.

Los métodos estándar para la identificación de microorganismos involucran paneles de pruebas que pueden incluir una combinación de pruebas colorimétricas de enzimas, pruebas de asimilación y pruebas de crecimiento que utilizan carbohidratos y compuestos nitrogenados. Los sistemas de identificación comercial automatizados como VITEK se basan en tarjetas desechables que contienen varias pruebas bioquímicas convencionales incorporadas en pocillos de microtitulación que se utilizan para identificar un microorganismo. El control de *C. auris* es difícil debido a que estos métodos convencionales usualmente la identifican como otras especies de *Candida*, lo cual hace que tales métodos no sean efectivos para su uso de rutina. Esto ha hecho necesarias tecnologías más avanzadas y específicas para su correcta identificación.

Los resultados de los análisis microbiológicos fenotípicos realizados en los centros de salud identificaron las muestras A1, A15, A17 y A20 como *Candida haemulonii* (Tabla 2). Sin embargo, dos de estas muestras (A15 y A17) fueron identificadas como *C. auris* por el LPS usando VITEK-2 (Tabla 2). Como ha sido previamente reportado [79, 85, 86, 176], la espectrometría de masas MALDI-TOF fue el método más acertado, ya que los 20 aislamientos fueron correctamente identificados como *C. auris* (Tabla 2). Por lo tanto, estos resultados confirman la exactitud del método MALDI-TOF. Además, el sistema automatizado VITEK-2 demostró ser un buen método de identificación, aunque en algunas ocasiones puede producir algunos errores, lo cual ha sido reportado en estudios previos [12, 28]. Se ha observado que, aunque la versión 8.01 del sistema de identificación (que incluye a *C. auris* dentro de su base de datos) tiene una capacidad limitada para identificar correctamente a *C. auris*, su identificación resulta ser mucho más confiable que con las versiones anteriores [28]. En un estudio previo realizado en Colombia en el año 2017, el método VITEK-2 identificó 17 aislamientos de *C. auris* erróneamente como *C. haemulonii*, *C. famata*, *C. albicans* o *C. tropicalis* [23]. Se ha sugerido que una causa de estos errores de identificación por métodos fenotípicos convencionales es la cercana relación filogenética de *C. auris* con *C. haemulonii* y otras especies de *Candida* [61].

Utilizando las regiones que codifican para el rRNA de diferentes especies de *Candida*, los análisis filogenéticos demostraron que los 20 aislamientos correspondían a *C. auris*. Esto se pudo observar como una agrupación de los 20 aislamientos junto con la secuencia de referencia de *C. auris.* Esto mismo se pudo apreciar en los árboles filogenéticos realizados con diferentes métodos, ya que todos presentaron una topología similar (Anexos). Este hecho resalta la gran importancia de que siempre un resultado de identificación para *C. auris* esté apoyado por un método molecular.

El perfil de MLST es una técnica de tipificación que permite la identificación no ambigua de microorganismos. Esta técnica permite distinguir múltiples alelos por *locus* y así altos niveles de discriminación entre aislamientos; sin embargo, su efectividad es dependiente

de los genes utilizados [18]. Diferentes perfiles de MLST han sido utilizados para el análisis de la diversidad genética de [166] *C. auris* , pero no se han definido perfiles que permitan la identificación correcta de aislamientos clínicos. Por tal razón, en este estudio se utilizaron siete genes (*aatla, acc, adp1, ala1, pmil vps13, zwf1b*) que son parte de perfiles de MLST en otras especies de *Candida* para evaluar su utilidad como método de identificación. Los perfiles agruparon los 20 aislamientos de *C. auris* en 4 genotipos diferentes. No obstante, las relaciones filogenéticas de estos aislamientos mostraron que estos se pueden agrupar en seis grupos (Tabla 3 y Figura 5). Es decir, que aunque se pueden diferenciar varios genotipos, se podría optimizar el perfil de tipificación con genes más polimórficos a los usados. Otras propuestas de perfiles de MLST han sido reportadas. Por ejemplo, en el estudio de Kwon y colaboradores en el 2019 [18], usando aislamientos pertenecientes a Corea del Sur, se realizó una propuesta de MLST que incluyó cuatro genes (*RPB1*, *RPB2* y los que codifican las regiones ITS y D1/D2). Por otro lado, Prakash y colaboradores realizaron la técnica de MLST utilizando los mismos genes que el estudio de Kwon [79]. Éstos utilizaron aislamientos provenientes de India, Japón, Corea y Sudáfrica, los cuales formaron tres grupos, tal como se observó en el árbol filogenético de unión de vecinos basado en secuencias concatenadas de los cuatro *loci* de todos los aislamientos de *C. auris*. Esto demostró una población heterogénea de *C. auris*. Análisis adicionales son necesarios para definir un perfil adecuado de MLST que pueda ser usado para identificar correctamente aislamientos clínicos de *C. auris* así como evaluar su diversidad genética.

C. auris se caracteriza por presentar altas tasas de resistencia a los antimicóticos usados como primera línea. En la última década, *C. auris* ha emergido como un organismo resistente a múltiples antimicóticos, causante de infecciones nosocomiales, en más de 30 países [177]. En los aislamientos de Bogotá analizados no se encontraron cambios en los genes asociados a resistencia; sin embargo, sí se observaron duplicaciones en algunos genes como lo son *adp1* (3 copias), *pmi1* (3 copias) y *zwF1b* (dos copias). Estos genes se asocian a resistencia en *C. albicans*. Las duplicaciones en estos genes podrían generar una ventaja en los aislamientos que las portan debido a un ‘efecto de dosis de proteína’ [178]

que podría asociarse con resistencia. Posteriores análisis funcionales son necesarios para confirmar esta hipótesis. Además, se observaron mutaciones parsimoniosas en los genes *vps13, zwF1b, cdr1* y *erg3*, algunos de los cuales presentaron sustituciones de aminoácido (*erg3*, *erg11* y *rpn2*). Ninguna de estas sustituciones no sinónimas ha sido asociada a resistencia en *C. auris*. Los polimorfismos F126L, Y132F y K143R en *ERG11* y S639F en *FKS1*, que se asocian a resistencia a azoles y equinocandinas, respectivamente [179], no fueron observados en ninguno de los aislamientos acá analizados. Por otro lado, Escandón y colaboradores en el 2019 [24] observaron cinco mutaciones no sinónimas en aislamientos del centro y norte de Colombia, una de las cuales estuvo asociada con resistencia al fluconazol. Sin embargo, estos cambios tampoco fueron observados en los aislamientos bogotanos analizados en este estudio.

A pesar de que las muestras analizadas en este estudio pertenecieron únicamente a infecciones invasivas aisladas de hospitales, no hay razón para pensar en que esto haya impactado los resultados de los análisis de diversidad, ya que las muestras provinieron de diferentes partes de Bogotá y fueron obtenidas en diferentes momentos durante el periodo de estudio, descartando así que pertenecieran a un brote nosocomial definido. Además de esto, los resultados que mostraron un número de SNP variado entre aislamientos y la heterogeneidad mostrada en los arboles filogenéticos sugieren que los aislamientos son al menos en parte independientes, ya que hubo grupos de aislamientos con mayor similitud genética. A pesar de lo anterior, dado que no se obtuvo la evidencia epidemiológica necesaria para definir la independencia de las muestras, sumado a la gran tendencia de *C. auris* a producir cadenas de transmisión silente [180] implica que los aislamientos más relacionados sí pueden tener cierta dependencia, haciendo a los resultados de diversidad genética conservadores; sin embargo, es de aclarar que esto es una situación común en este tipo de estudios. Futuros estudios que consideren un muestreo más amplio, como muestras de tamizado para *C. auris*, pueden ayudar a tener un estimado menos conservador de la diversidad genética de este patógeno.

Aunque los análisis de diversidad genética de los 20 aislamientos de *C. auris* de Bogotá mostraron bajos valores de diversidad (Tabla 5), los SNP entre pares de secuencias variaron entre 33 y 534, observándose 3 agrupaciones (Figura 6). Las grandes diferencias de SNP pueden indicar que los aislamientos no son clonales ni pertenecen a un único brote. Esta idea es soportada por el hecho de que cuando existe clonalidad entre aislamientos, tal como en la transmisión entre pacientes, se espera que haya menores diferencias de SNP. En Alemania, dos aislamientos tomados de un mismo paciente en momentos diferentes solamente presentaron un SNP de diferencia [181]. De la misma manera, en EE.UU., la diferencia de SNP entre aislamientos dentro de pacientes varió de cero a cinco [136]. Además, se ha observado que, dentro de un mismo brote, los aislamientos de pacientes que adquirieron la infección en un mismo centro de salud presentaron diferencias de SNP que variaron de 0 a 12 [136]. Por lo tanto, las diferencias de SNP observadas en los 20 aislamientos bogotanos indican que éstos no provienen de eventos de transmisión inmediatos entre pacientes. Asimismo, la heterogeneidad genética mostrada por estos 20 aislamientos podría sugerir que no pertenecen a un único brote.

Adicionalmente, varias pruebas para probar la hipótesis de la mutación neutral fueron llevadas a cabo en los 20 aislamientos de Bogotá. Las pruebas de Tajima y de Fu & Li dieron valores significativamente negativos, mientras que la de Fu no fue significativa (Tabla 5). Estos resultados indican que existen más alelos de baja frecuencia que lo esperado bajo el modelo de neutralidad [171, 172], lo cual es esperado en modelos de crecimiento de la población, *hitchhiking* genético y selección de fondo [173]. Dado que este análisis se realizó a partir de SNP mapeados a lo largo del genoma, el modelo de expansión poblacional puede ser el que más explica la diversidad observada [173].

Al analizar secuencias de varias poblaciones del mundo, se pudo observar que Colombia tuvo un grado de polimorfismo intermedio. Dentro de esta población, las subpoblaciones de Bogotá, Barranquilla y Cartagena también presentaron una diversidad intermedia y entre ellas la más alta se observó en Bogotá. Estos resultados contrastan con lo observado

en población de EE.UU., la cual presentó una diversidad muy alta con respecto a Colombia (π cuatro órdenes de magnitud mayor). Además, un análisis de la estructura genética usando todas estas secuencias indicó una fuerte estructuración de la población (Tabla 8), lo cual fue evaluado más a fondo usando índices F_{ST} pareados (Figura 7). Se observó que mientras que las subpoblaciones colombianas (Bogotá, Barranquilla y Cartagena) tuvieron valores de F_{ST} entre 0,03 y 0,07, los valores de las subpoblaciones de EE.UU (Nueva York, Nueva Jersey y Massachusetts) estuvieron entre 0,4 y 0,69, indicando que la alta diversidad observada en EE.UU. es debido a una fuerte estructura de la población, lo cual no fue observado en Colombia.

Los análisis de ajuste al modelo neutral de evolución molecular mostraron valores negativos estadísticamente significativos en las subpoblaciones Bogotá y Barranquilla en las cuatro pruebas (Tabla 7), indicando que la diversidad en éstas es compatible con modelos de crecimiento de la población, *hitchhiking* genético y selección de fondo [173]. Interesantemente, la subpoblación de Cartagena mostró valores significativamente negativos solamente para las pruebas de Fu & Li, sugiriendo que la selección de fondo es el modelo que mejor explica la diversidad observada [173]. Al considerar a Colombia como una población única, las pruebas de ajuste al modelo neutral también fueron estadísticamente significativas con valores negativos. Estos resultados indican que, al igual que en las otras (sub)poblaciones con valores negativos, hay una menor diversidad que lo esperado bajo el modelo neutral de evolución. Los valores negativos también indican que la diversidad observada en Colombia no se ajusta a un modelo de subdivisión de la población, lo cual es soportado por los bajos valores de F_{ST} entre las subpoblaciones colombianas.

La secuenciación de genomas completos de *C. auris* ha identificado cinco poblaciones principales de este patógeno que forman clados definidos según su geografía [9, 119]. Estos clados se han denominado Sur de Asia (I), Este de Asia (II), África (III), Suramérica (IV) e Irán (V). El análisis filogenético y de componentes principales mostro que los 20

aislamientos de Bogotá se agruparon en el clado de Suramérica (IV) (Figura 8). Como lo indicaron los análisis de diversidad, la población de EE.UU. mostró la presencia de aislamientos pertenecientes a cuatro de los clados, lo que explica la alta diversidad genética de esta población. Con ayuda de datos epidemiológicos se demostró que algunos pacientes estadounidenses se infectaron con aislamientos de los diferentes clados [136]. Esta propagación de *C. auris* en los Estados Unidos demuestra que los viajes y / o la migración tienen un papel importante en la propagación de esta enfermedad.

Interesantemente, a pesar de que dentro del clado IV se observaron tres agrupaciones tanto en el análisis filogenético como en el de componentes principales, los aislamientos colombianos no se agruparon geográficamente (Figura 9). Esto indica que existe trasmisión entre las diferentes ciudades de Colombia y concuerda con los bajos valores de F_{ST} pareados entre estas subpoblaciones (Figura 7) y con los valores negativos en las pruebas de ajuste al modelo neutral de evolución en la población de Colombia (Tabla 7). Sin embargo, en el presente estudio no se contó con datos epidemiológicos sobre estos aislamientos que pudieran ayudar a determinar la razón de esta posible trasmisión. Además, los aislamientos A4, A14, A12, A13, A19, y A16 se agruparon con aislamientos de Florida y Venezuela (Figura 9) [21]. Este aislamiento de Florida proviene de un caso de un individuo previamente infectado en Venezuela que, notablemente, también había sido mal identificado como *C. haemulonii* [136]. El agrupamiento de estás secuencias sugiere que los aislamientos provienen de un mismo brote; sin embargo, es notable las ramas largas de algunos aislamientos dentro de este grupo así como de otros aislamientos de este clado (incluyendo otros de los 20 aislamientos de Bogotá), lo cual sugiere aislamientos no muestreados. Dado que la trasmisión silente es común en *C. auris* [180], pueden existir aislamientos no detectados en los brotes presentes en el país. Todos estos resultados indican una trasmisión continua y generalizada de *C. auris* en el país, como había sido previamente sugerido [24].

4. Conclusiones y recomendaciones

La candidiasis es un problema de salud pública que en la última década ha causado brotes asociados a la atención en salud, infecciones invasivas y fungemia en más de 30 países en los cinco continentes [16]. Los pacientes afectados van desde recién nacidos hasta ancianos o pacientes con enfermedades que son factor de riesgo, y su errónea identificación tiene un papel importante en la mortalidad de estos pacientes [17].

Conclusiones

Los 20 aislamientos de la red de hospitales del laboratorio de Salud Pública de Bogotá aislados entre el 2018 y el 2019 fueron identificados como *Candida auris* mediante NGS y MALDI-TOF las cuales son asertivas y confiables. Técnicas convencionales como VITEK-2 (tarjetas de identificación bioquímicas) pueden ser utilizadas pero soportadas con un protocolo de diagnóstico molecular es lo ideal para identificar este microorganmismo.

Una herramienta de gran potencial que puede ser utilizada es la de tipificación de secuencia multilocus. En donde se observó que los perfiles obtenidos agruparon los veinte aislamientos de *C. auris* en cuatro genotipos diferentes, aunque las relaciones filogenéticas mostraron que estos forman tres grupos que se subdividieron, se debe continuar con la búsqueda de nuevos genes con múltiples alelos por locus que puedan ser usados para distinguir entre aislamientos.

Se evaluó la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia antimicótica de los veinte aislamientos de *C. auris* mediante una búsqueda de genes asociados con resistencia en *Candidas* patógenas. Notablemente, aunque los aislamientos de Bogotá

no presentaron cambios ya reportados en los genes asociados a resistencia, sí se observó un perfil de ressitencia en algunos genes único para estos aislmaientos de Bogotá.

Aunque los análisis de diversidad genética de los 20 aislamientos de Bogotá mostraron valores de diversidad intermedios, las diferencias de SNP observadas mostraron que estos aislamientos no son clonales. Además, los resultados indicaron un mayor número de alelos de baja frecuencia que lo esperado para una población bajo el modelo neutral, lo cual es esperado en modelos de crecimiento de la población, los índices F_{ST}, el análisis de componentes principales y los análisis filogenéticos mostraron una baja estructuración dentro de las subpoblaciones de Colombia, la cual contrastó marcadamente con la de EE.UU. Todo esto sugiere la ausencia de trasmisión entre aislamientos colombianos y que éstos no pertenecen a un único brote localizado, sino más bien apoyando la idea de un brote generalizado en Colombia.

Recomendaciones

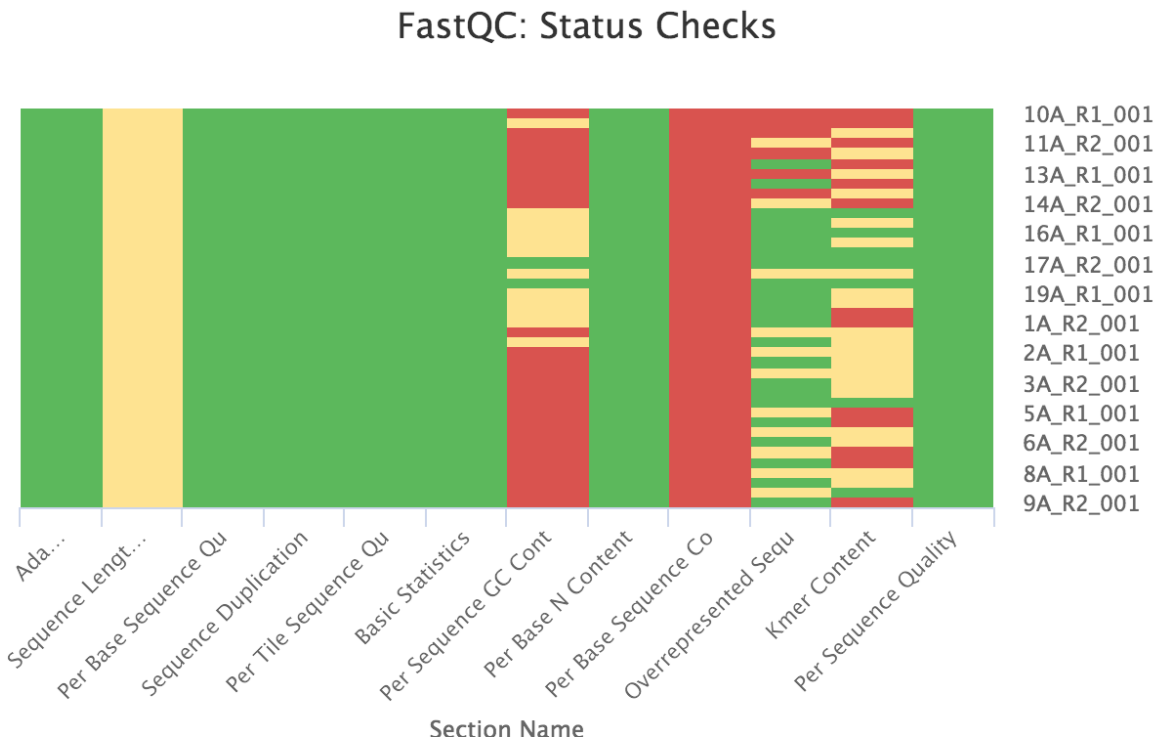
En el perfil de MLST para *C. auris* es importante utilizar genes más polimórficos a los ya seleccionados en el presente estudio ya que de esta manera, se pueden obtener otro tipo de candidatos y reducir el error en el momento de agrupar los aislamientos.

Se recomienda realizar pruebas de susceptibilidad antimicótica a los aislamientos bogotanos para buscar posibles mutaciones nuevas que puedan asociarse con antimicóticos específicos. De esta forma, se incrementaría la lista de genes con mutaciones asociadas a resistencia a la primera línea de antimicóticos específicos de *C. auris*, lo cual sería de gran utilidad en los hospitales para el control de esté patógeno. Esto, además, permitiría evaluar las duplicaciones de genes que podrían estar asociadas a resistencia.

Por último, el uso de datos epidemiológicos completos sobre estos aislamientos puede ayudar a determinar la razón de la posible trasmisión observada entre ciudades. Esto habría sido de gran ayuda para obtener una confirmación de los resultados filogenéticos con respecto a la trasmisión de este patógeno.

5. Anexos

6 Anexo 1: Datos de las 20 secuencias que llegaron de Illumina, Directo (R1) y Reverso (R2) por medio de un MultiQC


FastQC: Status Checks
10A_R1_001
11A_R2_001
13A_R1_001
14A_R2_001
16A_R1_001
17A_R2_001
19A_R1_001
1A_R2_001
2A_R1_001
3A_R2_001
5A_R1_001
6A_R2_001
8A_R1_001
9A_R2_001
Ada...
Sequence Lengt...
Per Base Sequence Qu
Sequence Duplication
Per Tile Sequence Qu
Basic Statistics
Per Sequence GC Cont
Per Base N Content
Per Base Sequence Co
Overrepresented Sequ
Kmer Content
Per Sequence Quality
Section Name

7 Anexo 1: Reporte deQuast de las 20 secuencias luego de su respectivo ensambjale en Spades

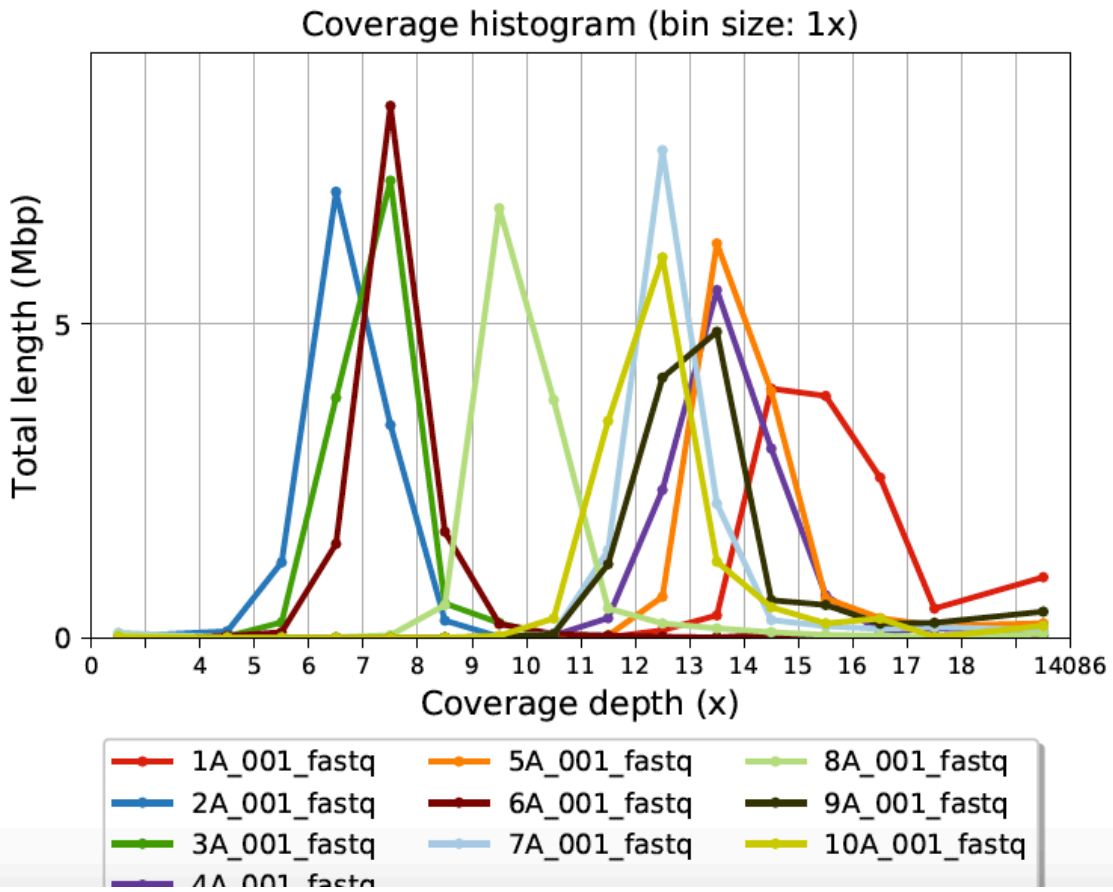
	1A_001_fastq	2A_001_fastq	3A_001_fastq	4A_001_fastq	5A_001_fastq	6A_001_fastq	7A_001_fastq	8A_001_fastq	9A_001_fastq	10A_001_fastq
# conting (> = 0 bp)	1283	3112	1999	972	1548	2284	4224	3422	1177	2021
# conting (> = 1000 bp)	308	1800	1020	339	388	388	410	531	310	334
Largo total (>=0 bp)	12598417	12432538	12561551	12498316	12514023	12640435	13640302	13263063	12545183	12861250
Largo total (>= 1000pb)	12276322	12034805	12219623	12259690	12169376	12169376	12281256	12270292	12251356	12277082
# contigs	328	2008	1095	374	410	1215	551	620	326	365
Contig más grande	207564	59446	93651	342725	205387	90140	211775	160631	204800	218721
Largo total	12289728	12190652	12275267	12301486	12275245	12236198	12365999	12329186	12262850	12297620
GC (%)	45.13	45.15	45.13	45.15	45.12	45.13	45.16	45.12	45.13	451.4
N50	69782	9478	19390	59979	53782	16130	48276	39451	67128	60285
N75	37360	5441	10397	33142	28643	9538	28316	22454	37933	34017
L50	56	410	192	61	68	228	76	100	58	61
L75	119	826	411	129	147	469	159	202	119	131
# N`s per 100 kpb	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

	11A_001_fastq	12A_001_fastq	13A_001_fastq	14A_001_fastq	15A_001_fastq	16A_001_fastq	17A_001_fastq	18A_001_fastq	19A_001_fastq	20A_001_fastq
# conting (> = 0 bp)	3154	3167	2702	3293	927	1126	623	631	722	1064
# conting (> = 1000 bp)	630	736	476	659	275	437	331	293	411	362
Largo total (>=0 bp)	131265980	13112899	13106410	13159006	12465760	12465760	12517323	12360231	12368511	12488350
Largo total (>= 1000pb)	12265980	12253538	12280866	12254853	12244502	12290687	12277408	12256241	12272722	12249941
# contigs	698	823	649	747	298	462	343	315	435	394
Contig más grande	128931	131903	147383	108059	377581	256196	261877	261877	181566	269393
Largo total	12310957	12312546	12390905	12313195	12259474	12307753	12285934	122711303	12289255	12272615
GC (%)	45.14	45.13	45.29	45.13	45.14	45.15	45.15	45.15	45.14	45.14
N50	31772	26942	43001	29843	69847	49765	62116	73620	51549	55476
N75	17749	14872	24008	17160	42908	27544	35427	38494	28930	31497
L50	122	141	93	133	52	79	59	51	76	62
L75	251	291	190	267	108	162	122	106	157	137
# N`s per 100 kpb	2.46	10.66	3.39	6.54	0.49	0.54	2.10	2.81	2.38	2.54

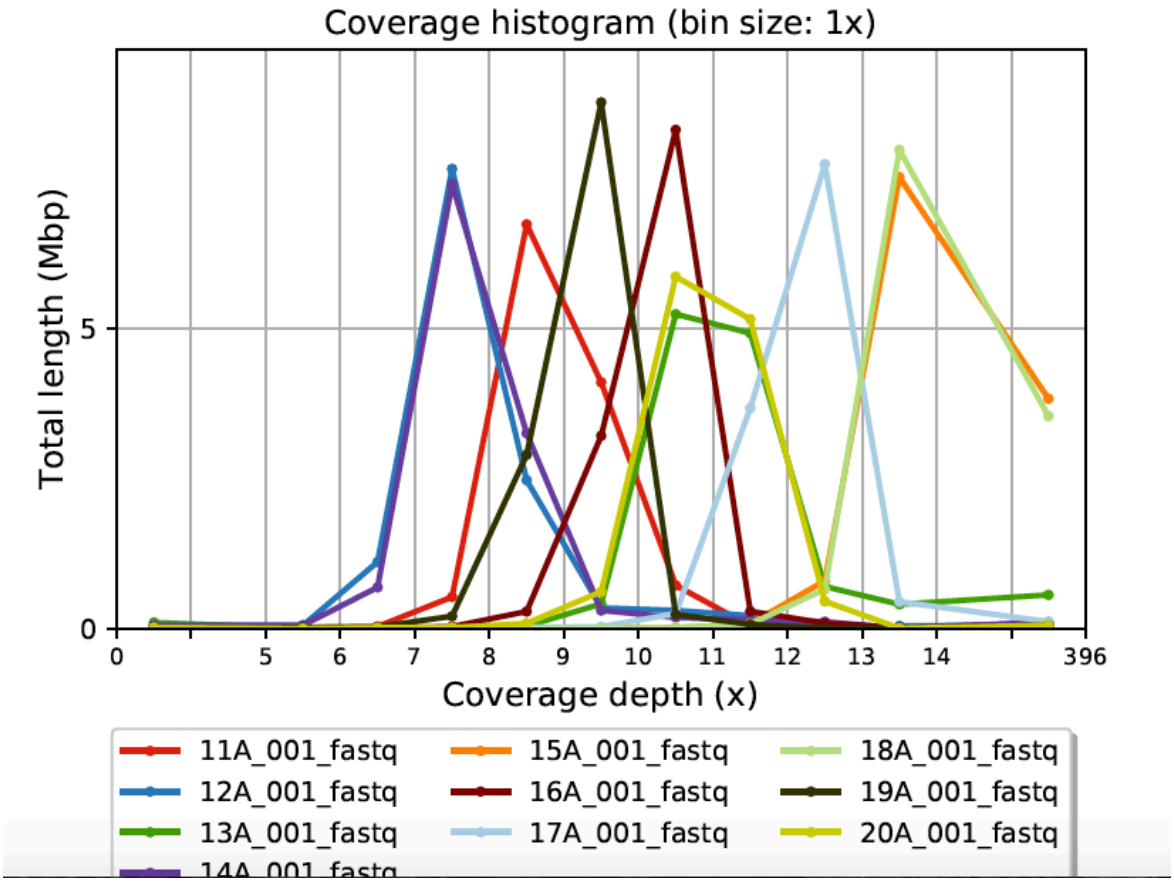
Todas las estadísticas se basan en contigs de tamaño> = 500 pb, a menos que se indique lo contrario (por ejemplo, "# contigs (> = 0 bp)" y "Longitud total (> = 0 bp)" incluyen todos los contigs).

8 Anexo 1 Reporte de FastQC, en donde reportó las profundidades de las 20 secuencias

Anexos: Se puede visualizar cada uno de las profundidades de los 20 aislamientos de Bogotá, los cuales e enviaron a secuenciar.

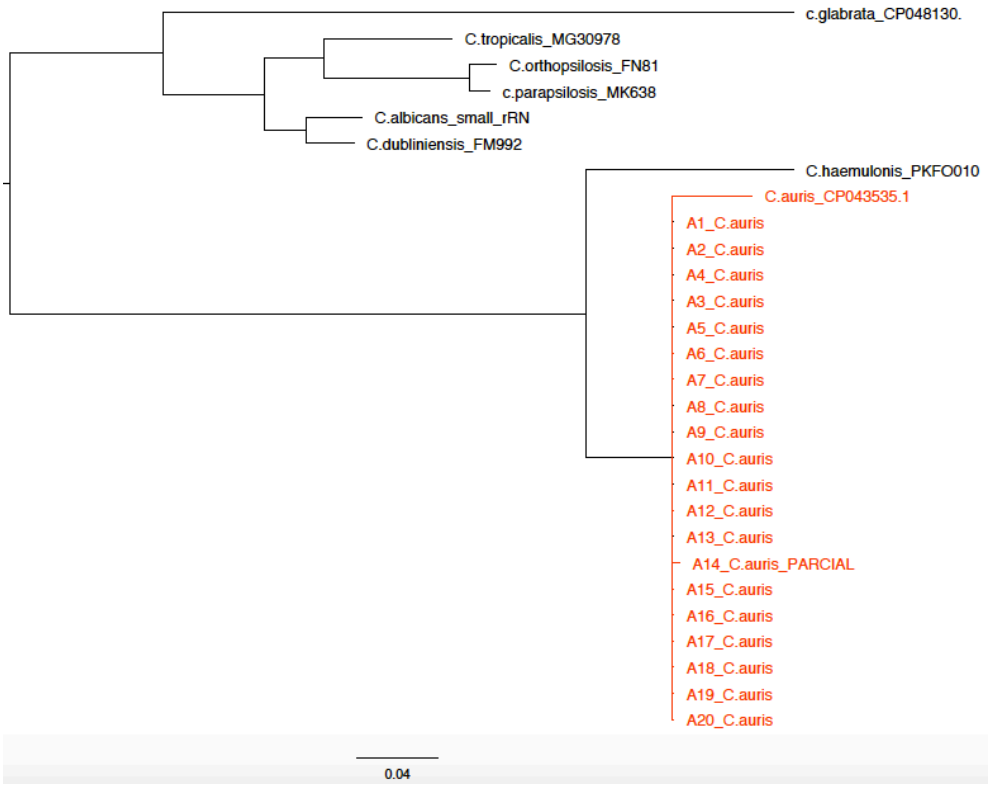


Anexos: Se puede visualizar cada uno de las profundidades de los 20 aislamientos de Bogotá, los cuales e enviaron a secuenciar.

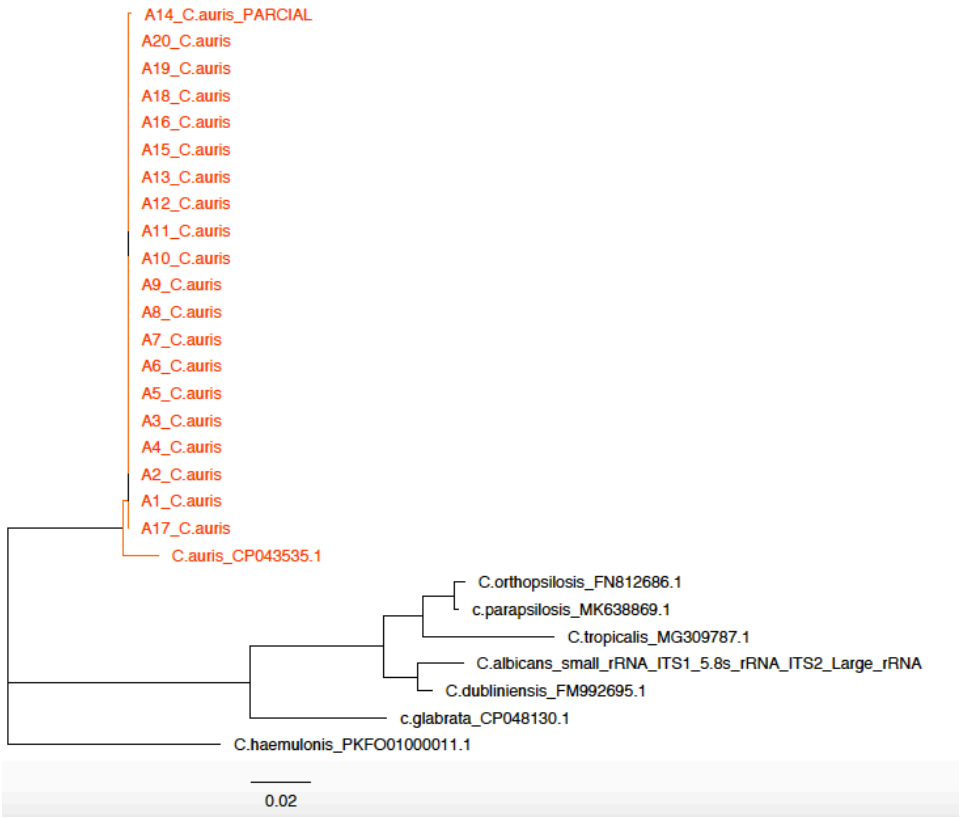


9 Anexo 1: Arboles filogenéticos

Anexos: Filogenia inferida usando la región del rRNA.
La filogenia fue inferida usando MEGA Minimun Evolution. Los soportes de los grupos (valores en las ramas) fueron evaluados mediante bootstrap con 1000 réplicas. La rama del clado de *C. auris* se resalta en naranja.



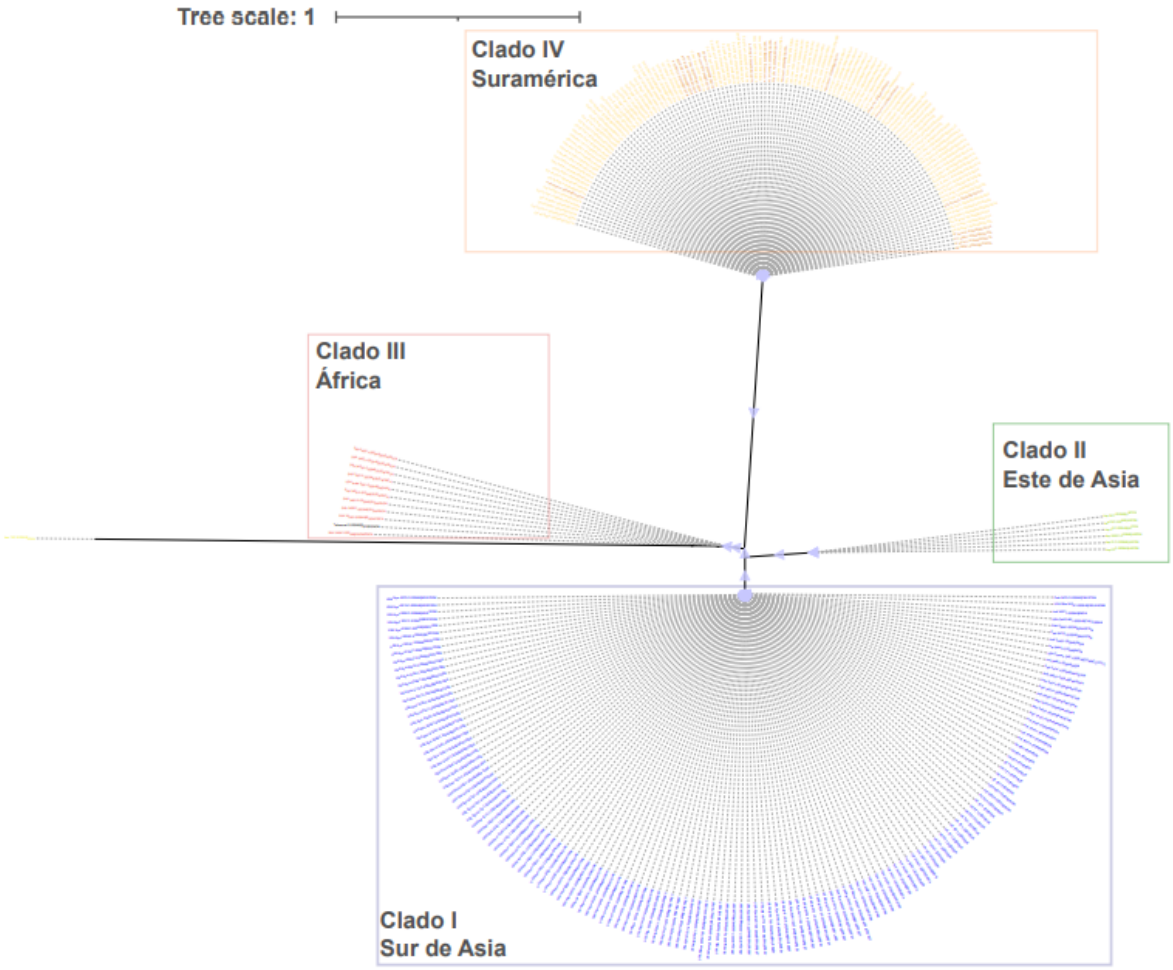
Anexos: Filogenia inferida usando la región del rRNA.
La filogenia fue inferida usando MEGA Neighbor Joning. Los soportes de los grupos (valores en las ramas) fueron evaluados mediante bootstrap con 1000 réplicas. La rama del clado de *C. auris* se resalta en naranja.


A14_C.auris_PARCIAL
A20_C.auris
A19_C.auris
A18_C.auris
A16_C.auris
A15_C.auris
A13_C.auris
A12_C.auris
A11_C.auris
A10_C.auris
A9_C.auris
A8_C.auris
A7_C.auris
A6_C.auris
A5_C.auris
A3_C.auris
A4_C.auris
A2_C.auris
A1_C.auris
A17_C.auris
C.auris_CP043535.1
C.orthopsilosis_FN812686.1
c.parapsilosis_MK638869.1
C.tropicalis_MG309787.1
C.albicans_small_rRNA_ITS1_5.8s_rRNA_ITS2_Large_rRNA
C.dubliniensis_FM992695.1
c.glabrata_CP048130.1
C.haemulonis_PKFO01000011.1
0.02

Anexos. Identidad de secuencia de los 20 aislamientos de Bogotá.

	A13	A12	A14	A16	A19	A4	A10	A15	A17	A20	A7	A18	A1	A8	A11	A5	A3	A9	A6	A2
A13	100	99,92	99,93	99,90	99,95	99,94	99,84	99,82	99,82	99,84	99,89	99,89	99,89	99,89	99,86	99,85	99,86	99,89	99,79	99,78
A12	99,92	100	99,9	99,87	99,92	99,91	99,8	99,78	99,78	99,8	99,85	99,85	99,86	99,85	99,83	99,82	99,83	99,85	99,76	99,75
A14	99,93	99,9	100	99,88	99,93	99,92	99,82	99,8	99,79	99,81	99,86	99,86	99,87	99,87	99,84	99,83	99,84	99,86	99,77	99,76
A16	99,90	99,87	99,88	100	99,91	99,9	99,79	99,77	99,77	99,79	99,84	99,84	99,85	99,84	99,82	99,8	99,82	99,84	99,75	99,74
A19	99,95	99,92	99,93	99,91	100	99,95	99,84	99,82	99,82	99,84	99,89	99,89	99,89	99,89	99,87	99,85	99,87	99,89	99,8	99,78
A4	99,94	99,91	99,92	99,9	99,95	100	99,85	99,83	99,82	99,84	99,89	99,89	99,9	99,89	99,87	99,86	99,87	99,89	99,8	99,79
A10	99,84	99,8	99,82	99,79	99,84	99,85	100	99,94	99,95	99,96	99,92	99,92	99,93	99,93	99,9	99,88	99,89	99,91	99,82	99,81
A15	99,82	99,78	99,8	99,77	99,82	99,83	99,94	100	99,95	99,94	99,89	99,9	99,9	99,89	99,87	99,86	99,87	99,92	99,82	99,81
A17	99,82	99,78	99,79	99,77	99,82	99,82	99,95	99,95	100	99,94	99,9	99,9	99,9	99,9	99,87	99,87	99,87	99,89	99,8	99,79
A20	99,84	99,8	99,81	99,79	99,84	99,84	99,96	99,94	99,94	100	99,91	99,91	99,92	99,92	99,89	99,88	99,88	99,91	99,81	99,8
A7	99,89	99,85	99,86	99,84	99,89	99,89	99,92	99,89	99,9	99,91	100	99,97	99,97	99,97	99,94	99,93	99,94	99,96	99,87	99,85
A18	99,89	99,85	99,86	99,84	99,89	99,89	99,92	99,9	99,9	99,91	99,97	100	99,98	99,97	99,94	99,93	99,94	99,96	99,87	99,85
A1	99,89	99,86	99,87	99,85	99,89	99,9	99,93	99,9	99,9	99,92	99,97	99,98	100	99,98	99,95	99,94	99,94	99,97	99,87	99,86
A8	99,89	99,85	99,87	99,84	99,89	99,89	99,93	99,89	99,9	99,92	99,97	99,97	99,98	100	99,94	99,93	99,94	99,96	99,87	99,86
A11	99,86	99,83	99,84	99,82	99,87	99,87	99,9	99,87	99,87	99,89	99,94	99,94	99,95	99,94	100	99,91	99,91	99,94	99,84	99,83
A5	99,85	99,82	99,83	99,8	99,85	99,86	99,88	99,86	99,87	99,88	99,93	99,93	99,94	99,93	99,91	100	99,9	99,93	99,83	99,82
A3	99,86	99,83	99,84	99,82	99,87	99,87	99,89	99,87	99,87	99,88	99,94	99,94	99,94	99,94	99,91	99,9	100	99,94	99,85	99,83
A9	99,89	99,85	99,86	99,84	99,89	99,89	99,91	99,92	99,89	99,91	99,96	99,96	99,97	99,96	99,94	99,93	99,94	100	99,89	99,88
A6	99,79	99,76	99,77	99,75	99,8	99,8	99,82	99,82	99,8	99,81	99,87	99,87	99,87	99,87	99,84	99,83	99,85	99,89	100	99,78
A2	99,78	99,75	99,76	99,74	99,78	99,79	99,81	99,81	99,79	99,8	99,85	99,85	99,86	99,86	99,83	99,82	99,83	99,88	99,78	100

Anexos Relaciones filogenéticas de los 281 aislamientos de *C. auris* de todo el mundo. El árbol fue inferido con el algoritmo neighbor-joining con 1000 réplicas bootstrap.



Los 20 aislamientos de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá se muestran con un color naranja oscuro entre los aislamientos del clado IV. Valores de *bootstrap* superiores a 0,8 están indicados como figuras azules sobre las respectivas ramas.

Bibliografía

1. Mizusawa, M., et al., *Can Multidrug-Resistant Candida auris Be Reliably Identified in Clinical Microbiology Laboratories?* Journal of Clinical Microbiology, 2017. **55**(2): p. 638.
2. Satoh, K., et al., *Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital.* Microbiology and Immunology, 2009. **53**(1): p. 41-44.
3. Lee, W.G., et al., *First three reported cases of nosocomial fungemia caused by Candida auris.* Journal of Clinical Microbiology, 2011. **49**(9): p. 3139.
4. Khillan, V., et al., *A rare case of breakthrough fungal pericarditis due to fluconazole-resistant Candida auris in a patient with chronic liver disease.* JMM Case Reports, 2014. **1**(3).
5. Chowdhary, A., et al., *New clonal strain of Candida auris, Delhi, India.* Emerging infectious diseases, 2013. **19**(10): p. 1670-1673.
6. Pfaller, M.A., *Epidemiology of nosocomial candidiasis: the importance of molecular typing.* Braz J Infect Dis, 2000. **4**(4): p. 161-7.
7. Chowdhary, A., et al., *Multidrug-resistant endemic clonal strain of Candida auris in India.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014. **33**(6): p. 919-926.
8. Brown, G.D., et al., *Hidden Killers: Human Fungal Infections.* Science Translational Medicine, 2012. **4**(165): p. 165rv13.
9. Lockhart, S.R., et al., *Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses.* Clinical Infectious Diseases, 2016. **64**(2): p. 134-140.
10. Estrada-Barraza, D., et al., *Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de Candida en aislamientos clínicos.* Revista Iberoamericana de Micología, 2011. **28**(1): p. 36-42.
11. Mancini, N., et al., *Comparative Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Systems for Identification of Yeasts of Medical Importance.* Journal of Clinical Microbiology, 2013. **51**(7): p. 2453.
12. Kathuria, S., et al., *Multidrug-Resistant Candida auris Misidentified as Candida haemulonii: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its*

Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. Journal of Clinical Microbiology, 2015. **53**(6): p. 1823.

13. Girard, V., et al., *Identification and typing of the emerging pathogen Candida auris by matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry.* Mycoses, 2016. **59**(8): p. 535-538.
14. Chybowska, A.D., D.S. Childers, and R.A. Farrer, *Nine Things Genomics Can Tell Us About Candida auris.* Frontiers in Genetics, 2020. **11**: p. 351.
15. Jeffery-Smith, A., et al., *Candida auris: a Review of the Literature.* Clinical Microbiology Reviews, 2018. **31**(1): p. e00029-17.
16. Ademe, M., F.J.I. Girma, and D. Resistance, *Candida auris: From Multidrug Resistance to Pan-Resistant Strains.* Infect Drug Resist, 2020. **13**: p. 1287-1294.
17. Chowdhary, A., C. Sharma, and J.F.J.P.p. Meis, *Candida auris: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally.* PLoS Pathog, 2017. **13**(5): p. e1006290.
18. Kwon, Y.J., et al., *Candida auris Clinical Isolates from South Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Genotyping.* J Clin Microbiol, 2019. **57**(4).
19. Magobo, R.E., et al., *Candida auris-associated candidemia, South Africa.* Emerging infectious diseases, 2014. **20**(7): p. 1250-1251.
20. Emara, M., et al., *Candida auris candidemia in Kuwait, 2014.* Emerging infectious diseases, 2015.
21. Calvo, B., et al., *First report of Candida auris in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia.* J Infect, 2016. **73**(4): p. 369-374.
22. Ben-Ami, R., et al., *Multidrug-Resistant Candida haemulonii and C. auris, Tel Aviv, Israel.* Emerging infectious diseases, 2017. **23**(1): p. 195-203.
23. Morales-López, S.E., et al., *Invasive Infections with Multidrug-Resistant Yeast Candida auris, Colombia.* Emerging infectious diseases, 2017. **23**(1): p. 162-164.
24. Escandón, P., et al., *Molecular Epidemiology of Candida auris in Colombia Reveals a Highly Related, Countrywide Colonization With Regional Patterns in Amphotericin B Resistance.* Clinical Infectious Diseases, 2018. **68**(1): p. 15-21.
25. Paige, A.A., et al., *Hospital-Associated Multicenter Outbreak of Emerging Fungus Candida auris, Colombia, 2016.* Emerging Infectious Disease journal, 2019. **25**(7): p. 1339.
26. Pappas, P.G., et al., *Invasive candidiasis.* Nature Reviews Disease Primers, 2018. **4**(1): p. 18026.
27. Carvajal-Valencia, S.K.J.I., *Identificación de aislamientos de Candida auris recuperados a través de la vigilancia por laboratorio en Colombia: un reto para el diagnóstico.* 2020. **24**(4): p. 224-228.
28. Ambaraghassi, G., et al., *Identification of Candida auris by Use of the Updated Vitek 2 Yeast Identification System, Version 8.01: a Multilaboratory Evaluation Study*

Journal of Clinical Microbiology, 2019. **57**(11): p. e00884-19.
29. Iguchi, S., et al., *Candida auris: A pathogen difficult to identify, treat, and eradicate and its characteristics in Japanese strains.* 2019. **25**(10): p. 743-749.
30. Britz, E. and N.P.J.S.A.J.o.I.D. Govender, *Global emergence of a multi-drug resistant fungal pathogen, Candida auris.* 2016. **31**(3): p. 3-4.
31. Lesho, E.P., et al., *Importation, Mitigation, and Genomic Epidemiology of Candida auris at a Large Teaching Hospital.* Infection Control & Hospital Epidemiology, 2018. **39**(1): p. 53-57.
32. Clancy, C.J. and M.H. Nguyen, *Emergence of Candida auris: An International Call to Arms.* Clinical Infectious Diseases, 2016. **64**(2): p. 141-143.
33. Calvo, B., et al., *First report of Candida auris in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia.* J Infect, 2016. **73**(4): p. 369-74.
34. Sharma, C., et al., *Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant Candida auris isolates in India demonstrates low genetic variation.* New Microbes New Infect, 2016. **13**: p. 77-82.
35. Rudramurthy, S.M., et al., *Candida auris candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017. **72**(6): p. 1794-1801.
36. Moreno, M.V., et al., *Primer aislamiento de Candida auris en Chile %J Revista chilena de infectología.* 2019. **36**: p. 767-773.
37. de Jong, A.W. and F. Hagen, *Attack, Defend and Persist: How the Fungal Pathogen Candida auris was Able to Emerge Globally in Healthcare Environments.* Mycopathologia, 2019. **184**(3): p. 353-365.
38. SDS Secretaria de Salud Pública, C., *Alerta por emergencia global de infecciones invasivas causadas por la levadura multiresistente, Candida auris*, D.R.e.S.P. Grupo de Microbiología, Editor 2017.
39. Kim, T.-H., et al., *Identification of uncommon Candida species using commercial identification systems.* J Microbiol Biothechnol, 2016. **26**(12): p. 2206-13.
40. Vallabhaneni, S., et al., *Investigation of the first seven reported cases of Candida auris, a globally emerging invasive, multidrug-resistant fungus—United States, May 2013–August 2016.* Morbidity and Mortality Weekly Report, 2016. **65**(44): p. 1234-1237.
41. Chatterjee, S., et al., *Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen Candida auris.* BMC Genomics, 2015. **16**(1): p. 686.
42. Reedy, J.L., A.M. Floyd, and J.J.C.B. Heitman, *Mechanistic plasticity of sexual reproduction and meiosis in the Candida pathogenic species complex.* Current Biology, 2009. **19**(11): p. 891-899.
43. Bravo Ruiz, G., et al., *Rapid and extensive karyotype diversification in haploid clinical Candida auris isolates.* Current Genetics, 2019. **65**(5): p. 1217-1228.

44. Kullberg, B.J. and M.C. Arendrup, *Invasive Candidiasis.* The NEW WNGLAND JOURNAL of MEDICINE, 2015. **373**(15): p. 1445-1456.
45. Plachouras, D., et al., *Candida auris: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in the European Union and European Economic Area*, January 2018 to May 2019.* Eurosurveillance, 2020. **25**(12): p. 2000240.
46. Rhodes, J., et al., *Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen Candida auris.* Emerging Microbes & Infections, 2018. **7**(1): p. 1-12.
47. Salud, O.O.M.d.l. *Alerta Epidemiológica Brotes de Candida auris en servicios de atención a la salud*. 2016.
48. Schelenz, S., et al., *First hospital outbreak of the globally emerging Candida auris in a European hospital.* Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2016. **5**(1): p. 35.
49. Osei Sekyere, J., *Candida auris: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen.* MicrobiologyOpen, 2018. **7**(4): p. e00578.
50. Welsh, R.M., et al., *Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast Candida auris on a Plastic Health Care Surface.* Journal of Clinical Microbiology, 2017. **55**(10): p. 2996.
51. Mohsin, J., et al., *The first cases of Candida auris candidaemia in Oman.* Mycoses, 2017. **60**(9): p. 569-575.
52. Borman, A.M., A. Szekely, and E.M. Johnson, *Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen Candida auris and Other Key Pathogenic Candida Species.* mSphere, 2016. **1**(4): p. e00189-16.
53. Kumar, A., et al., *Simple low cost differentiation of Candida auris from Candida haemulonii complex using CHROMagar Candida medium supplemented with Pal's medium.* Iberoamericana de micología, 2017. **34**(2): p. 109-111.
54. Borman, A.M., A. Szekely, and E.M. Johnson, *Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen Candida auris and Other Key Pathogenic Candida Species*
mSphere, 2016. **1**(4): p. e00189-16.
55. Borman, A.M., A. Szekely, and E.M. Johnson, *Isolates of the emerging pathogen Candida auris present in the UK have several geographic origins.* Medical Mycology, 2017. **55**(5): p. 563-567.
56. Larkin, E., et al., *The Emerging Pathogen Candida auris: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017. **61**(5): p. e02396-16.
57. *CDC Centers for Disease Control and Prevention, CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People, Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation C. auris*. 2020; Available from: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html.

58. Lepak, A.J., et al., *Pharmacodynamic Optimization for Treatment of Invasive Candida auris Infection.* Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(8).
59. Alemàn Almanza, T.M., *Determinación de la sensibilidad antifúngica en aislamientos clínicos de Candida auris asociados a procesos invasivos y de colonización recuperados en Cartagena, Colombia*, in *Facultad de Ciencias*2018, Pontifica Universidad Javeriana Bogotá.
60. Kumar, A., et al., *Candida haemulonii species complex: an emerging species in India and its genetic diversity assessed with multilocus sequence and amplified fragment-length polymorphism analyses.* Emerging Microbes & Infections, 2016. **5**(1): p. 1-12.
61. Cendejas-Bueno, E., et al., *Reclassification of the Candida haemulonii complex as Candida haemulonii (C. haemulonii group I), C. duobushaemulonii sp. nov. (C. haemulonii group II), and C. haemulonii var. vulnera var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts.* J Clin Microbiol, 2012. **50**(11): p. 3641-51.
62. Bishop, L., et al., *Guidance for the laboratory investigation, management and infection prevention and control for cases of Candida auris.* Public Health England, 2017.
63. Piedrahita, C.T., et al., *Environmental Surfaces in Healthcare Facilities are a Potential Source for Transmission of Candida auris and Other Candida Species.* Infection Control & Hospital Epidemiology, 2017. **38**(9): p. 1107-1109.
64. Cadnum, J.L., et al., *Relative Resistance of the Emerging Fungal Pathogen Candida auris and Other Candida Species to Killing by Ultraviolet Light.* Infection Control & Hospital Epidemiology, 2018. **39**(1): p. 94-96.
65. Ospina, M.A.R.y.M.C., *"Evaluación, control y vigilancia de Candida auris en Medellín"*, in *Boletín Epidemiologíco*, S.d.S.d. Medellín, Editor 2019.
66. Diomedi, A., et al., *Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología %J Revista chilena de infectología.* 2017. **34**: p. 156-174.
67. Biswal, M., et al., *Controlling a possible outbreak of Candida auris infection: lessons learnt from multiple interventions.* Journal of Hospital Infection, 2017. **97**(4): p. 363-370.
68. Metzker, M.L., *Sequencing technologies — the next generation.* Nature Reviews Genetics, 2010. **11**(1): p. 31-46.
69. Ruiz-Gaitán, A., et al., *An outbreak due to Candida auris with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital.* Mycoses, 2018. **61**(7): p. 498-505.
70. Kordalewska, M., et al., *Rapid and Accurate Molecular Identification of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogen <span class="named-content genus-species" id="named-content-1">Candida auris</span&gt.* Journal of Clinical Microbiology, 2017. **55**(8): p. 2445.

71. Long, S.W., et al., *Draft Genome Sequence of Candida auris Strain LOM, a Human Clinical Isolate from Greater Metropolitan Houston, Texas.* Microbiology Resource Announcements, 2019. **8**(25): p. e00532-19.
72. Reuter, Jason A., D.V. Spacek, and Michael P. Snyder, *High-Throughput Sequencing Technologies.* Molecular Cell, 2015. **58**(4): p. 586-597.
73. Gargis, A.S., L. Kalman, and I.M. Lubin, *Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology and Public Health Laboratories.* Journal of Clinical Microbiology, 2016: p. JCM.00949-16.
74. Kuleshov, V., et al., *Whole-genome haplotyping using long reads and statistical methods.* Nature Biotechnology, 2014. **32**(3): p. 261-266.
75. Chui, C.a.M., S., *Next-Generation Sequencing*, in *Molecular Microbiology*2016. p. 68-79.
76. Olson, N.D., et al., *Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics.* 2015. **6**(235).
77. Maldonado, I., et al., *Identificación de levaduras del género Candida: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS.* Revista Iberoamericana de Micología, 2018. **35**(3): p. 151-154.
78. Pence, M.A., et al., *Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014. **33**(10): p. 1703-1712.
79. Prakash, A., et al., *Evidence of genotypic diversity among Candida auris isolates by multilocus sequence typing, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and amplified fragment length polymorphism.* 2016. **22**(3): p. 277. e1-277. e9.
80. Kwon, Y.J., et al., *Candida auris Clinical Isolates from South Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Genotyping.* Journal of Clinical Microbiology, 2019. **57**(4): p. e01624-18.
81. Oh, B.J., et al., *Biofilm formation and genotyping of Candida haemulonii, Candida pseudohaemulonii, and a proposed new species (Candida auris) isolates from Korea.* Medical Mycology, 2011. **49**(1): p. 98-102.
82. Lockhart, S.R., et al., *Thinking beyond the Common Candida Species: Need for Species-Level Identification of Candida Due to the Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris.* Journal of Clinical Microbiology, 2017. **55**(12): p. 3324.
83. Arendrup, M.C., et al., *Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for Candida auris and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017. **61**(6): p. e00485-17.
84. Heath, C.H., et al., *Candida auris Sternal Osteomyelitis in a Man from Kenya Visiting Australia, 2015.* Emerging infectious diseases, 2019. **25**(1): p. 192-194.
85. Croxatto, A., G. Prod'hom, and G.J.F.m.r. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.* 2012. **36**(2): p. 380-407.

86. Boekhout, T., et al., *Identification, typing and susceptibility testing of fungi (incl. Yeasts) by MALDI-TOF MS.* 2016.
87. Kathuria, S., et al., *Multidrug-Resistant Candida auris Misidentified as Candida haemulonii: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method*
Journal of Clinical Microbiology, 2015. **53**(6): p. 1823.
88. Chowdhary, A., et al., *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.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018. **73**(4): p. 891-899.
89. Guo, J., et al., *Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(27): p. 9145-50.
90. Dohm, J.C., et al., *Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing.* Nucleic Acids Res, 2008. **36**(16): p. 26.
91. Urwin, R. and M.C. Maiden, *Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology.* Trends Microbiol, 2003. **11**(10): p. 479-87.
92. Tavanti, A., et al., *Multilocus sequence typing for differentiation of strains of Candida tropicalis.* 2005. **43**(11): p. 5593-5600.
93. Tavanti, A., et al., *Population structure and properties of Candida albicans, as determined by multilocus sequence typing.* 2005. **43**(11): p. 5601-5613.
94. Maiden, M.C., et al., *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3140-5.
95. Maiden, M.C., *Multilocus sequence typing of bacteria.* Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 561-88.
96. Bougnoux, M.-E., et al., *Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of Candida albicans.* 2003. **41**(11): p. 5265-5266.
97. Morschhäuser, J., et al., *The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in Candida albicans.* PLoS Pathog, 2007. **3**(11): p. e164.
98. Chaabane, F., et al., *Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen Candida auris.* Front Microbiol, 2019. **10**(2788).
99. Cowen, L.E., et al., *Mechanisms of antifungal drug resistance.* Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2015. **5**(7): p. a019752.
100. Zamith-Miranda, D., et al., *Multi-omics Signature of Candida auris, an Emerging and Multridrug-Resistant Pathogen.* mSystems, 2019. **4**(4): p. e00257-19.
101. Whaley, S.G., et al., *Azole antifungal resistance in Candida albicans and emerging non-albicans Candida species.* Frontiers in microbiology, 2017. **7**: p. 2173.

102. Kean, R. and G. Ramage, *Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of Candida auris.* mSphere, 2019. **4**(4): p. e00458-19.
103. Rybak, J.M., et al., *Abrogation of Triazole Resistance upon Deletion of CDR1 in a Clinical Isolate of Candida auris.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2019. **63**(4): p. e00057-19.
104. Muñoz, J.F., et al., *Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in Candida auris and related emerging species.* Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 5346.
105. Tapia, C. and C.J.R.c.d.i.o.o.d.l.S.C.d.I. Batarce, *Multidrug-resistant Candida auris:" new kid on the block" in hospital-associated infections?* Revista Chilena de Infectología: Organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología, 2017. **34**(2): p. 192-192.
106. Rybak, J.M., et al., *Mutations in TAC1B: a Novel Genetic Determinant of Clinical Fluconazole Resistance in Candida auris.* mBio, 2020. **11**(3): p. e00365-20.
107. Martins, I.M., et al., *Differential activities of three families of specific β (1, 3) glucan synthase inhibitors in wild-type and resistant strains of fission yeast.* Journal of Biological Chemestry, 2011. **286**(5): p. 3484-3496.
108. Kordalewska, M., et al., *Understanding Echinocandin Resistance in the Emerging Pathogen Candida auris.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018. **62**(6): p. e00238-18.
109. Sherry, L., et al., *Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant Candida auris.* Emerging infectious diseases, 2017. **23**(2): p. 328-331.
110. Day, A.M., et al., *Hog1 Regulates Stress Tolerance and Virulence in the Emerging Fungal Pathogen Candida auris.* mSphere, 2018. **3**(5): p. e00506-18.
111. Dominguez, E.G., et al., *Conserved Role for Biofilm Matrix Polysaccharides in Candida auris Drug Resistance*
mSphere, 2019. **4**(1): p. e00680-18.
112. Fakhim, H., et al., *Comparative virulence of Candida auris with Candida haemulonii, Candida glabrata and Candida albicans in a murine model.* Mycoses, 2018. **61**(6): p. 377-382.
113. Kean, R., et al., *ranscriptome Assembly and Profiling of Candida auris Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance*
mSphere, 2018. **3**(4): p. e00334-18.
114. Meis, J. and A.J.L.I.D. Chowdhary, *Candida auris: a global fungal public health threat.* Lancet Infectious Diseases, 2018. **18**: p. 1298-1299.
115. Sayeed, M.A., et al., *Clinical spectrum and factors impacting outcome of Candida auris: a single center study from Pakistan.* BMC Infectious Diseases, 2019. **19**(1): p. 384.
116. Kohlenberg, A., et al., *Candida auris: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in European Union and European Economic Area countries, 2013 to 2017.* 2018. **23**(13): p. 18-00136.

117. Gaitán, A.C.R., et al., *Nosocomial fungemia by Candida auris: first four reported cases in continental Europe.* Revista Iberoamericana de Micología, 2017. **34**(1): p. 23-27.
118. Pekard-Amenitsch, S., et al., *Isolation of Candida auris from Ear of Otherwise Healthy Patient, Austria, 2018.* Emerging infectious diseases, 2018. **24**(8): p. 1596-1597.
119. Chow, N.A., et al., *Potential Fifth Clade of Candida auris, Iran, 2018.* Emerging infectious diseases, 2019. **25**(9): p. 1780-1781.
120. Abastabar, M., et al., *Candida auris otomycosis in Iran and review of recent literature.* Mycoses, 2019. **62**(2): p. 101-105.
121. Riat, A., et al., *First case of Candida auris in Switzerland: discussion about preventive strategies.* Swiss medical weekly, 2018. **148**.
122. Tang, H.J., et al., *Emergence of multidrug-resistant Candida auris in Taiwan.* Int J Antimicrob Agents, 2019. **53**(5): p. 705-706.
123. Chowdhary, A., A. Voss, and J.J.J.o.H.I. Meis, *Multidrug-resistant Candida auris:'new kid on the block'in hospital-associated infections?* Journal of Hospital Infection, 2016. **94**(3): p. 209-212.
124. Abdalhamid, B., et al., *First report of Candida auris infections from Saudi Arabia.* J Infect Public Health, 2018. **11**(4): p. 598-599.
125. Chen, Y., et al., *Emergency of fungemia cases caused by fluconazole-resistant Candida auris in Beijing, China.* Journal of Infection, 2018. **77**(6): p. 561-571.
126. Schwartz, I.S. and G.W. Hammond, *First reported case of multidrug-resistant Candida auris in Canada.* Canada communicable disease report = Releve des maladies transmissibles au Canada, 2017. **43**(7-8): p. 150-153.
127. Iguchi, S., et al., *The second Candida auris isolate from aural discharge in Japan.* Japanese Journal of Infectious Diseases, 2018: p. JJID. 2017.466.
128. Araúz, A.B., et al., *Isolation of Candida auris from 9 patients in Central America: Importance of accurate diagnosis and susceptibility testing.* Mycoses, 2018. **61**(1): p. 44-47.
129. Tan, Y.E., et al., *Candida auris in Singapore: Genomic epidemiology, antifungal drug resistance, and identification using the updated 8.01 VITEK ® 2 system.* 2019. **54**(6): p. 709-715.
130. Ahmad, A., et al., *A high-throughput and rapid method for accurate identification of emerging multidrug-resistant Candida auris.* Mycoses, 2019. **62**(6): p. 513-518.
131. Qu, X., et al., *MADS-box transcription factor SsMADS is involved in regulating growth and virulence in Sclerotinia sclerotiorum.* International journal of molecular sciences, 2014. **15**(5): p. 8049-8062.
132. Calcagno, A.-M., et al., *Candida glabrata STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation.* Molecular Microbiology, 2003. **50**(4): p. 1309-1318.
133. Dharmendra, K., et al., *Itraconazole-resistant Candida auris with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of*

vulvovaginitis. The Journal of Infection in Developing Countries, 2015. **9**(04).
134. Prakash, A., et al., *Evidence of genotypic diversity among Candida auris isolates by multilocus sequence typing, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and amplified fragment length polymorphism.* Clinical Microbiology and Infection, 2016. **22**(3): p. 277. e1-277. e9.
135. Muñoz, J.F., et al., *Chromosomal rearrangements and loss of subtelomeric adhesins linked to clade-specific phenotypes in Candida auris.* bioRxiv, 2019: p. 754143.
136. Chow, N.A., et al., *Multiple introductions and subsequent transmission of multidrug-resistant Candida auris in the USA: a molecular epidemiological survey.* The Lancet Infectious Diseases, 2018. **18**(12): p. 1377-1384.
137. Chow, N.A., et al., *Genome Sequence of a Multidrug-Resistant Candida haemulonii Isolate from a Patient with Chronic Leg Ulcers in Israel.* Genome Announc, 2018. **6**(15).
138. Chow, N.A., et al., *Genome Sequence of the Amphotericin B-Resistant Candida duobushaemulonii Strain B09383.* Genome Announc, 2018. **6**(13).
139. Chybowska, A.D., D.S. Childers, and R.A. Farrer, *Nine Things Genomics Can Tell Us About Candida auris.* Front Microbiol, 2020. **11**(351).
140. Sarma, S., et al., *Candidemia caused by amphotericin B and fluconazole resistant Candida auris.* Indian J Med Microbiol, 2013. **31**(1): p. 90.
141. Shackleton, J., et al., *The impact of environmental decontamination in a Candida auris outbreak.* J Hosp infect, 2016. **94**(Suppl 1): p. S24-S134.
142. Tian, S., et al., *First cases and risk factors of super yeast Candida auris infection or colonization from Shenyang, China.* Emerging Microbes & Infections, 2018. **7**(1): p. 1-9.
143. Azar, M.M., et al., *Donor-Derived Transmission of Candida auris During Lung Transplantation.* Clinical Infectious Diseases, 2017. **65**(6): p. 1040-1042.
144. Tsay, S., et al., *Notes from the Field: Ongoing Transmission of Candida auris in Health Care Facilities - United States, June 2016-May 2017.* MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 2017. **66**(19): p. 514-515.
145. Preventation, C.C.f.D.C.a. *CDC. Infection Prevention and Control for Candida auris*. 2017; Deparment of Health EE.UU, CDC:[Available from: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-infection-control.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffungal%2Fdiseases%2Fcandidiasis%2Fc-auris-infection-control.html.
146. Wey, S.B., et al., *Risk Factors for Hospital-Acquired Candidemia: A Matched Case-Control Study.* Archives of Internal Medicine, 1989. **149**(10): p. 2349-2353.
147. CDC. *Treatment and Management of Infections and Colonization. Recommendations for treatment of Candida auris infections*. 2019; Deparment of Health:[Available from: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-

treatment.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffungal%2Fdiseases%2Fcandidiasis%2Fc-auris-treatment.html.
148. Fakhim, H., et al., *In Vitro Interactions of Echinocandins with Triazoles against Multidrug-Resistant Candida auris.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017. **61**(11): p. e01056-17.
149. Eldesouky, H.E., et al., *Synergistic interactions of sulfamethoxazole and azole antifungal drugs against emerging multidrug-resistant Candida auris.* Int J Antimicrob Agents, 2018. **52**(6): p. 754-761.
150. Andrews, S., *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*, 2010, Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
151. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.* Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-2120.
152. Zerbino, D.R. and E.J.G.r. Birney, *Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs.* 2008. **18**(5): p. 821-829.
153. Bankevich, A., et al., *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.* 2012. **19**(5): p. 455-477.
154. Gurevich, A., et al., *QUAST: quality assessment tool for genome assemblies.* 2013. **29**(8): p. 1072-1075.
155. Keller, O., et al., *A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments.* 2011. **27**(6): p. 757-763.
156. Kaas, R.S., et al., *Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms.* 2014. **9**(8): p. e104984.
157. Darriba, D., et al., *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing.* 2012. **9**(8): p. 772-772.
158. Benson, D., et al., *GenBank Nucleic Acids Res 41 (D1).* 2013.
159. Benson, D.A., et al., *GenBank.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D48-53.
160. Edgar, R.C.J.N.a.r., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.* 2004. **32**(5): p. 1792-1797.
161. Posada, D.J.M.b. and evolution, *jModelTest: phylogenetic model averaging.* 2008. **25**(7): p. 1253-1256.
162. Posada, D., *Selection of Models of DNA Evolution with jM odel T est*, in *Bioinformatics for DNA sequence analysis*2009, Springer. p. 93-112.
163. Kumar, S., et al., *MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms.* 2018. **35**(6): p. 1547-1549.
164. Felsenstein, J.J.e., *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.* 1985. **39**(4): p. 783-791.
165. Ronquist, F., et al., *MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space.* 2012. **61**(3): p. 539-542.
166. Byun, S.A., et al., *Multilocus sequence typing (MLST) genotypes of Candida glabrata bloodstream isolates in Korea: association with antifungal resistance, mutations in mismatch repair gene (Msh2), and clinical outcomes.* 2018. **9**: p. 1523.

167. Biswas, C., et al., *Whole Genome Sequencing of Australian Candida glabrata Isolates Reveals Genetic Diversity and Novel Sequence Types.* 2018. **9**(2946).
168. Asadzadeh, M., et al., *Molecular Fingerprinting Studies Do Not Support Intrahospital Transmission of Candida albicans among Candidemia Patients in Kuwait.* 2017. **8**(247).
169. Bougnoux, M.-E., S. Morand, and C.J.J.o.c.m. d'Enfert, *Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of Candida albicans.* 2002. **40**(4): p. 1290-1297.
170. Wu, K., et al., *Multilocus sequence typing of pathogenic Candida albicans isolates collected from a teaching hospital in Shanghai, China: a molecular epidemiology study.* 2015. **10**(4): p. e0125245.
171. Tajima, F.J.G., *Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism.* 1989. **123**(3): p. 585-595.
172. Fu, Y.X. and W.H. Li, *Statistical tests of neutrality of mutations.* Genetics, 1993. **133**(3): p. 693-709.
173. Fu, Y.-x.J.G., *New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population.* 1996. **143**(1): p. 557-570.
174. Rozas, J., et al., *DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets.* 2017. **34**(12): p. 3299-3302.
175. Letunic, I. and P.J.B. Bork, *Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation.* 2007. **23**(1): p. 127-128.
176. Kathuria, S., et al., *Multidrug-resistant Candida auris misidentified as Candida haemulonii: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method.* 2015. **53**(6): p. 1823-1830.
177. Rhodes, J. and M.C. Fisher, *Global epidemiology of emerging Candida auris.* Curr Opin Microbiol, 2019. **52**: p. 84-89.
178. Kondrashov, F.A. and A.S.J.J.o.T.B. Kondrashov, *Role of selection in fixation of gene duplications.* 2006. **239**(2): p. 141-151.
179. Hou, X., et al., *Rapid detection of ERG11-associated azole resistance and FKS-associated echinocandin resistance in Candida auris.* 2019. **63**(1): p. e01811-18.
180. Di Pilato, V., et al., *Molecular Epidemiological Investigation of a Nosocomial Cluster of C. auris: Evidence of Recent Emergence in Italy and Ease of Transmission during the COVID-19 Pandemic.* J Fungi, 2021. **7**(2).
181. Hamprecht, A., et al., *Candida auris in Germany and Previous Exposure to Foreign Healthcare.* Emerging infectious diseases, 2019. **25**(9): p. 1763-1765.