



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE
CEPAS DE *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS* QUE
COLONIZAN LA MUCOSA NASAL DE CUYES
DOMÉSTICOS (*CAVIA PORCELLUS*) EN GRANJAS DE
LA PROVINCIA DE CAÑAR (ECUADOR)**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICO FARMACEUTA**

AUTOR: ADRIÁN ESTEBAN CHIMBO GRANDA

DIRECTOR: DR. ANDRÉS YARZÁBAL. PhD.

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE CEPAS
DE *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS* QUE COLONIZAN LA
MUCOSA NASAL DE CUYES DOMÉSTICOS (*CAVIA
PORCELLUS*) EN GRANJAS DE LA PROVINCIA DE CAÑAR
(ECUADOR)**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICO FARMACEUTA**

AUTOR: ADRIÁN ESTEBAN CHIMBO GRANDA

DIRECTOR: DR. ANDRÉS YARZÁBAL. PhD.

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Yo, **Adrián Esteban Chimbo Granda** portador de la cédula de ciudadanía N.º **0105812317**. Declaro ser autor de la obra: “**Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Wickerhamomyces anomalus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes domésticos (*Cavia porcellus*) en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador)**”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 09 de junio del 2023.



Adrián Esteban Chimbo Granda
0105812317

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR

Certifico que el presente trabajo de titulación denominado “**Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Wickerhamomyces anomalus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes domésticos (*Cavia porcellus*) en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador)**” realizado por **Adrián Esteban Chimbo Granda** con número de ciudadanía ecuatoriana **0105812317**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución bajo el asesoramiento permanente de mi persona en calidad de Tutor. Por lo que, certifico que el presente documento fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación. Por lo tanto, está expedito para su sustentación.

Cuenca, 30 de mayo del 2023.



Dr. Luis Andrés Yarzábal R. PhD.

DEDICATORIA.

Le dedico este trabajo a Dios, quien ha sido la principal fuente de fortaleza y sabiduría en este trayecto académico. Gracias por siempre mostrarme tu misericordia y bondad ante cada situación complicada que forma parte de esta aventura que llamo vida. Me has permitido vivir situaciones muy difíciles, pero siempre has puesto una solución o me has enseñado a ser resiliente y no has permitido que mi fe sobre tu existencia se desvanezca.

También dedico esta tesis a mi madre Blanca. Por su gran amor, ejemplo de fortaleza, paciencia y comprensión, virtudes de las que he sido testigo toda mi vida. Con este trabajo celebro tu valor para hacer frente a la vida siendo padre y madre. Eres una mujer valiente que admiro; espero que de alguna manera el destino me permita devolver todo y más uno lo que has hecho por mí... ¡Gracias mami!

A mi hermana Diana, mi segunda madre, la que me consiente, mi amiga, mi ejemplo de valor. Dedico este trabajo a tu cariño que me has brindado y a ese corazón tan desprendido de lo vano de esta vida, pues lo único que buscas es ver sonreír a quien amas. Gracias por entenderme y por escucharme en los momentos difíciles. En todo momento fuiste uno de los pilares principales para que yo pueda avanzar y culminar con este trabajo de titulación. Espero que de alguna manera la vida te devuelva de forma multiplicada tanta bondad.

También dedico con gran amor este trabajo de titulación a mi hermana Maricela y su familia. Nunca te negaste en apoyarme y extenderme tu mano generosa según este a tu alcance. No somos los mejores amigos, pero nos une el amor que existe en nuestros corazones como familia.

Gracias por tu paciencia y generosidad que me brindaste durante todo el periodo que duró mis estudios. Gracias por los consejos que nunca me faltaron y por compartirme tus criterios sobre la vida. También dedico este trabajo a mi sobrino Elías, al cual llevo en mi corazón.

A mis compañeros que formaron parte de este trayecto académico, en especial a mis amigas Anahí y Clarita, con las cuales nunca faltaron situaciones o anécdotas para reírnos. Gracias por escucharme y brindarme tu apoyo en los momentos complicados.

Con amor desde mi corazón

Adrián Chimbo.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a Dios y mi familia por el apoyo incondicional que me brindaron. Gracias por las palabras de aliento que nunca faltaron. Ustedes forman parte de esa motivación que me impulsa a seguir adelante, creciendo como persona y como profesional. Sin el cariño de ustedes este camino hubiera sido muy difícil de avanzar.

También agradezco a mis tutores Dr. Andrés Yarzabal y Dra. Lenys Buela, quienes me permitieron emprender en este proyecto. En todo momento siempre me acompañaron con sus enseñanzas y consejos. No permitieron que la falta de conocimiento en ciertas situaciones me detenga para cumplir con mi objetivo. Gracias por hacerme sentir ya como parte del mundo profesional y mostrarme siempre paciencia y comprensión, virtudes que demuestran que no solo son buenos profesionales, sino grandes seres humanos. Gracias a todo el personal de laboratorio de biología molecular de la facultad de biofarmacia que me brindaron su ayuda mediante su experiencia en su área de su estudio.

Gracias a cada uno de mis profesores que fueron parte de mi formación académica. Siempre mostraron dominio y conocimiento en sus materias impartidas. Finalmente, también agradezco a mi alma mater, la Universidad Católica de Cuenca que se enfoca en formar profesionales llenos valores y virtudes en favor de la población en general.

RESUMEN

PALABRAS CLAVE: *Wickerhamomyces anomalus*, zoonosis, hongos, factores de virulencia, filogenia.

INTRODUCCIÓN: Las zoonosis son enfermedades transmitidas de animales hacia los seres humanos. Por ello, es importante realizar estudios que identifiquen posibles patógenos zoonóticos que puedan afectar a la población.

OBJETIVO: El objetivo de esta investigación fue caracterizar fenotípica y molecularmente cepas de *Wickerhamomyces anomalus* aisladas a partir de mucosa nasal de cuyes criados en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador).

MATERIALES Y MÉTODOS: La metodología se basó en procedimientos y técnicas convencionales de microbiología. Utilizamos distintos medios de cultivo, incluidos Agar Sabouraud Dextrosa, Agar Papa Dextrosa y HiChrome Candida para evaluar las características morfológicas y fisiológicas de las cepas estudiadas. Realizamos pruebas de actividades enzimáticas en medios suplementados con sangre ovina (hemólisis), yema de huevo (fosfolipasa) y leche (caseinólisis). Los ensayos de penetración se realizaron en medio ASD. Para medir la susceptibilidad de las cepas frente a antifúngicos utilizamos el equipo VITEK®2. La filogenia molecular de las cepas se estableció con programas bioinformáticos como MEGA X, BLAST y secuencias nucleotídicas de GenBank.

RESULTADOS: Entre los resultados más relevantes destacan la estimación de la temperatura óptima de crecimiento ($23^{\circ}\text{C} < t. \text{ópt.} < 37^{\circ}\text{C}$), la actividad hemolítica, la capacidad de penetración en medios sólidos de todos los aislados con presencia de hifas verdaderas (activación de un *switching* fenotípico-dimorfismo), y la evaluación de las relaciones evolutivas con otras cepas de la misma especie (algunas clínicamente importantes). La suma de estos resultados sugiere un potencial riesgo para la salud de la población.

ABSTRACT

KEYWORDS: *Wickerhamomyces anomalus*, zoonoses, fungi, virulence factors, phylogeny

INTRODUCTION: Zoonosis is a disease that has jumped from non-human animals to humans. Therefore, conducting research to identify possible zoonotic pathogens that may affect the population is essential.

OBJECTIVE: This research aimed to characterize phenotypically and molecularly strains of *Wickerhamomyces anomalus* isolated from the nasal mucosa of guinea pigs raised in farms in the Cañar Province (Ecuador).

MATERIALS Y METHODS: The methodology was based on conventional microbiology procedures and techniques. Different culture media, including Sabouraud Dextrose Agar, Papa Dextrose Agar, and HiChrome Candida, were used to evaluate the morphological and physiological characteristics of the strains studied. Enzyme activity tests were performed on media supplemented with sheep blood (hemolysis), egg yolk (phospholipase), and milk (caseinolysis). Penetration assays were performed in the SDA medium. VITEK®2 equipment was used to measure the susceptibility of the strains to antifungals. The molecular phylogeny of the strains was established with bioinformatics programs such as MEGA X, BLAST, and nucleotide sequences from GenBank.

RESULTS: The most relevant results include the estimation of the optimal growth temperature ($23\text{ }^{\circ}\text{C} > \text{opt. temp.} < 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), the hemolytic activity, the ability to penetrate solid media of all isolates with the presence of true hyphae (activation of a phenotypic-dimorphism *switching*), and the evaluation of evolutionary associations with other strains of the same species (some clinically significant). The sum of these results suggests a potential health risk for the population.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO I..... | 4 |
| PLANTEAMIENTO TEÓRICO..... | 4 |
| I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN..... | 5 |
| I.2.- JUSTIFICACIÓN..... | 6 |
| <input type="checkbox"/> Novedad científica..... | 6 |
| <input type="checkbox"/> Aporte científico: teórico, metodológico y práctico..... | 6 |
| <input type="checkbox"/> Beneficios: humanos, ambientales, económicos, educativos y de formación profesional..... | 7 |
| I.2.1.- PREGUNTAS CIENTÍFICAS:..... | 8 |
| I.2.2.- OBJETIVOS..... | 8 |
| I.2.2.1.- Objetivo General:..... | 8 |
| I.2.2.2.- Objetivos Específicos:..... | 8 |
| I.3.- MARCO TEÓRICO..... | 9 |
| I.3.1.- Antecedentes..... | 9 |
| I.4.- MARCO REFERENCIAL..... | 10 |
| <input type="checkbox"/> Generalidades de las levaduras..... | 10 |
| <input type="checkbox"/> Phylum Ascomycota..... | 11 |
| <input type="checkbox"/> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> | 11 |
| <input type="checkbox"/> Clasificación taxonómica..... | 12 |
| <input type="checkbox"/> Características morfológicas, fisiológicas y factores de virulencia..... | 12 |
| <input type="checkbox"/> Importancia clínica e incidencia..... | 13 |
| CAPITULO II..... | 14 |
| METODOLOGIA..... | 14 |
| II.1.- Diseño de investigación..... | 15 |

| | |
|--|----|
| II.2.- Universo de estudio, tratamiento muestral y muestra..... | 15 |
| II.3.- Definición y clasificación de las variables..... | 15 |
| II.4.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos. | 18 |
| II.5.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos..... | 19 |
| II.6.- Procedimientos y técnicas. | 19 |
| □ Medios de cultivo. | 19 |
| □ Caracterización morfológica y fisiológica..... | 20 |
| □ Expresión de factores de virulencia..... | 20 |
| □ Evaluación de susceptibilidad antifúngica. | 21 |
| □ Ubicación filogenética de las cepas de <i>W. anomalus</i> | 21 |
| II.7.- Aspectos éticos..... | 22 |
| CAPITULO III..... | 23 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | 23 |
| III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | 24 |
| III.1.- Morfología..... | 24 |
| III.1.1.- Caracterización macroscópica de las colonias de <i>W. anomalus</i> | 24 |
| III.1.2.- Caracterización microscópica de las células levaduriformes de <i>W. anomalus</i> | 27 |
| III.1.3.- Estimación de la temperatura óptima de crecimiento. | 30 |
| III.2.- Factores de virulencia. | 32 |
| III.2.1.- Actividad hemolítica..... | 32 |
| III.2.2.- Actividad fosfolipasa y actividad proteolítica. | 33 |
| III.2.3.- Capacidad de penetración..... | 33 |
| III.3.- Concentración mínima Inhibitoria de compuestos antifúngicos sistémicos frente a <i>W. anomalus</i> | 35 |

| | |
|---|-----------|
| III.3.- Análisis filogenético. | 36 |
| III.3.1.- Análisis de secuencias nucleotídicas. | 36 |
| III.3.2- Relaciones evolutivas de <i>W. anomalus</i>. | 37 |
| III.4.- Discusión. | 39 |
| CAPÍTULO IV..... | 45 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 45 |
| IV.1.- CONCLUSIONES..... | 46 |
| IV.2.- RECOMENDACIONES. | 47 |
| IV.3.- BIBLIOGRAFÍA..... | 48 |
| GLOSARIO | 53 |
| ANEXOS | 54 |

LISTA DE TABLAS.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Características macroscópicas de las colonias de <i>W. anomalus</i> | 25 |
| Tabla 2. Características morfológicas de células de las distintas cepas de <i>W. anomalus</i> | 28 |
| Tabla 3. Crecimiento de las distintas cepas de <i>W. anomalus</i> a diferentes temperaturas | 31 |
| Tabla 4. Dimensiones de halos y colonias. Actividad hemolítica. <i>W. anomalus</i> | 32 |
| Tabla 5. Resultados de la actividad de penetración. <i>W. anomalus</i> | 34 |
| Tabla 6. CMI de antifúngicos sistémicos frente a <i>W. anomalus</i> | 35 |
| Tabla 7. BLAST. Región ITS. <i>W. anomalus</i> | 36 |
| Tabla 8. Resultados de Jung J Et Concentraciones vs # de cepas..... | 43 |
| Tabla 9. Resultados de Pandey N Et al. Concentraciones vs # de cepas..... | 43 |

LISTA DE FIGURAS.

| | |
|--|----|
| Figura 1. Caracterización morfológica de las colonias en tres medios de cultivo. Cepa F2.2. <i>W. anomalus</i> (ASD: Agar Sabouraud Dextrosa; PDA: Agar papa dextrosa; CR: Chromoagar Candida)..... | 25 |
| Figura 2. Aspecto de las células levaduriformes bajo el microscopio (aumento de 100 X). Cepa F2.2. <i>W. anomalus</i> | 28 |
| Figura 3. Crecimiento de las cepas de <i>W. anomalus</i> a diferentes temperaturas. Los cultivos se fotografiaron a las 48 horas..... | 31 |
| Figura 4. Actividad hemolítica de <i>W. anomalus</i> | 32 |
| Figura 5. Actividad fosfolipasa. Actividad proteolítica. <i>W. anomalus</i> | 33 |
| Figura 6. Actividad de penetración. Dimorfismo celular. <i>W. anomalus</i> | 34 |
| Figura 7. Relaciones evolutivas de cepas de <i>W. anomalus</i> con otras cepas y especies diferentes | 38 |

LISTA DE ANEXOS.

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Aval proyecto de investigación..... | 55 |
| Anexo 2. Composición de medios de cultivo..... | 56 |
| Anexo 3. Caracterización morfológica de las colonias en tres medios de cultivo. | 57 |
| Anexo 4. Aspecto de las células levaduriformes bajo el microscopio (aumento de 100X)..... | 60 |
| Anexo 5. Actividad de penetración (aumento 10X y 40X). | 62 |
| Anexo 6. Resultados de los ensayos de susceptibilidad frente a antifúngicos. | 64 |
| Anexo 7. Secuencias nucleotídicas región ITS (cepas <i>W. anomalus</i> y cepas de referencia). | 72 |

I. INTRODUCCIÓN.

Los hongos han estado presentes sobre el planeta Tierra mucho antes del advenimiento de los seres humanos. Muchos de ellos forman parte de nuestra dieta, pues se les utiliza como fermentos (pan, cerveza) o productos comestibles (champiñones=*Agaricus bisporus*). Estos organismos eucariotas también han sido protagonistas de grandes avances en la medicina, pues a partir de ellos se ha obtenido uno de los antibióticos más importantes: la penicilina, sintetizada por el hongo *Penicillium notatum*. Por otro lado, también son los agentes causantes de enfermedades en seres humanos y otra gran cantidad de seres vivos. Las afecciones más comunes (micosis) producidas por estos organismos son: candidiasis, blastomicosis, aspergilosis, histoplasmosis, onicomycosis, entre otras (1).

Una micosis es una infección causada por uno o varios hongos; pueden afectar tanto a los seres humanos como a los animales. Las micosis se caracterizan por invadir tejidos y ocasionar afecciones superficiales, subcutáneas ó sistémicas (3).

Las infecciones superficiales fúngicas son las que generalmente afectan a la piel y se denominan dermatofitosis, son producidas por *Epidermophyton*, *Microsporum* o *Trichophyton*. Como ejemplo de estas afecciones encontramos el pie de atleta, que es ocasionado por *Trichophyton* o *Epidermophyton*. Suelen degradar la queratina como uno de los mecanismos de virulencia. Asimismo, las infecciones subcutáneas son aquellas que afectan los tejidos debajo de la piel y estructuras inmediatas como órganos y huesos. Por lo general no son comunes y se caracterizan por ser crónicas(3).

En esta misma línea, las infecciones fúngicas sistémicas pueden afectar tanto a pacientes inmunodeprimidos como normales, por lo que a los hongos también se les considera como patógenos oportunistas. Se conocen algunas especies fúngicas capaces de generar infecciones sistémicas, entre las cuales se tienen a *Cryptococcus* e *Histoplasma* (2) que son recurrentes en pacientes con SIDA. Algunas especies de cándidas también puede afectar de forma sistémica, pues se ha observado que muchas especies invaden órganos importantes como los ojos y riñones(2).

Cualquier persona en el mundo puede contraer una infección causada por hongos, ya que todos los días estamos en contacto con levaduras y esporas. Sin embargo, los individuos que tienen más probabilidades de contraer estas enfermedades son aquellas con un sistema inmune debilitado. Los Centros de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) constantemente rastrean casos de brotes que se producen en ese país. Como ejemplo de ellos tenemos a *Candida auris*, que ha sido señalada como un grave peligro para la salud mundial (4).

Al igual que las bacterias, los hongos conforman parte de la microflora de los animales con los cuales muchas veces tienen una relación comensal. Sin embargo, muchos hongos pueden representar un riesgo para la salud humana, ya que pueden producir eventos zoonóticos. Por lo general, estas enfermedades son desencadenadas por cambios en un ecosistema o variaciones en el comportamiento de los microorganismos(5).

Se ha descubierto que aproximadamente el 60% de las infecciones humanas son de origen animal y el 75% de infecciones nuevas son producto de patógenos que han sido capaces de saltar entre especies (5). Las zoonosis siguen siendo poco frecuentes y por lo general ocurren por la exposición continua que tienen los seres humanos con los animales que actúan como reservorios de estos microorganismos patógenos.

En el 2001 se identificó 1415 especies de microorganismos que son un peligro para la salud mundial, de los cuales el 61% son zoonóticos. De las especies fúngicas descubiertas en este grupo, aproximadamente 307 especies de hongos causan algún tipo de micosis en los seres humanos (5). *Wickerhamomyces anomalus* ha sido descrito como parte de la microflora de algunos animales incluyendo roedores (34); sin embargo, no se ha detectado si ha sido protagonista de zoonosis. La información bibliográfica sugiere que es un microorganismo clínicamente importante, pues ha sido causante de algunas infecciones nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos (18, 45).

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Las zoonosis son enfermedades que se transmiten desde animales vertebrados hacia los seres humanos (6). El contagio se produce cuando un animal infectado con un parásito, virus, bacteria u hongo entra en contacto con una persona, de manera accidental o por contacto frecuente (7). Este tipo de fenómenos “naturales” pueden presentarse a nivel global o únicamente pueden ser específicos para una región determinada. Las infecciones zoonóticas se producen sobre todo a consecuencia de la domesticación de animales para la alimentación, debido a que los granjeros o criadores toman pocas o ninguna precaución para evitarlas (8).

En algunos países de Latinoamérica, específicamente en la serranía ecuatoriana, es tradicional la cría y consumo de cuyes (cobayo o conejillo de indias, *Cavia porcellus*). Estudios anteriores han identificado diversos tipos de microorganismos como parte de la microflora de las mucosas nasales de estos animales, que pueden representar un riesgo microbiológico para aquellos individuos que tienen contacto directo y frecuente con estos roedores.

Pese a su importancia epidemiológica, son muy pocas las investigaciones que hasta la fecha han abordado el estudio de la presencia de microorganismos zoonóticos en los tejidos de los cuyes. De allí que este sea el problema científico que constituye el punto de partida de nuestra tesis de grado.

A través de la ejecución de este proyecto de tesis nos planteamos profundizar en relación con la caracterización fenotípica y molecular de cepas de *W. anomalus* aisladas a partir de cuyes criados en granjas de la Provincia del Cañar. Para ello, evaluamos aspectos como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y fisiológicas, factores de virulencia y relaciones filogenéticas con otras especies relacionadas.

I.2.- JUSTIFICACIÓN.

– **Novedad científica.**

En esta investigación nos centramos en cepas de una levadura en particular, *Wickerhamomyces anomalus*, que han sido aisladas a partir de las mucosas de las fosas nasales de cuyes criados en la provincia del Cañar–Ecuador. Hasta donde hemos podido consultar, no se han publicado estudios relacionados con aislados de cepas de *W. anomalus* a partir de muestras tomadas de un roedor y mucho menos caracterizaciones morfológicas y fisiológicas, ni tampoco información sobre las condiciones de crecimiento de estas cepas en particular. Algunas investigaciones han identificado a esta levadura como un patógeno emergente en la salud pública; por ello, se buscará también identificar factores de virulencia y relaciones filogénicas que mantiene esta especie con otras relacionadas a nivel evolutivo.

Este proyecto es importante ya que contribuirá con la generación de nuevos conocimientos acerca de esta levadura y aportará información relevante para otras investigaciones que tengan el objetivo de encontrar herramientas en la prevención y cura de enfermedades zoonóticas.

– **Aporte científico: teórico, metodológico y práctico.**

Con esta investigación pretendemos aportar teóricamente con nuevos conocimientos en el campo de la micología, diagnóstico y medicina en general. La investigación de *W. anomalus* analizará las características morfológicas, factores de virulencia, condiciones de crecimiento y relaciones evolutivas con otras especies por medio de un árbol filogenético.

Los resultados obtenidos ayudarán a futuras investigaciones que busquen prevenir la aparición de nuevas enfermedades de origen zoonótico. A su vez, con el empleo de distintas técnicas en la parte experimental de la investigación, el estudiante investigador y los demás autores de este proyecto desarrollaran nuevas habilidades en el ámbito práctico del laboratorio microbiológico.

- **Beneficios: humanos, ambientales, económicos, educativos y de formación profesional.**

El principal beneficiario de este proyecto será Yo, como estudiante investigador, ya que este aporte científico a realizarse como trabajo de grado, al ser aprobado me permitirá obtener el título profesional de Químico Farmaceuta. También serán beneficiadas todas las personas involucradas que hayan contribuido con conocimientos y destrezas a lo largo del desarrollo de este estudio (por ejemplo, mi tutora y co-tutor, y sus colaboradores científicos), debido a que la información generada puede ser incluida en artículos científicos, lo que implica derechos de autoría. Como beneficiarios indirectos podemos mencionar a las personas que están involucradas con la crianza, venta y consumo de cuyes, puesto que los resultados que se obtenga podrían servir como una herramienta de alerta ante posibles enfermedades de riesgo por exposición a agentes patógenos.

La Universidad Católica de Cuenca también se verá beneficiada en el caso que la investigación sea publicada en revistas de alto impacto, pues esto significaría mayor prestigio para todos los participantes e institución. Mediante la investigación de la levadura *W. anomalus*, y según los resultados que se obtengan, se podrá aportar con nueva información enfocada al conocimiento, diagnóstico, prevención y cura de futuras infecciones ocasionados por este microorganismo poco convencional.

I.2.1.- PREGUNTAS CIENTÍFICAS:

- ¿Cuáles son las características morfológicas de las cepas de *W. anomalus* aisladas a partir de mucosa nasal de cuyes?
- ¿Qué factores de virulencia expresan estas cepas de *W. anomalus*?
- ¿Cuál es el grado de susceptibilidad de estas cepas a antifúngicos de uso terapéutico?
- ¿Cuáles son las relaciones evolutivas (filogenéticas) de estas cepas con otras especies de levaduras?

I.2.2.- OBJETIVOS.

I.2.2.1.- Objetivo General:

Caracterizar fenotípica y molecularmente cepas de *Wickerhamomyces anomalus* aisladas a partir de mucosa nasal de cuyes criados en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador).

I.2.2.2.- Objetivos Específicos:

1. Caracterizar, desde el punto de vista morfológico, cepas de origen animal de *W. anomalus* aisladas a partir de mucosa nasal de cuyes (*C. porcellus*) criados en granjas de la Provincia del Cañar (Ecuador);
2. Detectar la producción de factores de virulencia por parte de dichas cepas;
3. Determinar la susceptibilidad de estas cepas de *W. anomalus* frente a compuestos antifúngicos;
4. Determinar la filogenia de las cepas utilizando herramientas moleculares y bioinformáticas.

I.3.- MARCO TEÓRICO

I.3.1.- Antecedentes.

Se ha realizado una exhaustiva búsqueda de información relacionada al tema que estamos proponiendo. Para ello, hemos utilizado diferentes buscadores y bases de datos científicas como: Google, Google académico, Scopus, Taylor & Francis, Web Of Science y ProQuest. Para realizar la búsqueda utilizamos operadores booleanos (AND, OR y NOT) y palabras claves en español y en inglés animals, zoonosis, micosis, *W. anomalus*, *Hansenula anómala*, *Pichia anómala*, mycoses, pets, characterization. Sin embargo, hasta el momento no hemos identificado estudios que reporten la caracterización fenotípica y molecular a cepas de *W. anomalus* aisladas a partir de fosas nasales de roedores. No obstante, hemos podido identificar estudios relacionados, los cuales presentamos a continuación.

Las aves, al igual que muchos animales, son hospederas de una microflora fúngica muy diversa, de las cual se han distinguido algunas especies con gran potencial zoonótico. En Brasil, en la localidad de Cuiabá en el zoológico de UFMT (Universidad Federal de Mato Grosso), se realizó una investigación sobre las diferentes especies de levaduras que están presentes en las excretas de aves de rapiña, y que pueden causar micosis en los seres humanos(9). Entre las levaduras oportunistas que se hallaron en las muestras se encontró a *W. anomalus* (9). El estudio no indica si se realizó una caracterización fenotípica ni molecular de la mencionada especie. Indicamos que esta investigación no pertenece a una revista científica, sino que es parte de un proyecto que sirvió como trabajo de titulación.

Una de las principales enfermedades que afectan a los equinos son las infecciones en las vías respiratorias. Una investigación realizada en diferentes localidades de Brasil identificó las levaduras más comunes que habitan en las fosas nasales de los equinos. Una de las especies halladas fue *W. anomalus* la cual, según el estudio,

puede causar infecciones en los seres humanos(10). El estudio identificó las especies mediante el sistema VITEK®2; no se indica si se realizó una caracterización morfológica ni fisiológica de la única cepa de *W. anomalus* que se halló. Sin embargo, se efectuaron pruebas de susceptibilidad frente a antifúngicos, cuyos resultados indican que la concentración mínima inhibitoria (MIC) que presentó *W. anomalus* para anfotericina B es de 0,125 µg/ml, para itraconazol 0,25 µg/ml, y para fluconazol 1 µg/ml (10).

W. anomalus también ha sido identificada como parte de la flora microbiana que habita y coloniza diferentes órganos en cerdos, criados en China. Fue a partir de esos animales que se aisló y se sometió algunas cepas a experimentos de identificación y caracterización fenotípica. El estudio da a conocer los resultados morfológicos característicos como color de las colonias (blanco lechoso), aspecto (secas sin brillo con superficie opaca) (11), forma y tamaño (el centro de cada una es convexo con borde áspero con un diámetro de 3 mm). En el microscopio las células levaduriformes presentaron forma redondeada y reproducción por gemación. La temperatura óptima de crecimiento que indica este estudio para estas cepas es de 28 °C (11).

I.4.- MARCO REFERENCIAL

– Generalidades de las levaduras.

Actualmente se conocen alrededor de 1500 especies de levaduras unicelulares. En su mayoría están ubicadas en el *phylum* Ascomycota del reino Fungi, y solo unas cuantas son Basidiomycota. Estos organismos se encuentran en todo el mundo y son capaces de adaptarse a las superficies que contengan los sustratos necesarios para su desarrollo. Son organismos eucariotas, con un diámetro aproximado de 0,075 mm. Por lo general las levaduras tienen forma esférica u ovalada, y algunas pueden producir filamentos (hifas) (12).

Se reproducen de forma asexual, bipartición o gemación; sin embargo, también pueden multiplicarse de forma sexual (12). Cuando la división ocurre por gemación, la célula desarrolla una pequeña protuberancia que se agranda, madura y se desprende. Otras levaduras se reproducen por fisión: durante el proceso, la célula progenitora se divide y da como resultado dos células hijas idénticas. El *phylum Ascomycota* es ampliamente estudiado ya que en su grupo podemos encontrar hongos emergentes de interés clínico.

– **Phylum Ascomycota.**

El *phylum Ascomycota* se compone de tres *subphyla*. *Pezizomycotina* con 13 clases, 124 órdenes y 507 familias. *Saccharomycon* con una clase, una orden y 13 familias y *Taphrinomiotina* con cinco clases, cinco órdenes y seis familias (13). A nivel mundial, los hongos ascomicetos conforman el grupo más amplio, representando el 72% de géneros reconocidos y el 60% de las especies, dentro de las cuales se incluye a *W. anomalus*.

Se distribuyen ampliamente en todos los hábitats continentales ya sea como saprobios, parásitos o simbioses, lo cual les permite interactuar con la gran diversidad de organismos que los rodean (14). La mayoría de hongos identificados como patógenos pertenecen a esta división que incluye al orden Saccharomycetales, algunas de cuyas especies han sido protagonistas de micosis en seres humanos en los últimos años (15).

– ***Wickerhamomyces anomalus*.**

Wickerhamomyces anomalus es una levadura unicelular que ha sido descubierta en distintos tipos de hábitats y organismos tales como plantas, animales, insectos y alimentos fermentados (16). Clínicamente, la especie está asociada a brotes clonales y distintos tipos de patologías. Algunos estudios han demostrado que

W. anomalus es causante de infecciones nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos o inmunosuprimidos (17).

Hasta el momento no se ha publicado evidencia experimental que indique que *W. anomalus* se transmita de animales a los seres humanos; sin embargo, por estar relacionada con enfermedades infecciosas, podría ser considerada como un microorganismo zoonótico (18).

– **Clasificación taxonómica.**

W. anomalus es un organismo celular eucariota, Opistoconta. Pertenece al reino Fungi y sub reino Dikarya; filo Ascomicota; subfilo Saccaromyceta; clase Saccharomicetes; orden Saccharomycetales; familia Phaffomycetaceae; género *Wickerhamomyces* y especie *Wickerhamomyces anomalus* (19).

– **Características morfológicas, fisiológicas y factores de virulencia.**

W. anomalus se reproduce sexualmente con la formación de ascosporas, y asexualmente por medio de gemación (20). En agar con extracto de malta al 5% las células levaduriformes que se desarrollan son ovoides, se presentan tanto solas o en parejas y en pequeños grupos (21). Las colonias son de color blanco marfil con márgenes levemente aserrados y superficies lisas (22, 23). La temperatura óptima de crecimiento oscila en un rango de 25 °C a 30 °C. Cuando la temperatura es mayor a los 40 °C, puede ser letal para ciertas cepas.

El pH óptimo de crecimiento es de 4,5 y cuando aumenta a 6,5 se registra descenso en el crecimiento. Algunas cepas son capaces de expresar algunos factores de virulencia, como formación de pseudohifas y producción de fosfolipasas (23). *W. anomalus* puede crecer en medios que contengan glucosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa, malatosa, melezitosa, metil- α -D-glucósido, almidón soluble, celobiosa,

salicina, etanol, glicerol, eritritol, d-manitol, d-glucitol, dl-lactato, succinato, citrato y nitratos (21).

– **Importancia clínica e incidencia.**

Alrededor del mundo se producen muchas enfermedades por microorganismos poco comunes. Las micosis han sido protagonistas de infecciones, que en algunas ocasiones son producidas por levaduras no convencionales, como es el caso de *W. anomalus*. Por tal razón, ciertas investigaciones han clasificado a este microorganismo como parte de aquellos agentes biológicos de interés clínico (24). Existen evidencias que demuestran que *W. anomalus* puede colonizar diferentes órganos en los seres humanos, debido a que diferentes cepas han sido aisladas a partir de muestras de pulmón (21).

En Brasil una paciente de 19 meses de edad presentó una sepsis fúngica causada por una levadura desconocida; la niña ingresó a cuidados intensivos con neumonía grave, displasia broncopulmonar y problemas en su desarrollo. El causante fue una cepa de *W. anomalus*. La identificación se realizó mediante métodos microbiológicos clásicos y secuenciación de la región ITS. Los aislados exhibieron susceptibilidad a la anfotericina B, ketoconazol, itraconazol, voriconazol y fluconazol (17).

Hasta donde hemos podido consultar, no se han publicado datos sobre tasas de incidencia y prevalencia de micosis causadas por *W. anomalus* a nivel nacional ni local en Sudamérica; sin embargo, en países como España se ha reportado información epidemiológica sobre *W. anomalus*. Un estudio refiere datos de vigilancia poblacional de fungemias raras, donde se registró 788 pacientes infectados por levaduras, de los cuales 767 aceptaron participar en el estudio. La especie *W. anomalus* fue aislada a partir de dos casos, que representan el 14,3% de todos los casos analizados (24).

CAPITULO II
METODOLOGIA.

II.1.- Diseño de investigación.

La investigación es mixta, empírica, observacional y descriptiva con corte transversal.

II.2.- Universo de estudio, tratamiento muestral y muestra.

Este proyecto está basado en una investigación previa que fue dirigida por el Dr. Andrés Yarzabal, docente investigador de la Universidad Católica de Cuenca (34). Por lo que el universo de estudio, el tratamiento muestral y la muestra ya fueron trabajadas, analizadas y expuestas; y se encuentran disponibles para nuestra investigación. En total, la muestra con la que se trabajó consta de ocho cepas de *W. anomalus*, disponibles en una colección creada para tal fin.

II.3.- Definición y clasificación de las variables.

1. Medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Sabouraud Dextrosa (ASD), HiChrome Candida, ASD suplementado con sangre desfibrinada, ASD suplementado con yema de huevo y ASD suplementado con caseína (leche):
Cualitativa.

Definición: Es un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir el desarrollo de microorganismos.

Escala de medición:

- Crecimiento o ausencia de crecimiento del microorganismo.

2. Morfología de las colonias: Cualitativa nominal-discreta.

Definición: Conjunto de características físicas que presentan las colonias levaduriformes. Generalmente indica el color, superficie, brillo, borde, elevación, forma, textura y aspecto.

Escala de medición:

- Azul, rojo, verde, magenta, amarillo, naranja, blanco, celeste y lila.
- Lisa, rugosa y plegada.
- Intenso, opaco, apagado o ausente.
- Entero, ondulado, lobulado, erosionado, filamentoso y rizado.
- Plana, elevado, convexo, pulvinada y umbonada.
- Puntiforme, circular, rizoide, irregular y filamentoso.
- Suave, rugosa, arrugada, secas con aspecto polvoriento.
- Húmedo o seco.

3. Morfología celular: Cualitativa nominal-ordinal.

Definición: Conjunto de características estructurales específicas como: forma, presentación celular, presencia de hifas, pseudohifas y forma de reproducción.

Escala de medición:

- Fusiformes, estrelladas, prismáticas, aplanadas, elípticas, globosas o redondeadas.
- Unicelular o pluricelular.
- Presencia o ausencia.
- Gemación o ascosporas.

4. Temperatura óptima de crecimiento: Cuantitativa-continua.

Definición: Es aquella temperatura en la que las células se multiplican a una tasa máxima.

Escala de medición:

- Grados centígrados.

5. Actividad fosfolipasa: Cualitativa-Continua.

Definición: Producción de enzimas capaces de hidrolizar el enlace éster de los glicerofosfolípidos.

Escala de medición:

- Presencia o ausencia de la formación de halos alrededor de cada inóculo.

6. Actividad hemolítica: Cualitativa-ordinal.

Definición: Capacidad de promover la lisis de la membrana de los eritrocitos.

Escala de medición:

- Presencia o ausencia de un halo alrededor del inóculo.

7. Actividad proteolítica: Cualitativa-ordinal.

Definición: Capacidad de causar la hidrólisis de los enlaces peptídicos.

Escala de medición:

- Presencia o ausencia de un halo alrededor del inóculo.

8. Capacidad de penetración de superficies semi-sólidas: Cualitativa-ordinal.

Definición: Es una condición que establece el microorganismo con los tejidos invadidos (espacio vascular o medio de cultivo) para una colonización y un paso necesario para una infección. Generalmente están involucradas diversas proteínas secretadas por la pared celular (levadura).

Escala de medición:

- Presencia o ausencia de estructuras levaduriformes dentro del medio que se cultiva.

9. CMI frente al Fluconazol, Caspofungina, Micafungina, Anfotericina B y Voriconazol: Cuantitativa-continua.

Definición: Es la mínima concentración de los antifúngicos (en $\mu\text{g/ml}$) que inhibe el crecimiento de las levaduras.

Escala de medición:

- CMI en $\mu\text{g/ml}$.

II.4.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.

Los métodos y técnicas que se implementaron durante la fase de experimentación de este proyecto fueron aquellos convencionales utilizados en el área de la microbiología-micología; de igual manera los instrumentos que se utilizaron son típicos como: asas bacteriológicas, mecheros, cajas Petri, láminas porta objetos y cubre objetos, cabina flujo laminar y espectrofotómetro, entre otros.

II.5.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos.

En esta investigación empleamos programas bioinformáticos que nos permitieron armar un árbol filogenético. El software MEGA X realiza una gran cantidad de análisis estadísticos de la evolución molecular de una o varias especies. Esto nos permitió evaluar las relaciones evolutivas que mantienen las cepas de *W. anomalus* entre sí y con otras especies. Los resultados que el programa arroja son de manera gráfica.

También empleamos como software de análisis de datos a BLAST-N. Es un programa bioinformático de alineamiento de secuencias que permite comparar una secuencia problema con otras disponibles en su banco de datos. Para la exposición y recolección de los resultados elaboramos una base de datos en Microsoft Excel versión 2019. La información generada es expuesta en forma de tablas y matrices.

II.6.- Procedimientos y técnicas.

– Medios de cultivo.

Los medios de cultivos que se utilizaron durante todas las fases experimentales fueron: Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Sabouraud Dextrosa (ASD), HiChrome Candida (CR), ASD suplementado con sangre desfibrinada, ASD suplementado con yema de huevo y ASD suplementado con caseína (leche).

– **Caracterización morfológica y fisiológica.**

Para la caracterización macroscópica se implementaron técnicas que permitieron evaluar de forma visual las características típicas de las colonias levaduriformes como: color, superficie, brillo, borde, elevación, forma, textura y aspecto. En la valoración de la morfología microscópica se implementaron técnicas convencionales de fijación de la muestra sobre una placa porta objetos, con el objetivo de ver las características de la levadura que se estudió bajo un microscopio, con aumento de 100X y 400X. También se estableció la temperatura óptima de crecimiento basada en métodos ya implementados previamente (25).

– **Expresión de factores de virulencia.**

Las técnicas y métodos que se implementó durante esta fase fueron basadas en otras investigaciones realizadas con levaduras con comportamientos semejantes a *W. anomalus* (26). Para ello, se implementó medios que permitan evidenciar la presencia o no de un factor de virulencia. En la determinación de fosfolipasas se trabajó con el medio de cultivo ASD suplementado con yema de huevo liofilizada 1,44% v/v. Para determinar la presencia de hemolisinas, el medio ASD fue suplementado con sangre de cordero desfibrinada 2,04 % v/v.

En la identificación de las actividades proteolíticas, el medio AN fue enriquecido con caseína (leche semidescremada pasteurizada al 10 % v/v) (27, 28). El experimento de actividad de penetración se realizó mediante el cultivo de las cepas en un medio agarizado para luego mediante cortes en las áreas de interés y haber sido observadas en el microscopio se confirmó o no si existe penetración de las células levaduriformes.

– **Evaluación de susceptibilidad antifúngica.**

Para este ensayo se empleó compuestos antifúngicos que son utilizados en tratamientos de ciertos tipos de micosis, como el Fluconazol, Voriconazol (30), Caspofungina (31), Micafungina y Anfotericina B. Los métodos y técnicas que se utilizaron fueron en base al sistema VITEK®2 (32) -Realizado en el Hospital Universitario del Río de la ciudad de Cuenca-Ecuador-; a su vez, los resultados que obtenidos fueron comparados de acuerdo a los estándares clínicos de laboratorio (33).

– **Ubicación filogenética de las cepas de *W. anomalus*.**

Para esta prueba experimental se partió de resultados obtenidos en trabajos investigativos anteriores (34). Las secuencias nucleotídicas con las que trabajaremos pertenecen a la región ITS (Internal Transcribed Spacer en inglés); se trata de un marcador molecular empleado ampliamente para la identificación de hongos a nivel de especie. Las secuencias de la región ITS de las cepas de *W. anomalus* y fueron comparadas con otras que son de la misma especie y de especies más lejanas, filogenéticamente hablando (29). El árbol filogenético fue construido con el programa bioinformático MegaX, BLAST, y secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la base de datos GenBank (29).

II.7.- Aspectos éticos.

Este proyecto está elaborado en base una investigación anterior (34) realizada en la Universidad Católica de Cuenca, donde las muestras obtenidas fueron de origen animal. Las mismas se obtuvieron, previa autorización de parte de los propietarios de las fincas dedicadas a la cría de cuyes para consumo humano. Se aislaron diferentes tipos de levaduras, incluyendo *W. anomalus*, que habitan en las fosas nasales de los cuyes en granjas de la provincia del Cañar-Ecuador. Por no tratarse de investigación con seres humanos, no es necesaria la obtención de un permiso especial por parte de un CEISH.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

III.1.- Morfología.

III.1.1.- Caracterización macroscópica de las colonias de *W. anomalus*.

La siembra por agotamiento de las distintas cepas de *W. anomalus* incluidas en este trabajo en los tres medios de cultivo empleados (Agar PDA, Sabouraud Dextrosa y CHROMAGAR CANDIDA) permitió identificar las características propias de sus colonias. Como podemos ver en la Figura 1, Tabla 1 y Anexo 3 estos rasgos son muy semejantes entre sí y coinciden, dependiendo del medio agarizado en el que han sido cultivadas. Las características comunes identificadas son: el color (blanco), la superficie (lisa), brillo (apagado), margen (entero), elevación (convexo), forma (circular), textura (suave) y aspecto (seco). Las particularidades distinguidas según el medio de cultivo fueron en cuanto al color (CR-lila), brillo (PDA-intenso), margen (CR-ondulado), elevación (CR-plana) y textura (CR- seca).

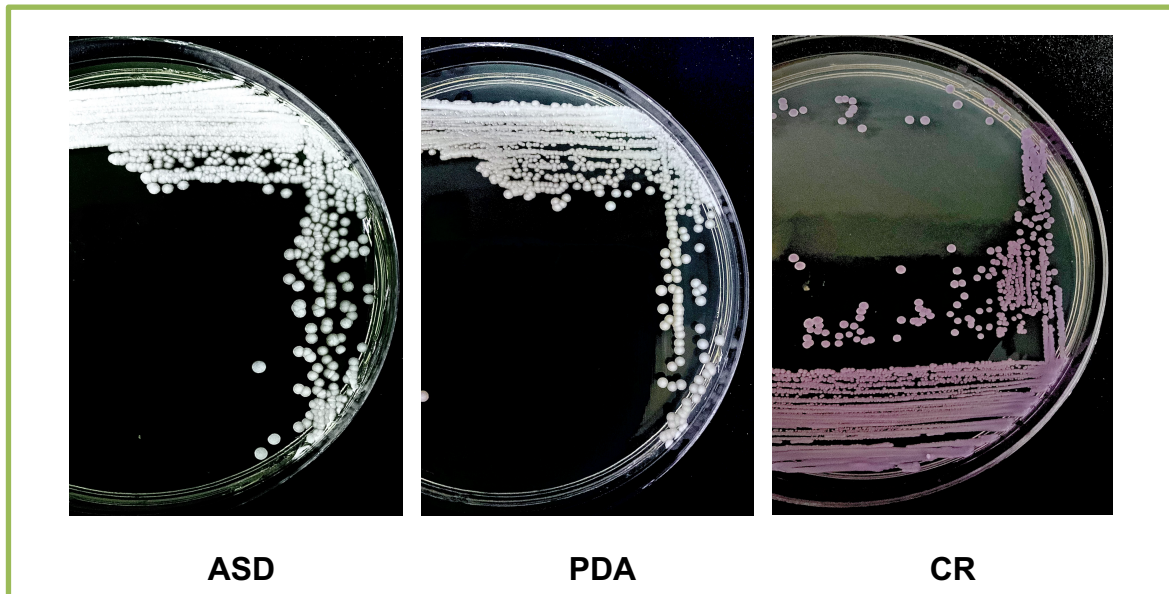


Figura 1. Caracterización morfológica de las colonias en tres medios de cultivo. Cepa F2.2. *W. anomalus* (ASD: Agar Sabouraud Dextrosa; PDA: Agar papa dextrosa; CR: Chromoagar Candida)

Tabla 1. Características macroscópicas de las colonias de *W. anomalus*.

| Cepa F2.2 | | | |
|---------------------------------|------------|------------|---|
| Características Medio | ASD | PDA | CR |
| Color | Blanco | Blanco | Lila |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |
| Brillo | Apagado | Intenso | Apagado |
| Margen | Entero | Entero | Ondulado |
| Elevación | Convexo | Convexo | Plana |
| Forma | Circular | Circular | Circular |
| Textura | Suave | Suave | Secas con aspecto pulverulento o algodonoso |
| Aspecto | Seco | Seco | Seco |
| Cepa F4.1 | | | |
| Color | Blanco | Blanco | Lila |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |
| Brillo | Apagado | Intenso | Apagado |
| Margen | Entero | Entero | Ondulado |
| Elevación | Convexo | Convexo | Plana |

| | | | |
|-------------------|----------|----------|---|
| Forma | Circular | Circular | Circular |
| Textura | Suave | Suave | Secas |
| Aspecto | Seco | Seco | Seco |
| Cepa G2.1 | | | |
| Color | Blanco | Blanco | Lila |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |
| Brillo | Apagado | Intenso | Apagado |
| Margen | Entero | Entero | Ondulado |
| Elevación | Convexo | Convexo | Plana |
| Forma | Circular | Circular | Circular |
| Textura | Suave | Suave | Secas con aspecto pulverulento o algodonoso |
| Aspecto | Seco | Seco | Seco |
| Cepa G3.1 | | | |
| Color | Blanco | Blanco | Lila |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |
| Brillo | Apagado | Intenso | Apagado |
| Margen | Entero | Entero | Ondulado |
| Elevación | Convexo | Convexo | Plana |
| Forma | Circular | Circular | Circular |
| Textura | Suave | Suave | Secas |
| Aspecto | Seco | Seco | Seco |
| Cepa G6.2 | | | |
| Color | Blanco | Blanco | Lila |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |
| Brillo | Apagado | Intenso | Apagado |
| Margen | Entero | Entero | Ondulado |
| Elevación | Convexo | Convexo | Plana |
| Forma | Circular | Circular | Circular |
| Textura | Suave | Suave | Secas |
| Aspecto | Seco | Seco | Seco |
| Cepa G7.2 | | | |
| Color | Blanco | Blanco | Lila |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |
| Brillo | Apagado | Intenso | Apagado |
| Margen | Entero | Entero | Ondulado |

| | | | |
|-------------------|----------|----------|----------|
| Elevación | Convexo | Convexo | Plana |
| Forma | Circular | Circular | Circular |
| Textura | Suave | Suave | Secas |
| Aspecto | Seco | Seco | Seco |
| Cepa G8.1 | | | |
| Color | Blanco | Blanco | Lila |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |
| Brillo | Apagado | Intenso | Apagado |
| Margen | Entero | Entero | Ondulado |
| Elevación | Convexo | Convexo | Plana |
| Forma | Circular | Circular | Circular |
| Textura | Suave | Suave | Secas |
| Aspecto | Seco | Seco | Seco |
| Cepa G9.1 | | | |
| Color | Blanco | Blanco | Lila |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |
| Brillo | Apagado | Intenso | Apagado |
| Margen | Entero | Entero | Ondulado |
| Elevación | Convexo | Convexo | Plana |
| Forma | Circular | Circular | Circular |
| Textura | Suave | Suave | Secas |
| Aspecto | Seco | Seco | Seco |

III.1.2.- Caracterización microscópica de las células levaduriformes de *W. anomalus*.

Como se reporta en la Figura 2, Tabla2 y Anexo 4 la morfología de las células de las distintas cepas de *W. anomalus* también es muy similar. En general, se trata de células con forma elíptica y se presentan de forma unicelular. En este ensayo no evidenciamos la presencia de hifas ni de pseudohifas. La forma de reproducción que tiene *W. anomalus* es por gemación (asexual).

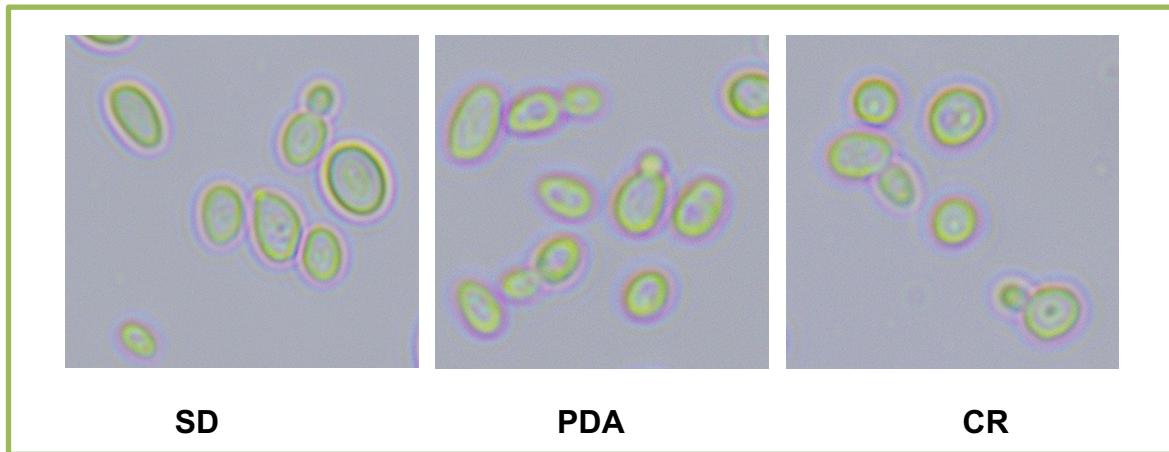


Figura 2. Aspecto de las células levaduriformes bajo el microscopio (aumento de 100 X). Cepa F2.2. *W. anomalus*.

Tabla 2. Características morfológicas de células de las distintas cepas de *W. anomalus*.

| Cepa F2.2 | | | |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Características / Medio | SD | PDA | CR |
| Forma celular | Elíptica | Elíptica | Elíptica |
| Presentación celular | Unicelulares | Unicelulares | Unicelulares |
| Hifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Pseudohifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Gemación | Presencia | Presencia | Presencia |
| Ascoesporas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Cepa F4.1 | | | |
| Forma celular | Elíptica | Elíptica | Elíptica |
| Presentación celular | Unicelulares | Unicelulares | Unicelulares |
| Hifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Pseudohifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Gemación | Presencia | Presencia | Presencia |
| Ascoesporas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Cepa G2.1 | | | |
| Forma celular | Elíptica | Elíptica | Elíptica |
| Presentación celular | Unicelulares | Unicelulares | Unicelulares |
| Hifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |

| | | | |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| Pseudohifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Gemación | Presencia | Presencia | Presencia |
| Ascoesporas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Cepa G3.1 | | | |
| Forma celular | Elíptica | Elíptica | Elíptica |
| Presentación celular | Unicelulares | Unicelulares | Unicelulares |
| Hifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Pseudohifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Gemación | Presencia | Presencia | Presencia |
| Ascoesporas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Cepa G6.2 | | | |
| Forma celular | Elíptica | Elíptica | Elíptica |
| Presentación celular | Unicelulares | Unicelulares | Unicelulares |
| Hifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Pseudohifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Gemación | Presencia | Presencia | Presencia |
| Ascoesporas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Cepa G7.2 | | | |
| Forma celular | Elíptica | Elíptica | Elíptica |
| Presentación celular | Unicelulares | Unicelulares | Unicelulares |
| Hifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Pseudohifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Gemación | Presencia | Presencia | Presencia |
| Ascoesporas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Cepa G8.1 | | | |
| Forma celular | Elíptica | Elíptica | Elíptica |
| Presentación celular | Unicelulares | Unicelulares | Unicelulares |
| Hifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Pseudohifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Gemación | Presencia | Presencia | Presencia |
| Ascoesporas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Cepa G9.1 | | | |
| Forma celular | Elíptica | Elíptica | Elíptica |
| Presentación celular | Unicelulares | Unicelulares | Unicelulares |
| Hifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Pseudohifas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| Gemación | Presencia | Presencia | Presencia |

| | | | |
|-------------|----------|----------|----------|
| Ascoesporas | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
|-------------|----------|----------|----------|

III.1.3.- Estimación de la temperatura óptima de crecimiento.

Los resultados que obtuvimos a las 48 horas de cultivo muestran que todas las cepas incluidas en el estudio fueron capaces de multiplicarse (“crecer”) a 23°C. A los 25°C observamos un menor crecimiento de las cepas G3.1 y G7.1, mientras que las demás cepas no presentaron cambios. A 37°C el 100% de las cepas presentaron un crecimiento escaso; sin embargo, las cepas con mayor crecimiento a esta temperatura fueron G2.1, G6.2, G9.1, F2.2 y F4.1. Finalmente, no observamos crecimiento de ninguna cepa a 39°C. De forma general podemos destacar que el mayor crecimiento se produce a los 23°C y disminuye a los 36°C. Por ello, podríamos considerar a estas cepas de *W. anomalus* como mesófilas.

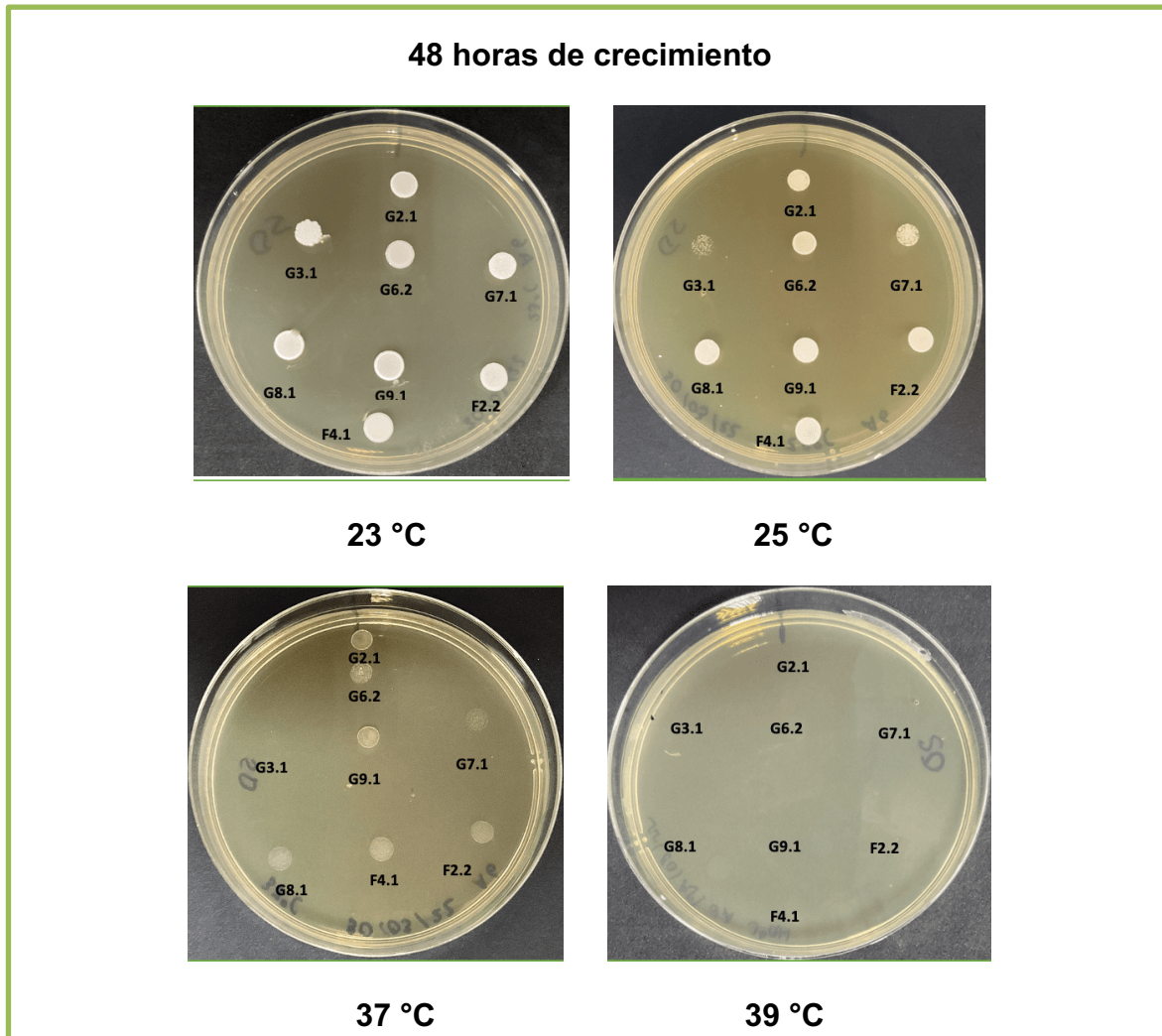


Figura 3. Crecimiento de las cepas de *W. anomalus* a diferentes temperaturas. Los cultivos se fotografiaron a las 48 horas

Tabla 3. Crecimiento de las distintas cepas de *W. anomalus* a diferentes temperaturas

| Crecimiento de diferentes temperaturas (48 h de cultivo) | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Cepas/ Temperatura | G2.1 | G3.1 | G6.2 | G7.1 | G8.1 | G9.1 | F2.2 | F4.1 |
| 23°C | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 25°C | ++++ | + | ++++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 37°C | ++ | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ |
| 39°C | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

III.2.- Factores de virulencia.

III.2.1.- Actividad hemolítica.

El experimento permitió evidenciar que el 100 % de las cepas estudiadas producen sustancias capaces de lisar glóbulos rojos (Figura 4, Tabla 4). En efecto, alrededor de cada colonia se formaron halos translúcidos, los mismos que son propios de una beta hemólisis. El halo de mayor dimensión fue formado por la cepa G2.1 (22,2 mm), mientras que el de menor tamaño fue el que se formó alrededor de la cepa G6.2 (16.6 mm).

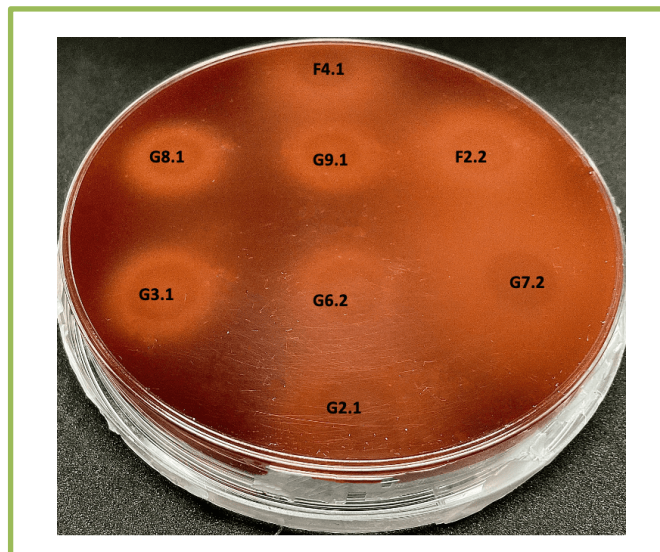


Figura 4. Actividad hemolítica de *W. anomalous*

Tabla 4. Dimensiones de halos y colonias. Actividad hemolítica. *W. anomalous*

| Cepas | G2.1 | G3.1 | G6.2 | G7.2 | G8.1 | G9.1 | F2.2 | F4.1 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Colonia | 10,8mm | 11,1mm | 10,3mm | 10,6 | 11,4mm | 12,7mm | 11,1mm | 12,1mm |
| Halos | 22,2mm | 15,8mm | 16,6mm | 18,6mm | 17,1mm | 17,4mm | 19,4mm | 20,2mm |

III.2.2.- Actividad fosfolipasa y actividad proteolítica.

Ninguna de las ocho cepas de *W. anomalus* secretaron fosfolipasas o proteasas. Por ello, no observamos la formación de halos alrededor de las colonias en los experimentos respectivos (Figura 5).

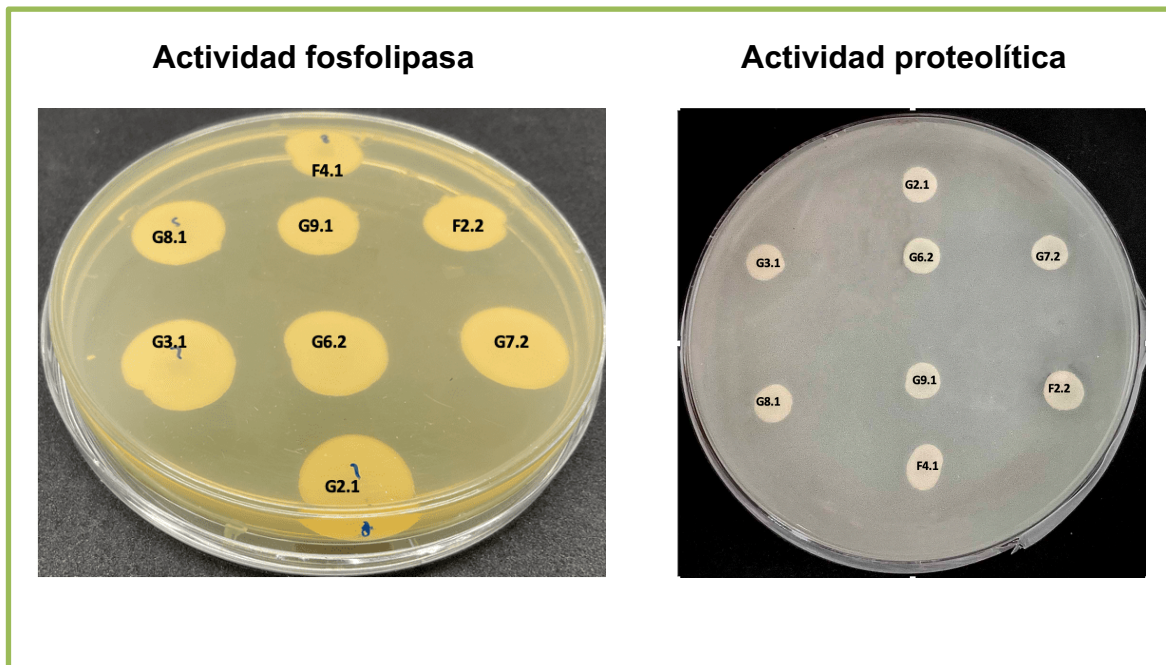


Figura 5. Actividad fosfolipasa. Actividad proteolítica. *W. anomalus*.

III.2.3.- Capacidad de penetración.

El experimento con el que evaluamos la capacidad de penetración, de las cepas de *W. anomalus*, en sustrato semi-sólido nos permitió observar que todas ellas son capaces de hacerlo (Figura 6, Tabla 5 y Anexo 5). Como vemos en las imágenes microscópicas (Figura 6 y Anexo 5), todas las cepas tienen la capacidad de formar hifas verdaderas (dimorfismo), que contienen una gran cantidad de células y cuya longitud puede alcanzar varias micras de distancia.

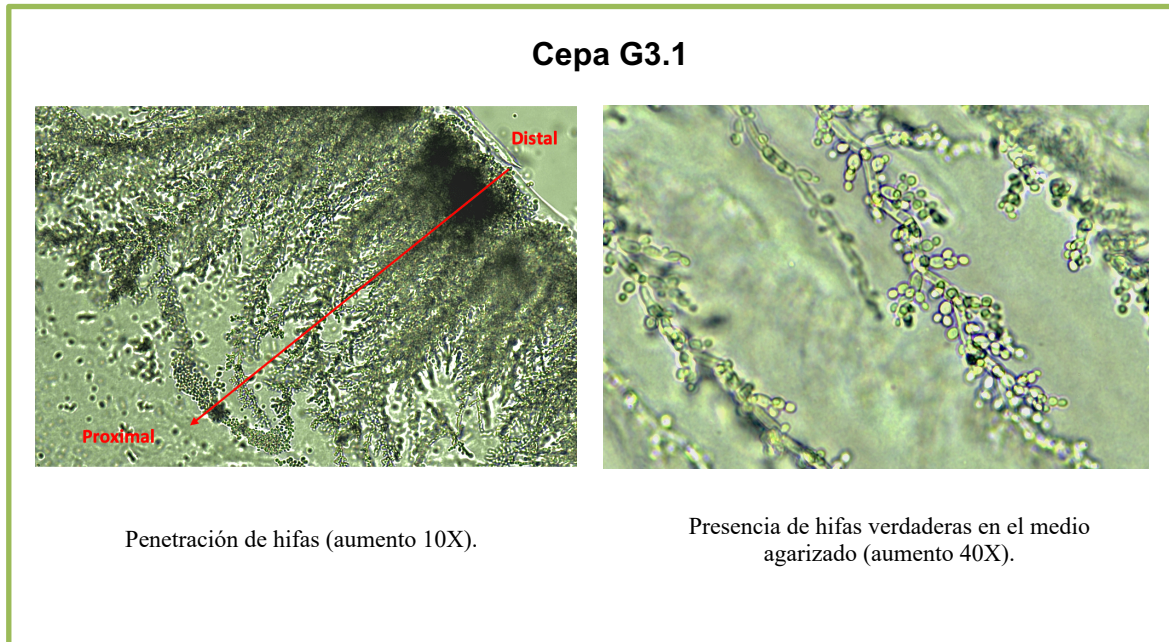


Figura 6. Actividad de penetración. Dimorfismo celular. *W. anomalus*.

Tabla 5. Resultados de la actividad de penetración. *W. anomalus*.

| Cepas | Actividad de penetración | Hifas verdaderas |
|-------------|--------------------------|------------------|
| F2.2 | Si | Presencia |
| F4.1 | Si | Presencia |
| G2.1 | Si | Presencia |
| G3.1 | Si | Presencia |
| G6.1 | Si | Presencia |
| G7.2 | Si | Presencia |
| G8.1 | Si | Presencia |
| G9.1 | Si | Presencia |

III.3.- Concentración mínima Inhibitoria de compuestos antifúngicos sistémicos frente a *W. anomalus*.

Las pruebas de sensibilidad realizadas en el equipo VITEK®2 nos permitieron cuantificar la concentración mínima inhibitoria de distintos antifúngicos de uso sistémico (triazoles, equinocandinas y polienos) al evaluarlos frente a las distintas cepas de *W. anomalus* de origen animal. En el caso del voriconazol, para todas las cepas la CMI fue inferior a 0,12 µg/ml; con respecto al fluconazol la mayoría de las cepas fueron inhibidas por encima de 2 µg/ml, con la excepción de dos cepas, una de las cuales requirió el doble de esta concentración para ser inhibida. La CMI para la caspofungina fue de 0,12 µg/ml frente a seis aislados (F4.1; G2.1; G3.1; G6.2; G7.2; y G9.1), mientras que para las dos restantes (F2.2 y G8.1) la CMI fue de 0,25 µg/ml. La micafungina y anfotericina B fueron efectivas con todas las cepas al igual que los otros antifúngicos con CMIs de 0,06 µg/ml y 0,25 µg/ml, respectivamente. Todos los valores obtenidos en este ensayo son inferiores a los puntos de corte de la resistencia reportados por el CLSI (47) para una cepa de referencia de *Candida albicans*. (Tabla 6).

Tabla 6. CMI de antifúngicos sistémicos frente a *W. anomalus*.

| Cepas | F2.2 | F4.1 | G2.1 | G3.1 | G6.2 | G7.2 | G8.1 | G9.1 | Puntos de corte CMI en µg/ml – CLSI para <i>C. albicans</i> | |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|-----|
| | | | | | | | | | S | R |
| Antifúngicos en µg/ml | | | | | | | | | | |
| Voriconazol | <0,12 | <0,12 | <0,12 | <0,12 | <0,12 | <0,12 | <0,12 | <0,12 | ≤ 0,12 | ≥ 1 |
| Fluconazol | 2 | 2 | 2 | < 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | ≤ 2 | ≥ 8 |
| Caspofungina | 0,25 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,25 | 0,12 | ≤ 0,25 | ≥ 1 |
| Micafungina | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | ≤ 0,25 | ≥ 1 |
| Anfotericina B | <0,25 | <0,25 | <0,25 | <0,25 | <0,25 | <0,25 | <0,25 | <0,25 | 2 | |

III.3.- Análisis filogenético.

III.3.1.- Análisis de secuencias nucleotídicas.

Con el fin de comprobar, mediante comparación de secuencias nucleotídicas de marcadores moleculares específicos, la identificación de las cepas incluidas en este estudio, empleamos el programa Blast-N (48). El análisis de similitud lo llevamos a efecto con una secuencia nucleotídica correspondiente a la región ITS. Los resultados obtenidos confirman que las ocho secuencias amplificadas y secuenciadas a partir del genoma las cepas incluidas en el estudio tienen un porcentaje de similitud igual o mayor al 90 %, al compararlas con la de una cepa de referencia de *W. anomalus*. Los resultados detallados se encuentran en la Tabla 7.

Tabla 7. BLAST. Región ITS. *W. anomalus*

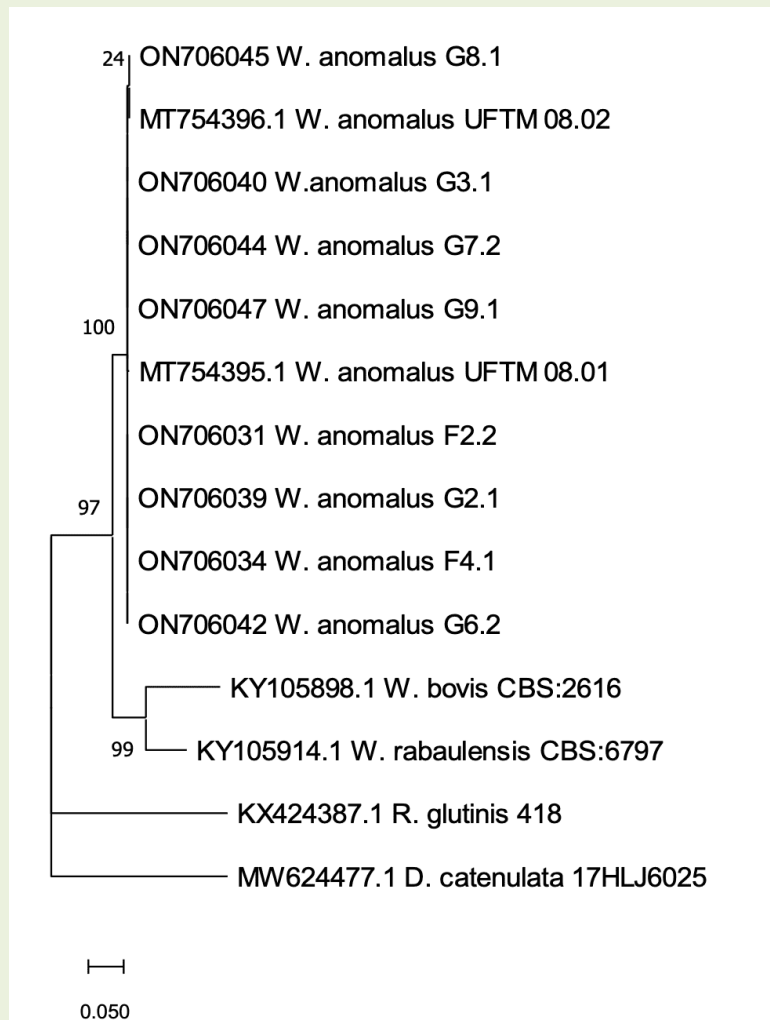
| Aislados | Número de acceso al GenBank | Especie filogenética más cercana | % de identidad | % de Cobertura | Longitud - Secuencias |
|----------|-----------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|-----------------------|
| F2.2 | ON706031 | <i>W. anomalus</i> 5759 | 98,88 % | 98,88 % | 573 |
| F4.1 | ON706034 | <i>W. anomalus</i> 5759 | 99,26 % | 90 % | 573 |
| G2.1 | ON706039 | <i>W. anomalus</i> 5759 | 99,44 % | 90 % | 573 |
| G3.1 | ON706040 | <i>W. anomalus</i> 5759 | 99,53 % | 100 % | 573 |
| G6.2 | ON706042 | <i>W. anomalus</i> 5759 | 99,26 % | 92 % | 573 |
| G7.2 | ON706044 | <i>W. anomalus</i> 5759 | 99,29 % | 100 % | 573 |
| G8.1 | ON706045 | <i>W. anomalus</i> 5759 | 99,29 % | 100 % | 573 |
| G9.1 | ON706047 | <i>W. anomalus</i> 5759 | 99,30 % | 100 % | 573 |

III.3.2- Relaciones evolutivas de *W. anomalus*.

En la Figura 7 observamos las relaciones filogenéticas que mantienen las cepas de *W. anomalus* incluidas en este estudio con otras cepas de la misma especie y con especies diferentes de levaduras. Como se puede ver, todas forman parte de un mismo clado y, por lo tanto, parecieran descender de un ancestro común. Esto sugiere que evolutivamente están muy relacionados.

.

Árbol filogenético



El árbol filogenético se construyó utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo (45) de 3 parámetros de Tamura. Mostramos el árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-2325,36). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestran junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo de parámetros Tamura 3 y luego seleccionando la topología con un valor logarítmico de verosimilitud superior. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 14 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 807 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 (46).

Figura 7. Relaciones evolutivas de cepas de *W. anomalus* con otras cepas y especies diferentes

III.4.- Discusión.

Como planteamos en la parte introductoria de este trabajo de investigación, el propósito fundamental del mismo era profundizar en los caracteres fenotípicos y moleculares de cepas de *W. anomalous* aisladas a partir de mucosa nasal de cuyes criados en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador). Destacaba en nuestro interés el deseo de evaluar la expresión de factores de virulencia por parte de las distintas cepas incluidas en el estudio. Como hemos visto, algunas de las cepas evaluadas expresan, efectivamente, algunos factores de virulencia que las convierten en posibles patógenos oportunistas para los seres humanos. Entre estos factores, destaca la producción de hemolisinas y la capacidad de penetrar activamente sustratos semi-sólidos, mediante la formación de hifas de longitud variable, capaces de alcanzar distancias considerables a partir del punto de inoculación.

Para clasificar a *W. anomalous* según su modo de vida, primero establecimos cuál es el rango de temperatura óptima de crecimiento de las distintas cepas incluidas en el estudio. Los datos que obtuvimos indican que las mismas pueden desarrollarse a temperaturas mayores a 23°C y menores a 37°C, lo cual nos permite clasificarlas como mesófilas. Ma et al (11) señalan en su estudio que cepas de *W. anomalous* aisladas a partir de tejido porcino pueden crecer en un rango de 20°C a 32°C, característica que la atribuyen a su gran capacidad de supervivencia. Se ha observado que esta peculiaridad adaptativa está presente en organismos patógenos.

Por otro lado, la mayoría de las cepas evaluadas también han demostrado capacidad para lisar eritrocitos. Se ha observado que este factor de virulencia también está presente en otras especies de hongos patógenos oportunistas que pertenecen al *phylum Ascomycota*. Por ejemplo, Singh et al (35) aislaron cepas de *Candida albicans* de muestras de orina de perros y gatos (animales de compañía) y evaluaron la actividad hemolítica de esta especie con riesgo zoonótico. Sus resultados indican que todos los aislados son capaces de producir hemolisinas.

En el presente caso, las cepas produjeron halos característicos de una enzima beta hemolítica. Estas enzimas se distinguen por formar poros en la superficie del eritrocito y lisarlo. La formación de estos dependerá de la conformación y despliegue molecular de la enzima. Es un mecanismo muy utilizado por levaduras oportunistas para obtener el hierro que requieren a partir de los glóbulos rojos, un factor de crecimiento importante durante la infección. *Candida spp* emplea este mecanismo junto con la captación de hierro para desarrollar hifas durante una candidiasis diseminada (36).

En relación con el crecimiento filamentoso observado en medio agarizado, los resultados de nuestro trabajo evidencian un dimorfismo evidente en las cepas de *W. anomalus* de origen animal, pues todas los aislados evaluados desarrollaron verdaderas hifas, de decenas de células de longitud, que penetraron e invadieron el medio semi-sólido. Presumiblemente este fenómeno se da por la activación de un “switching” fenotípico que puede ser modulado por el entorno y que está presente en otras especies como *C. albicans*.

El dimorfismo es una respuesta morfogenética de muchas especies de hongos, incluyendo aquellas que son patógenas. En el caso de *C. albicans* y la relación que existe entre el dimorfismo y su capacidad de penetrar tejidos, se debe a la necesidad que tiene esta levadura por la búsqueda de nutrientes (estrés nutricional) y colonización del tejido epitelial del huésped para así lograr la supervivencia (38).

El dimorfismo que posee *C. albicans* observado en tejidos vivos, desencadena una mayor expresión de otros factores de virulencia (39) como: la producción de adhesinas (proteínas que promueven la formación de biopelículas), enzimas con función protectora del ataque oxidativo del sistema inmunitario del huésped (SOD5) (38) y producción de candidalislina (proteína citolítica descubierta en *C. albicans* que tiene la capacidad de dañar las membranas celulares del huésped) (39).

Calle et al. (40) sugieren que el dimorfismo en *C. albicans* se encuentra regularizado por factores tanto ambientales como genéticos. En el primer caso está la concentración de nutrientes en el entorno (el nivel de glucosa determina la formación o no de hifas-estrés nutricional), la presencia de suero a 37 °C, el pH de 7 y la concentración de CO₂ a 5,5%. En el segundo caso se tiene al sistema “*Quorum sensing*” (mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de la población celular) con la expresión de los genes SAP 4, 5 y 6; HWP1; ALS3 y ALS, específicos para la formación de hifas.

En las levaduras patógenas el dimorfismo es esencial para la unión del patógeno a las células del hospedador. Este fenómeno está regulado y conservado evolutivamente por una vía de proteína quinasa activada por el mitógeno MAPK (Mitogen-activated protein kinase en inglés) (41), que a su vez está compuesto generalmente por tres quinasas activadas secuencialmente. Intervienen en una serie de vías de transducción de señales vitalmente importantes que regulan la proliferación, diferenciación y muerte celular (42).

Chow et al. (37) también explican que el crecimiento filamentosos fúngico puede deberse a una respuesta morfogénica que es crítica para la virulencia de algunas levaduras y que puede estar regularizados por distintos aspectos. En su investigación realizaron ensayos de crecimiento filamentosos con dos especies de levaduras, la primera *Saccharomyces cerevisiae* y la segunda *C. albicans*, mismas que fueron estudiadas de forma separadas. Los resultados que obtuvieron sugieren que uno de los aspectos para crecimiento filamentosos se da en respuesta a un comportamiento colectivo de todas las células para invadir los tejidos.

El experimento de Chow et al (37) fue realizado con grupos de células o agregados de las especies mencionadas a las cuales se las estimularon para que produzcan una invasión al medio (invasión agregada). En ambos casos se observaron que este fenómeno se produce por vías de señalización convencionales que regularizan el crecimiento filamentosos (fMAPK, RAS, RIM101, RTG, SNF1 y SAGA).

Con respecto a las pruebas de sensibilidad frente a compuestos antifúngicos que realizamos en nuestro estudio indican ciertas peculiaridades. En general, no existen puntos de corte para sensibilidad ni resistencia en el caso de *W. anomalus* en los manuales de EUCAST o CLSI. Los resultados que hemos obtenido con respecto a este ensayo muestran que, cuando tomamos como referencia los valores que están reportados por el CLSI (47) para una cepa de referencia de *Candida albicans* como punto de comparación, no detectamos ninguna cepa de *W. anomalus* de origen animal -*Cavia porcellus*- resistente a ningún antifúngico (voriconazol, fluconazol, caspofungina, micafungina y anfotericina B).

Con respecto al fluconazol, siete de las ocho cepas son claramente sensibles y una cepa presenta un valor intermedio entre lo que se considera sensible y resistente. Nuestros resultados (Tabla 6) fueron similares a los que ya han sido reportados previamente por Jung et al (43) (Tabla 8) y Pandey et al (44) (Tabla 9) quienes trabajaron con cepas de *W. anomalous* aisladas a partir de tejido humano.

Tabla 8. Resultados de Jung J Et Concentraciones vs # de cepas

| 30 cepas de <i>W. anomalous</i> de origen de tejido humano | | | | | | | Puntos de corte CMI en µg/ml – CLSI para <i>C. albicans</i> | |
|--|-------------------------------|--------|------|-----|-----|----|---|-----|
| | # de aislados con CMI (µg/ml) | | | | | | S | R |
| | ≤ 0,06 | ≤ 0,12 | ≤ 25 | 0,5 | ≤ 1 | 2 | | |
| Antifúngicos | | | | | | | | |
| Voriconazol | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | ≤ 0,12 | ≥ 1 |
| Fluconazol | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 28 | ≤ 2 | ≥ 8 |
| Caspofungina | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | ≤ 0.25 | ≥ 1 |
| Micafungina | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ≤ 0.25 | ≥ 1 |
| Anfotericina | 0 | 0 | 28 | 2 | 0 | 0 | 2 | |
| B | | | | | | | | |

Tabla 9. Resultados de Pandey N Et al. Concentraciones vs # de cepas

| 15 cepas de <i>W. anomalous</i> de origen de tejido humano | | | | | | | | | | | Puntos de corte CMI en µg/ml – CLSI para <i>C. albicans</i> | | |
|--|-------------------------------|------|------|-----|---|---|---|---|----|----|---|--------|-----|
| | # de aislados con CMI (µg/ml) | | | | | | | | | | S | R | |
| | ≤ 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | ≥ 64 | | |
| Antifúngicos | | | | | | | | | | | | | |
| Voriconazol | 1 | 2 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ≤ 0,12 | ≥ 1 |
| Fluconazol | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | ≤ 2 | ≥ 8 |
| Caspofungina | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ≤ 0.25 | ≥ 1 |
| Micafungina | | | | | | | | | | | | ≤ 0.25 | ≥ 1 |
| Anfotericina | 6 | 0 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| B | | | | | | | | | | | | | |

En cuanto a los resultados que se derivan del análisis del árbol filogenético en base a la utilización de softwares bioinformáticos Mega X y BLAST-N confirman que estamos en presencia de cepas que pertenecen a la especie *W. anomalus*. Adicionalmente, se destaca claramente que en el grupo de cepas incluidas en nuestro estudio y que forman parte de un mismo clado están presentes dos cepas - UFTM 08.01 y UFTM 08.02- de origen clínico cuya patogenicidad ha sido demostrada previamente (17).

Al igual que muchas investigaciones nuestro trabajo presenta algunas limitaciones, entre ellas podemos incluir las siguientes: El escaso número de cepas con las que trabajamos y el limitado número de ensayos experimentales de los factores de virulencia, los mismos que no fueron aplicados en modelos animales, sino que han sido empleados de forma *in vitro*. Sin embargo, no dejamos de resaltar la importancia de nuestro estudio, pues según la revisión exhaustiva de la literatura especializada, es la primera vez que se realiza una caracterización de tal nivel y profundidad con cepas de levaduras potencialmente patógenas aisladas a partir de mucosa nasal de *C. porcellus*.

También destacamos la combinación de las técnicas tradicionales y moleculares que empleamos. La generación de nuevo conocimiento que se produjo en esta investigación podría ser útil para impulsar avances en el campo del diagnóstico y tratamiento de enfermedades micóticas actuales y futuras. Hasta donde hemos podido investigar, muy pocos estudios en el Ecuador se relacionan con enfermedades zoonóticas que afectan a las personas que están en continuo contacto con animales colonizados con *W. anomalus*, por lo que nuestra investigación también pudiera tener un impacto positivo y significativo sobre la salud de la población en general.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

IV.1.- CONCLUSIONES.

- Las ocho cepas identificadas como *W. anomalus* obtenidas de muestras nasales de roedores presentan una morfología celular y características coloniales propias de los hongos levaduriformes. No existen variaciones en las cualidades morfológicas observables entre las cepas.
- Los ensayos de los factores de virulencia muestran que los aislados de *W. anomalus* con los que trabajamos no presentan actividad enzimática para fosfolipasas y proteasas. Sin embargo, tienen actividad enzimática hemolítica y capacidad para penetrar un medio de crecimiento sólido con la formación de hifas, presumiblemente por la activación de un *switching* fenotípico (dimorfismo).
- Los resultados obtenidos de los ensayos de susceptibilidad frente a antifúngicos de uso sistémico sugieren que las cepas de *W. anomalus* de origen animal son sensibles frente a estas sustancias.
- Las ocho cepas de *W. anomalus* incluidas en el estudio son filogenéticamente muy cercanas a otras cepas de la misma especie, de interés clínico.

Esta investigación expone algunas características morfológicas, bioquímicas y moleculares (capacidad de adaptación, factores de virulencia, relaciones evolutivas con especies emergentes) de *W. anomalus* que los consideramos importantes; por ello, calificamos a este microorganismo como un riesgo potencial para la salud de la población que está en contacto –frecuente u ocasional- con los animales que las portan, en especial para aquellos individuos con un sistema inmune debilitado o disminuido.

IV.2.- RECOMENDACIONES.

- Comunicar a las autoridades sanitarias los resultados que obtuvimos en esta investigación. A su vez, insistir sobre la importancia que tiene realizar estudios sobre los hongos con riesgo zoonótico y como pueden afectar a la población, en especial aquellos individuos con riesgo por exposición.

- Vigilancia constante a nivel epidemiológico que permita detectar cualquier infección humana causada por *W. anomalus* de origen zoonótico.

- Realizar estudios donde se involucren muestras humanas de pacientes con algún tipo de micosis adquirido por riesgo de exposición y relacionar con muestras de tejidos animales colonizados con *W. anomalus*.

- Publicar estos datos en revistas científicas indexadas y arbitradas.

IV.3.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Quindós G. Epidemiología de las micosis invasoras: un paisaje en continuo cambio. *Rev Iberoam Micol.* 2018; 171-178.
2. Britannica. The Encyclopedia Publishers. Encyclopedia Britannica "mycoses". May 2023. Accessed May 22, 2023. <https://www.britannica.com/science/mycosis>.
3. Maldonado IPA, Lira BMM. Prevalencia de micosis superficial en pacientes con lesiones sugestivas de dermatofitosis. *Minerva.* 2020; 15-22.
4. Centers for Disease Control and Prevention. The Publishers of CDC. Candida auris, fungal diseases. December 2022. Accessed May 4, 2023. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/index.html>
5. Woolhouse MEJ, Dye C, Taylor LH, et al. Risk factors for human disease emergence. *Phil Trans R. Soc.* 2021; 356:983–989.
6. Rahman MT, Sobur MA, Islam MS, et al. Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control. *Microorganisms.* 2020; 8-9.
7. Guerrero FF, Márquez RJA. Zoonosis transmitidas por animales de compañía. Una guía de consulta para veterinarios y médicos clínicos. *Veterinaria.* 2019; 475.
8. Centers for Disease Control and Prevention. The Publishers of CDC. Animales (zoonóticos). October 2016. Accessed May 4, 2023. <https://www.cdc.gov/parasites/es/animals.html>
9. Universidad Federal de Mato Grosso UFMT. Potencial Zoonótico da Microbiota Fúngica de Excretas de Aves Cativas do Zoológico da UFMT. 2013. Accessed May 4, 2023. <https://docplayer.com.br/210971443-Universidade-federal-de-mato-grosso-faculdade-de-medicina-programa-de-pos-graduacao-em-medicina-mestrado-em-ciencias-da-saude.html>

10. Cordeiro RDA, Bittencourt PV, Brilhante RSN, et al. Species of candida as a component of the nasal microbiota of healthy horses. *Med Mycol.* Oct 2013;51(7):731-6.
11. Ma Y, Sun Z, Zeng Y, et al. Isolation, identification and function of *Pichia anomala* AR2016 and Its effects on the growth and health of Weaned Pigs. *Animals.* Abril 2021;11(4):1179.
12. Britannica: "levadura". The Encyclopedia Publishers. Enciclopedia Británica. yeast. Definition & Uses. April 2023. Accessed May 4, 2023. <https://www.britannica.com/science/yeast-fungus>
13. Wijayawardene NN, Hyde KD, Lumbsch HT, et al. Outline of Ascomycota: 2017. *Fungal Diversity.* January 2018;88(1):167–263.
14. Ávalos AA, Rosique JE, Cappello S, et al. Ascomicetes (Fungi: Ascomycota) del Parque Estatal Agua Blanca, Macuspana, Tabasco, México. *Acta Bot Mex.* Enero 2018;(122):141–54.
15. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(1):33–9.
16. Cappelli A, Favia G, Ricci I. *Wickerhamomyces anomalus* in mosquitoes: A promising yeast-based tool for the "Symbiotic Control" of Mosquito-Borne diseases. *Front Microbiol.* 2021;11: 621605.
17. Dutra VR, Silva LF, Oliveira ANM, et al. Fatal case of fungemia by *Wickerhamomyces anomalus* in a pediatric patient diagnosed in a teaching hospital from Brazil. *Jour Fungi.* 2020; 6(3):147.
18. Zhang L, Xiao M, Arastehfar A, et al. Investigation of the emerging nosocomial *Wickerhamomyces anomalus* infections at a chinese tertiary teaching hospital and a systemic review: Clinical manifestations, risk factors, treatment, outcomes, and anti-fungal Susceptibility. *Frontiers in Microbiology.* 2021;12.
19. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database.* 2020; baaa062.

20. Satora P, Tarko T, Sroka P, et al. The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeas Rese.* 2014; 729–40.
21. Kurtzman CP. *Wickerhamomyces* Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). *The Yeasts: A taxonomic Study.* 2011; 899–917.
22. Pérez-Través L, de Llanos R, Flockhart A, et al. Virulence related traits in yeast species associated with food; *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Wickerhamomyces anomalus*. *Food Control.* 2021;124:107901.
23. Tao N, Gao Y, Liu Y. Isolation and characterization of a *Pichia anomala* strain: a promising candidate for bioethanol production. *Braz J.* 2011;42(2):668–75.
24. Fernández-Ruiz M, Guinea J, Puig-Asensio M, et al. Fungemia due to rare opportunistic yeasts: data from a population-based surveillance in Spain. *Medical Mycology.* 2017; 55(2):125–36.
25. Fu Z, Sun B, Li X, et al. Isolation and characterization of a high ethyl acetate-producing yeast from Laobaigan Daqu and its fermentation conditions for producing high-quality Baijiu. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2018;32(5):1218-27.
26. Willaert RG, Kayacan Y, Devreese B. The Flo adhesin family. *Pathogens.* 2021; 10(11):1397.
27. Gardini F, Tofalo R, Belletti N, et al. Characterization of yeasts involved in the ripening of pecorino crotonese cheese. *Food Microbiology.* 2006;23(7):641–8.
28. Merchán AV, Ruiz-Moyano S, Hernández MV, et al. Characterization of autochthonal yeasts isolated from spanish soft raw ewe milk protected designation of origin cheeses for technological application. *Journal of Dairy Science.* 2022;105(4):2931–47.
29. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, et al. Fungal identification using molecular tools: A Primer for the natural products research community. *J Nat Prod.* 2017;80(3):756–70.

30. Herreras Gómez LR, López VC, Herreras Gómez LR, et al. Perfil de resistencia antifúngica en el tratamiento de candidiasis vaginal: Un diagnóstico de agentes etiológicos. *Rev Haba de Cienc Méd.* 2022;21(2).
31. Asociación Española de Pediatría. Their publishers. Caspofungina. October 2020. Accessed May 4, 2023. <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/caspofungina>
32. BIOMÉRIEUX, How does VITEK® 2 generate MIC values? Their publishers. October 2017. Accessed May 4, 2023. <https://www.biomerieux-microbio.com/how-does-vitek-2-generate-mic-values/>
33. Alexander BD, Procop GW, Dufresne P. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. M60 CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2020. Publication volume 40, número 8.
34. Buela L, Cuenca M, Sarmiento J, et al. Role of guinea pigs (*Cavia porcellus*) raised as livestock in ecuadorian Andes as reservoirs of zoonotic yeasts. *Animals.* 2022;12(24):3449.
35. Singh A, Debnath C, Batabyal K, et al. Antifungal susceptibility and hemolytic activity of *Candida albicans* isolated from urine of dog and cat sharing common household. *Jou Of Ent and Zoo Stu.* 2020;8:1605–7.
36. Nayak AP, Green BJ, Beezhold DH. Fungal hemolysins. *Medical Mycology.* 2013;51(1):1–16.
37. Chow J, Dionne HM, Prabhakar A, et al. Aggregate Filamentous Growth Responses in Yeast. *mSphere.* 2019;4(2):e00702-18.
38. Gleason JE, Galaleldeen A, Peterson RL, et al. *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(16):5866–71.
39. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature.* 2016;532(7597):64–8.

40. Calle-Rodríguez NDL, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. CES Medicina. 2012;26(1):43–55.
41. Cullen PJ, Sprague GF Jr. The regulation of filamentous growth in yeast. Genetics. 2012;190(1):23–49.
42. Morrison DK. MAP Kinase Pathways. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(11):a011254.
43. Jung J, Moon YS, Yoo JA, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of fungemia caused by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a Korean tertiary care center. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2018;51(6):794–801.
44. Pandey N, Gupta MK, Paul P, et al. Necessity to identify candida species accurately with minimum inhibitory concentration determination in each case of bloodstream infections. Journal of Infection and Public Health. 2020;13(5):753–8.
45. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. Molecular Biology and Evolution. 1992; 9:678-687.
46. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
47. Gary W, Philippe J, Elizabeth B, et al. CDC epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. M57S-Ed4 No 18. Centers for Disease Control and Prevention, 2022. Ed4; 1-18.
48. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215:403-410. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

GLOSARIO

- AN: Agar nutritivo.
- ASD: Agar Sabouraud Dextrosa.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.
- ITS: Internal Transcribed Spacer.
- MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis.
- PDA: Agar Papa Dextrosa.
- UFC/ml: Unidad Formadora de Colonias por mililitro.
- $\mu\text{g/ml}$: Microgramos por mililitros.

ANEXOS

Anexo 1. Aval proyecto de investigación.



JEFATURA DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

Oficio Nro.: UCACUE-JIEI-2021-298-OF
Cuenca, 27 de septiembre de 2021

Asunto: Aval Proyecto de Investigación.

Doctor
Luis Andrés Yarzabal Rodríguez, PhD.
DIRECTOR DE PROYECTO.
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA.
Presente. -

De mi consideración:

Reciba un atento y cordial saludo, mediante la presente le comunico a usted y al equipo de integrantes de la propuesta "DIVERSIDAD DE CEPAS DEL GÉNERO CANDIDA QUE COLONIZAN MUCOSAS Y TEJIDOS DE ANIMALES DE GRANJA EN LA PROVINCIA DE CAÑAR (ECUADOR, 2021): RESISTENCIA A COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS Y FACTORES DE VIRULENCIA." correspondiente a la "Convocatoria CIITT 2019-2020"; que luego de finalizar el proceso de evaluación por parte de pares académicos, y con el Aval de la Jefatura de Investigación e Innovación, su propuesta ha sido APROBADA.

Con el antecedente expuesto es importante indicarle que para dar cumplimiento a las correcciones en el citado proyecto que los pares revisores le han sugerido, se le concede un término de 5 días para que proceda a realizar los cambios y rectificaciones en la plataforma de proyectos. Se adjunta la evaluación y comentarios realizada por los evaluadores.

Por su atención, me despido felicitándola a usted y a su equipo de colaboradores.

Atentamente,

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO
"AÑO JUBILAR, QUINGUAGÉSIMO ANIVERSARIO FUNDACIONAL"



Ing. Javier Cabrera Mejía. PhD.
JEFE DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

| | | |
|---------------|---------------------------------|--|
| Elaborado por | Ing. María Belén Carpio. | |
| Revisado por | Ing. Geovanna Velecela, PhD. | |
| Aprobado por | Ing. Javier Cabrera Mejía, PhD. | |

www.ucacue.edu.ec

Cuenca: Av. de las Américas y Tarqui ☎ Telf: 2830751, 2824365, 2826563 Azogues: Campus Universitario "Luis Cordero El Grande", (Frente al Terminal Terrestre).
☎ Telf: 593 (7) 2241 - 613, 2243-444, 2245-205, 2241-587 Cañar: Calle Antonio Ávila Clavijo ☎ Telf: 072235268, 072235870 San Pablo de la Troncal: Cda. Universitaria
km.72 Quinceava Este y Primera Sur ☎ Telf: 2424110 Macas: Av. Cap. José Villanueva s/n ☎ Telf: 2700393, 2700392

Anexo 2. Composición de medios de cultivo.

– **Fórmula de medio PDA en gramos por litro**

Agar 15g, extracto de papa 4g y dextrosa 20g

– **Fórmula de medio ASD en gramos por litro**

Agar 15g, dextrosa 40g, digerido pancreático de caseína 5g y digerido péptico de tejido animal 5g.

– **Fórmula de medio HiChrome Cándida en gramos por litro**

Agar 23,6g, peptona 4g, mezcla cromogénica 13,6g, el pH final a 25 °C 6.0±0.2.

– **Fórmula de medio ASD suplementado con sangre desfibrinada en gramos por litro**

13g de sabouraud dextrosa, 11,7g de cloruro de sodio, 0,11g de cloruro de calcio y sangre ovina desfibrinada.










– **Fórmula de medio ASD suplementado con yema de huevo en gramos por litro**

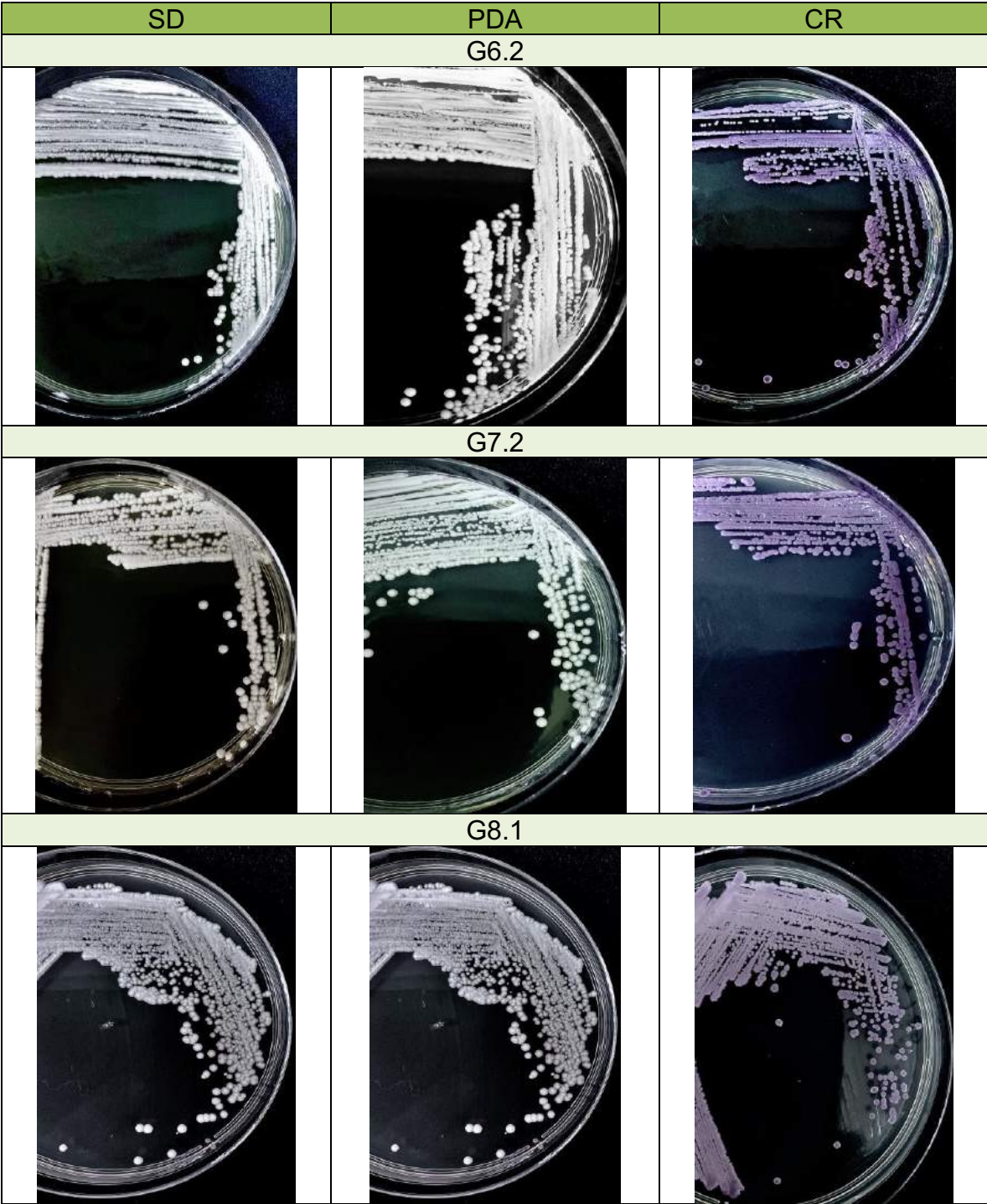
13g de sabouraud dextrosa y 3ml de yema de huevo.

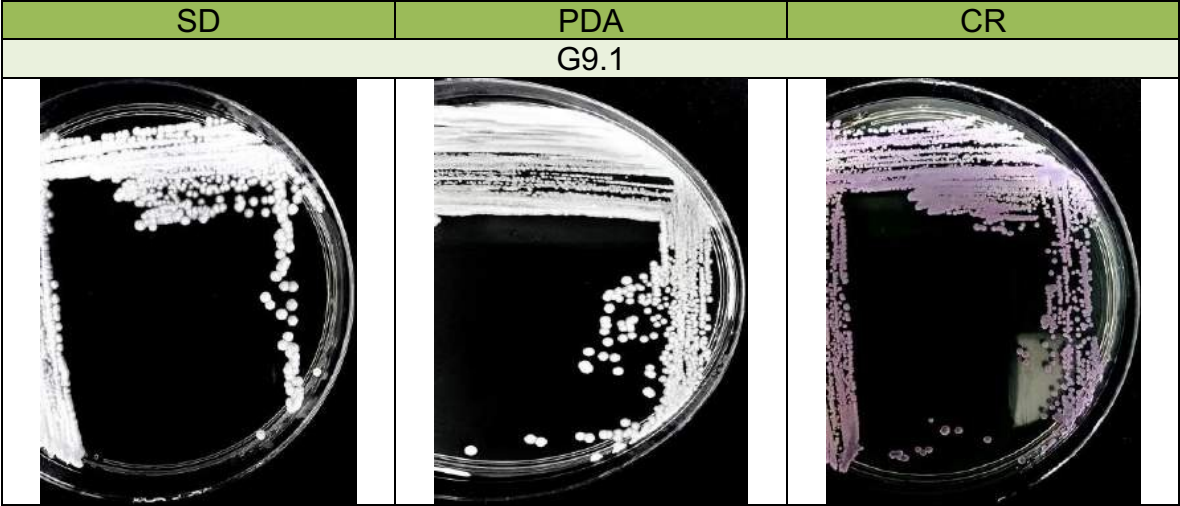
– **Fórmula de medio ASD suplementado con caseína en gramos por litro**

13g de sabouraud dextrosa y leche liofilizada pasteurizada

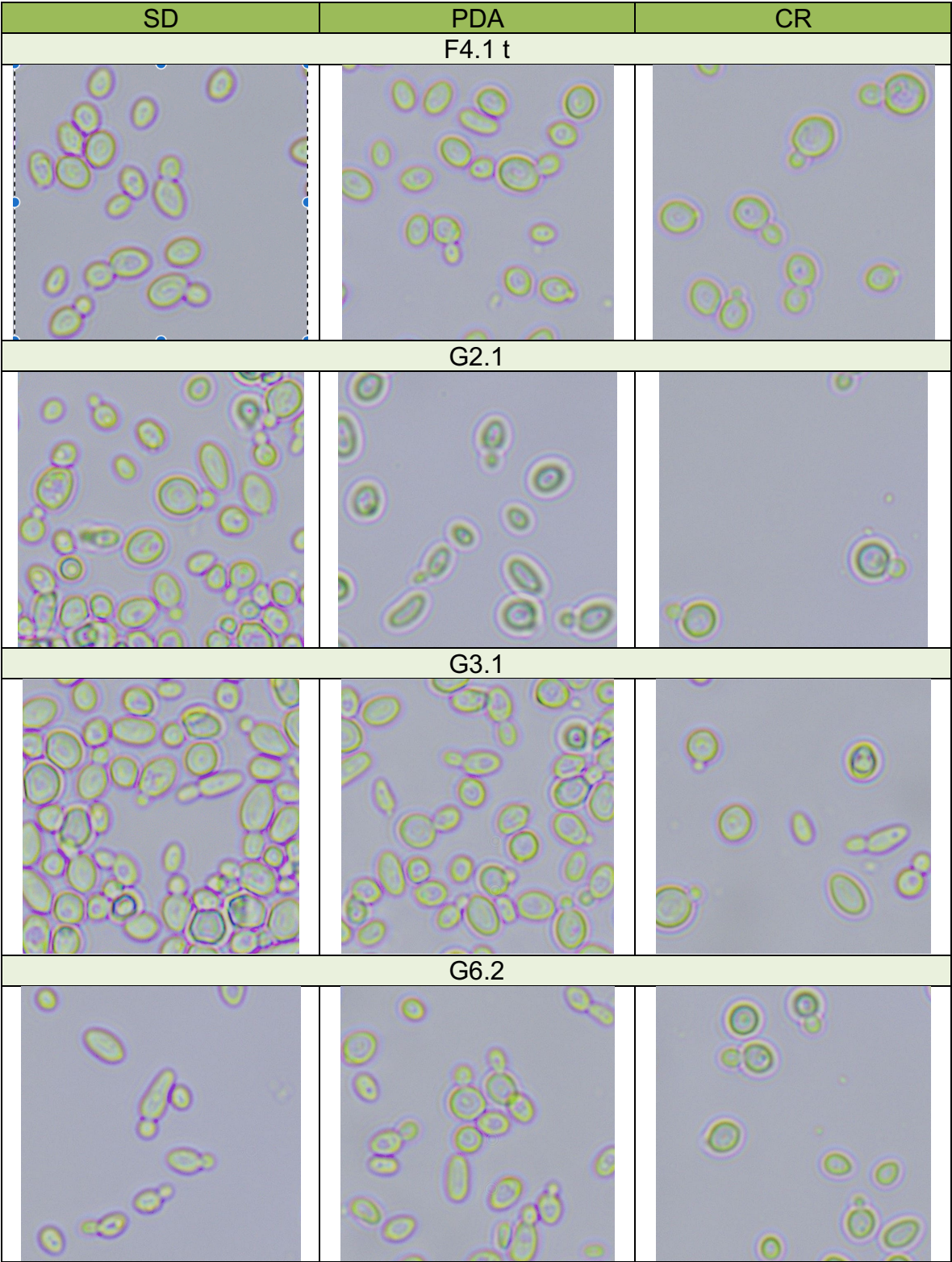
Anexo 3. Caracterización morfológica de las colonias en tres medios de cultivo.

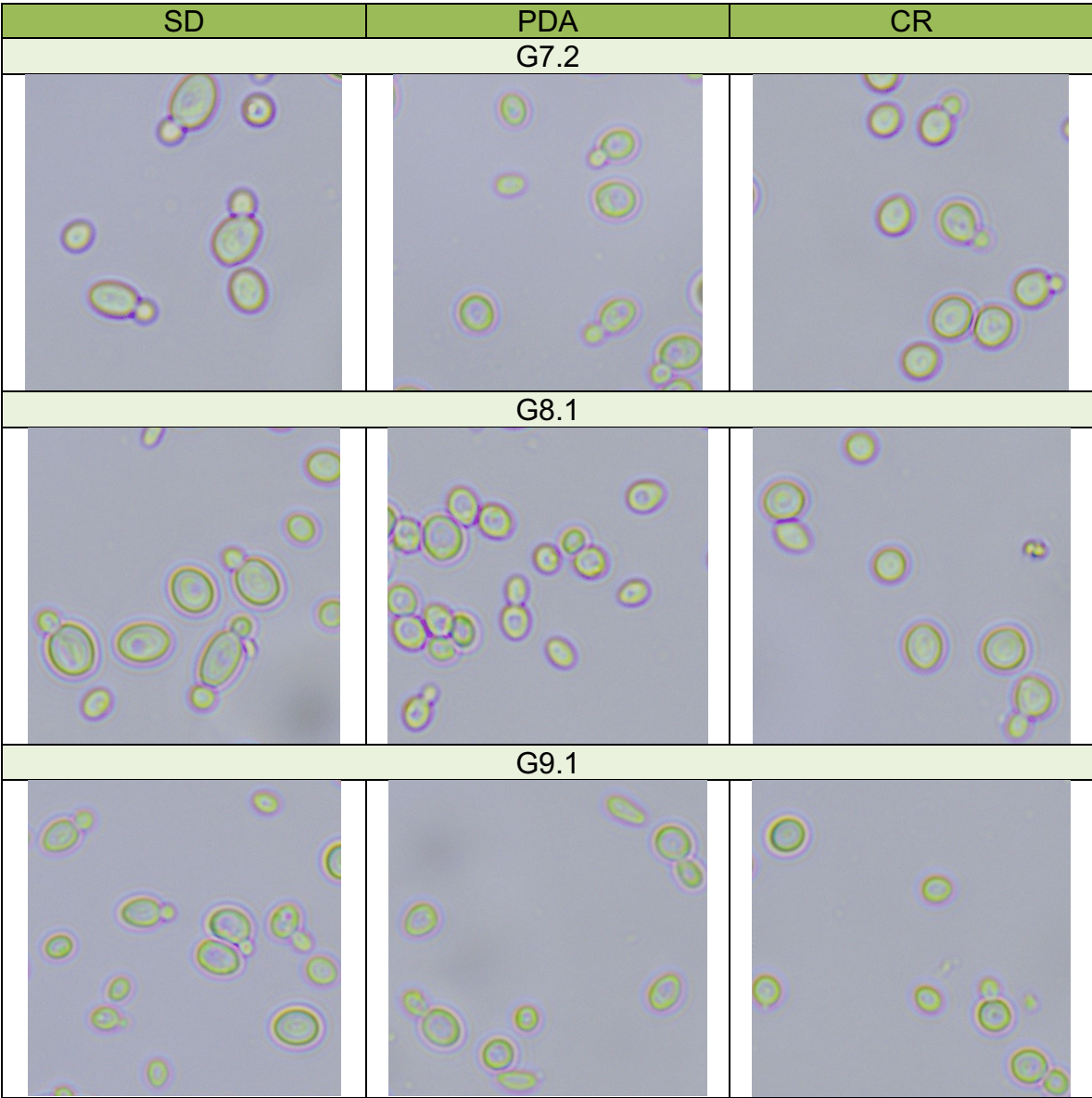
| SD | PDA | CR |
|---|---|---|
| F4.1 | | |
|  |  |  |
| G2.1 | | |
|  |  |  |
| G3.1 | | |
|  |  |  |





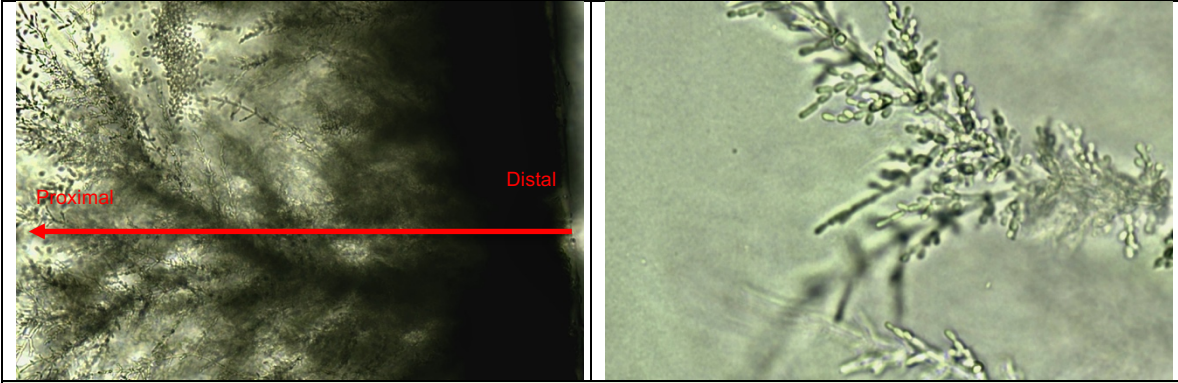
Anexo 4. Aspecto de las células levaduriformes bajo el microscopio (aumento de 100X).



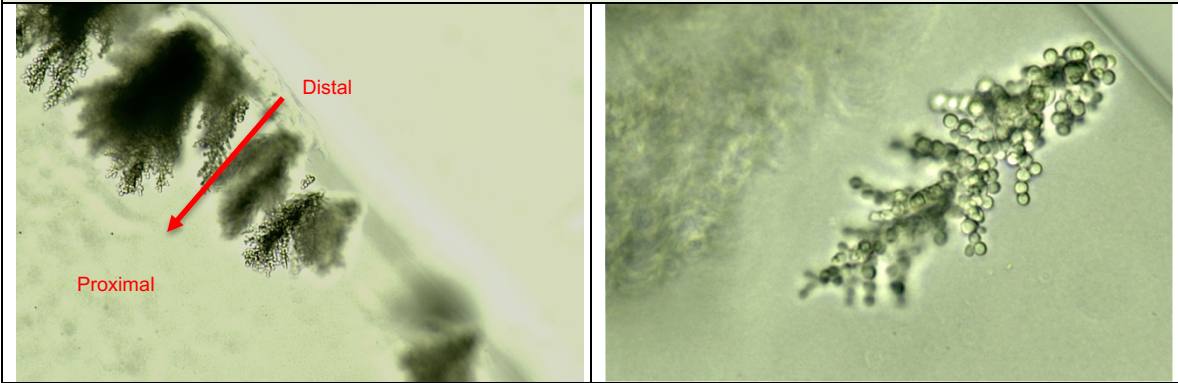


Anexo 5. Actividad de penetración (aumento 10X y 40X).

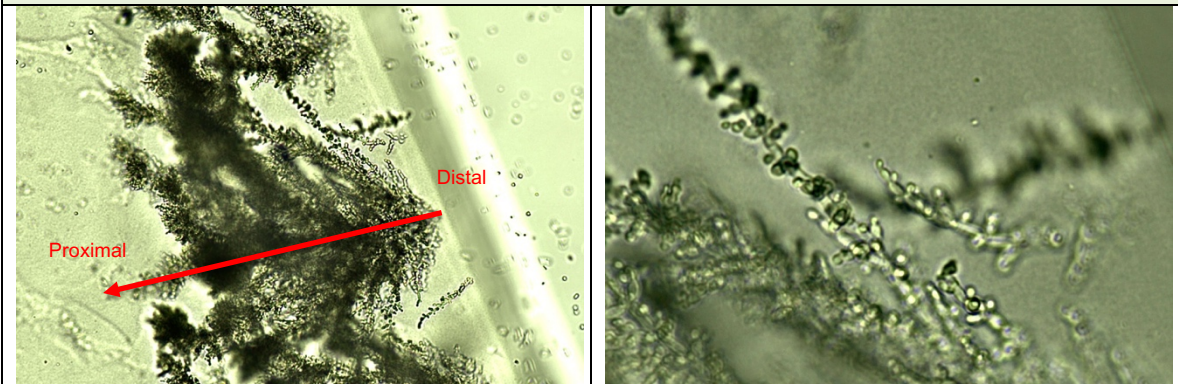
| Aumento 10X | Aumento 40X |
|-------------|-------------|
| F2.2 | |
| | |
| F4.1 | |
| | |
| G2.1 | |
| | |
| G6.1 | |



G7.2



G8.1



G9.1



Anexo 6. Resultados de los ensayos de susceptibilidad frente a antifúngicos.



HOSPITAL DEL RIO HOSPIRIO SA

AVE. 24 DE MAYO Y LAS AMÉRICAS

RESULTADOS DE EXAMENES

Fecha: 30-DIC-2022 15:13:23

Página 1 de 1

EXAMEN: 1058750

HISTORIA CLINICA: 160784

Cédula: 0190032981001

| Apellido Paterno | Apellido Materno | Primer Nombre | Segundo Nombre |
|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| UNIVERSIDAD | CATOLICA DE CUENCA | FACULTAD | DE BIOQUIMICA Y FARM |

MICROBIOLOGIA

Edad : años Fecha Solicitud : 16-DIC-2022 Fecha Resultados :30-DIC-2022 00:00 No. CAMA :

Sexo : Masculino

Dep. Solicitante

Médico Solicitante MEDICO EXTERNO

Datos Clínicos: CEPA F2.2

CULTIVOS

OTROS CULTIVOS (CULTIVO)

Concentración mínima inhibitoria.

Voriconazol: < 0.12 ug/ml

Fluconazol: 2 ug/ml

Caspofungina: 0.25 ug/ml

Micafungina: 0.06 ug/ml

Anfotericina B: <0.25 ug/ml

NOTA:

Método empleado: equipo VITEK 2 compact y Cromo Candida.

Identificación confirmada por espectrometría de masas y sensibilidad por microdilución con sensi Quatro.

No existen puntos de corte para la sensibilidad en el EUCAST ni CLSI.

| Germen | Unidad | Unidades Formadoras |
|--------------------|--------|---------------------|
| CANDIDA PELICULOSA | | |

SENSIBLE

VALIDADO POR

Lcda. Solmayra Ágreda O.
Esp. Microbiología Médica.
No Senescyt: 17013098

TCNLG.MED. AGREDA ORELLANA IVANNA SOLMAYRA

RESULTADOS DE EXAMENES

Fecha: 30-DIC-2022 15:09:03

Página 1 de 1

EXAMEN: 1058747**HISTORIA CLINICA: 160784****Cédula: 0190032981001**

| Apellido Paterno | Apellido Materno | Primer Nombre | Segundo Nombre |
|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| UNIVERSIDAD | CATOLICA DE CUENCA | FACULTAD | DE BIOQUIMICA Y FARM |

MICROBIOLOGIA**Edad :** años **Fecha Solicitud :** 16-DIC-2022 **Fecha Resultados :** 30-DIC-2022 00:00 **No. CAMA :****Sexo :** Masculino**Dep. Solicitante****Médico Solicitante** MEDICO EXTERNO**Datos Clínicos:** CEPA F4.1**CULTIVOS****OTROS CULTIVOS (CULTIVO)**

Concentración mínima inhibitoria.

Voriconazol: < 0.12 ug/ml

Fluconazol: 2 ug/ml

Caspofungina: 0.12 ug/ml

Micafungina: 0.06 ug/ml

Anfotericina B: <0.25 ug/ml

NOTA:

Método empleado: equipo VITEK 2 compact y Cromo Candida.

Identificación confirmada por espectometría de masas y sensibilidad por microdilución con sensi Quatro.

No existen puntos de corte para la sensibilidad en el EUCAST ni CLSI.

| Germen | Unidad | Unidades Formadoras |
|--------------------|--------|---------------------|
| CANDIDA PELICULOSA | | |

SENSIBLE**VALIDADO POR**Lcda. Solmayra Ágreda O.
Esp. Microbiología Médica.
No Senescyt: 17013098

TCNLG.MED. AGREDA ORELLANA IVANNA SOLMAYRA

RESULTADOS DE EXAMENES

Fecha: 30-DIC-2022 15:10:36

Página 1 de 1

EXAMEN: 1058749**HISTORIA CLINICA: 160784****Cédula: 0190032981001**

| Apellido Paterno | Apellido Materno | Primer Nombre | Segundo Nombre |
|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| UNIVERSIDAD | CATOLICA DE CUENCA | FACULTAD | DE BIOQUIMICA Y FARM |

MICROBIOLOGIA

Edad : años Fecha Solicitud : 16-DIC-2022 Fecha Resultados :30-DIC-2022 00:00 No. CAMA :

Sexo : Masculino

Dep. Solicitante

Médico Solicitante MEDICO EXTERNO

Datos Clínicos: CEPA G2.1

CULTIVOS**OTROS CULTIVOS (CULTIVO)**

Concentración mínima inhibitoria.

Voriconazol: < 0.12 ug/ml

Fluconazol: 2 ug/ml

Caspofungina: 0.12 ug/ml

Micafungina: 0.06 ug/ml

Anfotericina B: <0.25 ug/ml

NOTA:

Método empleado: equipo VITEK 2 compact y Cromo Candida.

Identificación confirmada por espectometría de masas y sensibilidad por microdilución con sensi Quatro.

No existen puntos de corte para la sensibilidad en el EUCAST ni CLSI.

| Germen | Unidad | Unidades Formadoras |
|--------------------|--------|---------------------|
| CANDIDA PELICULOSA | | |

SENSIBLE**VALIDADO POR**Lcda. Solmayra Ágreda O.
Esp. Microbiología Médica.
No Senescyt: 17013098

TCNLG.MED. AGREDA ORELLANA IVANNA SOLMAYRA

RESULTADOS DE EXAMENES

Fecha: 30-DIC-2022 15:06:52

Página 1 de 1

EXAMEN: 1058744**HISTORIA CLINICA: 160784****Cédula: 0190032981001**

| Apellido Paterno | Apellido Materno | Primer Nombre | Segundo Nombre |
|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| UNIVERSIDAD | CATOLICA DE CUENCA | FACULTAD | DE BIOQUIMICA Y FARM |

MICROBIOLOGIA

Edad : años Fecha Solicitud : 16-DIC-2022 Fecha Resultados :30-DIC-2022 00:00 No. CAMA :

Sexo : Masculino

Dep. Solicitante

Médico Solicitante MEDICO EXTERNO

Datos Clínicos: CEPA G3.1

CULTIVOS**OTROS CULTIVOS (CULTIVO)**

Concentración mínima inhibitoria.

Voriconazol: < 0.12 ug/ml

Fluconazol: < 2 ug/ml

Caspofungina: 0.12 ug/ml

Micafungina: 0.06 ug/ml

Anfotericina B: <0.25 ug/ml

NOTA:

Método empleado: equipo VITEK 2 compact y Cromo Candida.

Identificación confirmada por espectometría de masas y sensibilidad por microdilución con sensi Quatro.

No existen puntos de corte para la sensibilidad en el EUCAST ni CLSI.

| Germen | Unidad | Unidades Formadoras |
|--------------------|--------|---------------------|
| CANDIDA PELICULOSA | | |

SENSIBLE**VALIDADO POR**Lcda. Solmayra Ágreda O.
Esp. Microbiología Médica.
No Senescyt: 17013098

TCNLG.MED. AGREDA ORELLANA IVANNA SOLMAYRA

RESULTADOS DE EXAMENES

Fecha: 30-DIC-2022 15:19:12

Página 1 de 1

EXAMEN: 1058757**HISTORIA CLINICA: 160784****Cédula: 0190032981001**

| Apellido Paterno | Apellido Materno | Primer Nombre | Segundo Nombre |
|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| UNIVERSIDAD | CATOLICA DE CUENCA | FACULTAD | DE BIOQUIMICA Y FARM |

MICROBIOLOGIA

Edad : años Fecha Solicitud : 16-DIC-2022 Fecha Resultados :30-DIC-2022 00:00 No. CAMA :

Sexo : Masculino

Dep. Solicitante

Médico Solicitante MEDICO EXTERNO

Datos Clínicos: CEPA G6.2

CULTIVOS**OTROS CULTIVOS (CULTIVO)**

Concentración mínima inhibitoria.

Voriconazol: < 0.12 ug/ml

Fluconazol: 2 ug/ml

Caspofungina: 0.12 ug/ml

Micafungina: 0.06 ug/ml

Anfotericina B: <0.25 ug/ml

NOTA:

Método empleado: equipo VITEK 2 compact y Cromo Candida.

Identificación confirmada por espectrometría de masas y sensibilidad por microdilución con sensi Quatro.

No existen puntos de corte para la sensibilidad en el EUCAST ni CLSI.

| Germen | Unidad | Unidades Formadoras |
|--------------------|--------|---------------------|
| CANDIDA PELICULOSA | | |

SENSIBLE**VALIDADO POR**
Lcda. Solmayra Ágreda O.
Esp. Microbiología Médica.
No Senescyt: 17013098

TCNLG.MED. AGREDA ORELLANA IVANNA SOLMAYRA

RESULTADOS DE EXAMENES

Fecha: 30-DIC-2022 15:08:14

Página 1 de 1

EXAMEN: 1058746**HISTORIA CLINICA: 160784****Cédula: 0190032981001**

| Apellido Paterno | Apellido Materno | Primer Nombre | Segundo Nombre |
|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| UNIVERSIDAD | CATOLICA DE CUENCA | FACULTAD | DE BIOQUIMICA Y FARM |

MICROBIOLOGIA

Edad : años Fecha Solicitud : 16-DIC-2022 Fecha Resultados :30-DIC-2022 00:00 No. CAMA :

Sexo : Masculino

Dep. Solicitante

Médico Solicitante MEDICO EXTERNO

Datos Clínicos: CEPA G7.2

CULTIVOS**OTROS CULTIVOS (CULTIVO)**

Concentración mínima inhibitoria.

Voriconazol: < 0.12 ug/ml

Fluconazol: 4 ug/ml

Caspofungina: 0.12 ug/ml

Micafungina: 0.06 ug/ml

Anfotericina B: <0.25 ug/ml

NOTA:

Método empleado: equipo VITEK 2 compact y Cromo Candida.

Identificación confirmada por espectometría de masas y sensibilidad por microdilución con sensi Quatro.

No existen puntos de corte para la sensibilidad en el EUCAST ni CLSI.

| Germen | Unidad | Unidades Formadoras |
|--------------------|--------|---------------------|
| CANDIDA PELICULOSA | | |

SENSIBLE**VALIDADO POR**
Lcda. Solmayra Ágreda O.
Esp. Microbiología Médica.
No Senescyt: 17013098

TCNLG.MED. AGREDA ORELLANA IVANNA SOLMAYRA

RESULTADOS DE EXAMENES

Fecha: 30-DIC-2022 15:18:37

Página 1 de 1

EXAMEN: 1058756**HISTORIA CLINICA: 160784****Cédula: 0190032981001**

| Apellido Paterno | Apellido Materno | Primer Nombre | Segundo Nombre |
|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| UNIVERSIDAD | CATOLICA DE CUENCA | FACULTAD | DE BIOQUIMICA Y FARM |

MICROBIOLOGIA

Edad : años Fecha Solicitud : 16-DIC-2022 Fecha Resultados :30-DIC-2022 00:00 No. CAMA :

Sexo : Masculino

Dep. Solicitante

Médico Solicitante MEDICO EXTERNO

Datos Clínicos: CEPA G8.1

CULTIVOS**OTROS CULTIVOS (CULTIVO)**

Concentración mínima inhibitoria.

Voriconazol: < 0.12 ug/ml

Fluconazol: 2 ug/ml

Caspofungina: 0.25 ug/ml

Micafungina: 0.06 ug/ml

Anfotericina B: <0.25 ug/ml

NOTA:

Método empleado: equipo VITEK 2 compact y Cromo Candida.

Identificación confirmada por espectometría de masas y sensibilidad por microdilución con sensi Quatro.

No existen puntos de corte para la sensibilidad en el EUCAST ni CLSI.

| Germen | Unidad | Unidades Formadoras |
|--------------------|--------|---------------------|
| CANDIDA PELICULOSA | | |

SENSIBLE**VALIDADO POR**
Lcda. Solmayra Ágreda O.
Esp. Microbiología Médica.
No Senescyt: 17013098

TCNLG.MED. AGREDA ORELLANA IVANNA SOLMAYRA

RESULTADOS DE EXAMENES

Fecha: 30-DIC-2022 15:14:15

Página 1 de 1

EXAMEN: 1058752**HISTORIA CLINICA: 160784****Cédula: 0190032981001**

| Apellido Paterno | Apellido Materno | Primer Nombre | Segundo Nombre |
|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| UNIVERSIDAD | CATOLICA DE CUENCA | FACULTAD | DE BIOQUIMICA Y FARM |

MICROBIOLOGIA**Edad :** años **Fecha Solicitud :** 16-DIC-2022 **Fecha Resultados :** 30-DIC-2022 00:00 **No. CAMA :****Sexo :** Masculino**Dep. Solicitante****Médico Solicitante** MEDICO EXTERNO**Datos Clínicos:** CEPA G9.1**CULTIVOS****OTROS CULTIVOS (CULTIVO)**

Concentración mínima inhibitoria.

Voriconazol: < 0.12 ug/ml

Fluconazol: 2 ug/ml

Caspofungina: 0.12 ug/ml

Micafungina: 0.06 ug/ml

Anfotericina B: <0.25 ug/ml

NOTA:

Método empleado: equipo VITEK 2 compact y Cromo Candida.

Identificación confirmada por espectometría de masas y sensibilidad por microdilución con sensi Quatro.

No existen puntos de corte para la sensibilidad en el EUCAST ni CLSI.

| Germen | Unidad | Unidades Formadoras |
|--------------------|--------|---------------------|
| CANDIDA PELICULOSA | | |

SENSIBLE**VALIDADO POR**

Lcda. Solmayra Ágreda O.
Esp. Microbiología Médica.
No Senescyt: 17013098

TCNLG.MED. AGREDA ORELLANA IVANNA SOLMAYRA

Anexo 7. Secuencias nucleotídicas región ITS (cepas *W. anomalus* y cepas de referencia).

>Yeast_Isolate_F2.2

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCG
CGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCT
AAACACATTTTTTAAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAAATTTTAAACAAAAATTTAAAATCTTCAAACCTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCT
TCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTT
TCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAAC
AATAAATAAAAGTTGACCTCAA

>Yeast_Isolate_F4.1

AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGC
GGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTA
AACACATTTTTTAAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAAATTTTAAACAAAAATTTAAAATCTTCAAACCTTCAA
CAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTT
CGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTT
CTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACA
ATAAATAAAAGTTGACCTCAA

>Yeast_Isolate_G2.1

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCG
CGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCT
AAACACATTTTTTAAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAAATTTTAAACAAAAATTTAAAATCTTCAAACCTTTC
AACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACC
TTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTT
TTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAA
CAATAAATAAAAGTTGACCTCA

>Yeast_Isolate_G3.1

TTTTTAAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAAATTTTAAACAAAAATTTAAAATCTTCAAACCTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTT
GTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGAAATA
ATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAATA
AAAGTTTACCTCAAAT

>Yeast_Isolate_G6.2

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAAC
CTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTT
TTTTAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAAATTTTAAACAAAAATTTAAAATCTTCAAACCTTTCAACAACGGATC
CTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGT
ATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGAAATAAT
GTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAATAA
AGTTGACCTCAA

>Yeast_Isolate_G7.2

TTTTTTTAAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTTAAATCTTCAAACTTTCAACAACGG
ATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTT
TGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTAACTTGAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGAAA
TAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAAACAACAATAAAC
TAAAAGTTGACCTCA

>Yeast_Isolate_G8.1

TTTTTTTAAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTTAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTT
GGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTAACTTGAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGAAAT
AATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAAACAACAATAAACT
AAAAGTTGACCTCAAAT

>Yeast_Isolate_G9.1

TTTTTTTAAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTTAAATCTTCAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTT
TTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTAACTTGAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGAA
ATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAAACAACAATAAA
CTAAAAGTTGACCTCAAATC

>MT754396.1 Wickerhamomyces anomalus aislado UFTM 08.02

CTTATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCT
GGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTTTTTAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTT
TTAACAAAAATTTAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCA
CGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACC
CTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAG
TGATACTCTGTCAAAGGGTAACTTGAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGAA
ATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTA
ACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGC

>MT754395.1 Wickerhamomyces anomalus aislado UFTM 08.01

GCTTATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCC
TGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTTTTTAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTT
TTTTAACAAAAATTTAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCAC
CCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGA
GTGATACTCTGTCAAAGGGTAACTTGAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGA
AATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTGAAGTATTTTAGGCTCGGCTT
AACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAT

>KY105898.1 Cultivo de *Wickerhamomyces bovis* CBS:2616

TGTAACAAGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTTCTGTTGCCAGCGCTTGGGTGCGC
GGCGATTCTTTACACTTGTCTATTTTTACAGATATTGCTTTGGGTTGCCCTGCCTAGGCTCTGCCCTAGG
CCCCAGCCAGAGATTTAAACACCAGAGATTAATTTCTAACCACAGTCAATTTAACCAAATTACAA
TATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTA
TTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCCTCTGGTATTCCAGAGG
GTATGCCTGTTTGGAGCTCATTTCTCTCTCGAGCCCTGCCTAGCTGTGCCTAGCTGTGGGCCCGGTATT
GAGTGAACTCTCCCCAGGGTTAACTTGAAATAGGATTTTTGGCAAGAGTGTGCTAGGCAAAGCCTGGGC
TTGTGTAATGTATTAGTTCTACCAACTCATTAGACTACCCTACGGCGATCCTGCCCTAGCATCAGGCTCG
GCCTAAGAACATCCCCCTAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACT

>KY105914.1 Cultivo de *Wickerhamomyces rabaulensis* CBS:6797

CCTCTACGATTGATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATTGGCTTAAAGCAGGGGGCAACTCCAGCTTGGAGCC
GAGAAGCTAGTCAAACCTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCATAAACCTTCTACACACATTGCT
TATTTCTTTTGAATATTGCTTTGGGTTGAGCCTAGCTCAGCCAGAGGTCTTAAACACAAAGATTTATTC
TTTTTTTTTAAACCATAGTCATGAAAATTTAACAAAATTTAAATATTTCAAACCTTCAACAACGGATC
TCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTATTTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGGAGCGTCATTT
TCTCTCAAAGCTTCGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGCTCTCCAGGGTTAACTTGAAATAAGATATGG
CAAGAGTGTGCTAGGCCAGCTTGAGCTTGTGTAATGTATTAGGTTCTACCAACTCATTAACGACTCTT
GTGAAACCCAGCATATTTGGCTCGGCCTAACAACATCTCATAAAGTTGACCTCAAATCAGTGAAC

>MW624477.1 Gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña 17HLJ6025 aislado de *Diutina catenulata*

ACCTGCGGAAGGATCATAAAAACTAATTTACACGCGATTTAAAATGCTTACTTCAATAACCTATTAAA
CAATCAACCAACTAATACAAAACTTCCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATTTTGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCG
TGGGTATTCCCAGGGCATGCGTGTGTGAGCGGTTATCTCCCTCGCAGGTAATGGACATACGGCGTCAGC
TGTTCTCCAAAAGTGATTGGTGTAGTATTACAGTTTACTCACAACCATACTTTTCCCCTCACACAGT
AAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

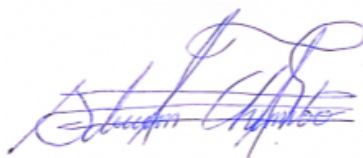
>KX424387.1 *Rhodotorula glutinis* aislado 418

CACCATCACTTATAAAACACAAAGTCTATGAATGTATACAAATTTATAACAAAACAAAATTTCAACAA
CGGATCTTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAATC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGT
CATGAAATCTTCAACCACCTCTTTCTTAGTGAATCTGGTGGTGCCTGGTTTCTGAGCGCTGCTCTGCTT
CGGCTTAGCTCGTTGTAATGCATTAGCATCCGCAACCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTAT
TCGCTGAGGATTCTAGTTTACTAGAGCCGAGTTGGGTTAAAGGAAGCTCCTAA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, **Adrián Esteban Chimbo Granda** portador de la cédula de ciudadanía N° **0105812317**. En calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales del proyecto de titulación “**Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Wickerhamomyces anomalus* que colonizan la mucosa nasal de cuyes domésticos (*Cavia porcellus*) en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador)**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este proyecto de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 09 de junio del 2023.



Adrián Esteban Chimbo Granda

0105812317