



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR**

**CARRERA DE BIOFARMACIA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA VIRULENCIA Y RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Diutina catenulata* QUE  
CIRCULAN ENTRE CUYES (*Cavia porcellus*) CRIADOS PARA  
CONSUMO EN LA PROVINCIA DEL CAÑAR (ECUADOR)**

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

**AUTORES: JUAN SEBASTIÁN BARREZUETA VÁSQUEZ**

**RÓMULO ADRIÁN CARREÑO PARRA**

**DIRECTORA: DRA. LENYS MARGARITA BUELA SALAZAR**

**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 DE LA VIRULENCIA Y RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Diutina catenulata* QUE CIRCULAN  
ENTRE CUYES (*Cavia porcellus*) CRIADOS PARA CONSUMO EN LA  
PROVINCIA DEL CAÑAR (ECUADOR)**

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

**AUTORES: JUAN SEBASTIÁN BARREZUETA VÁSQUEZ**

**RÓMULO ADRIÁN CARREÑO PARRA**

**DIRECTORA: DRA. LENYS MARARITA BUELA SALAZAR**

**CUENA - ECUADOR**

**2023**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**

## Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Nosotros, **Juan Sebastián Barrezueta Vásquez** y **Rómulo Adrián Carreño Parra** portadores de las cédulas de ciudadanía N.º **0106849904** y **1400617468**. Declaramos ser autores de la obra: “**CARACTERIZACIÓN DE LA VIRULENCIA Y RESISTENCIA ANTIMICROBINA DE CEPAS DE *Diutina catenulata* QUE CIRCULAN ENTRE CUYES (*Cavia porcellus*) CRIADOS PARA CONSUMO EN LA PROVINCIA DEL CAÑAR (ECUADOR)**”, sobre la cual nos hacemos responsables sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaramos que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximimos a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaramos finalmente que nuestra 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 nos responsabilizamos y eximimos a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 30 de mayo del 2023

Juan Sebastián Barrezueta Vásquez

0106849904

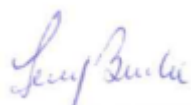
Rómulo Adrián Carreño Parra

1400617468

**CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR**

Certifico que el presente trabajo de titulación denominado "**CARACTERIZACIÓN DE LA VIRULENCIA Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Diutina catenulata* QUE CIRCULAN ENTRE CUYES (*Cavia porcellus*) CRIADOS PARA EL CONSUMO EN LA PROVINCIA DEL CAÑAR (ECUADOR)**" realizado por **JUAN SEBASTIÁN BARREZUETA VÁSQUEZ Y RÓMULO ADRIÁN CARREÑO PARRA** con documentos de identidad **No. 0106849904 y 1400617468**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución bajo el asesoramiento permanente de mi persona en calidad de Tutora. 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



.....  
**DRA. LENYS MARGARITA BUELA SALAZAR**

**DEDICATORIA.**

Quisiera dedicar este logro primero y principalmente a mi abuelita. La afable y siempre esperanzadora RUTH IRENE AYORA GUALPA. Esto jamás hubiera sido posible sin su confianza, sin sus consejos y sin el amor que me dió desde pequeño. Usted logró rescatarme de una posible vida de ignorancia, me otorgó una oportunidad y con esto espero retribuirle como se debe. El camino fue tormentoso, pero usted siempre estuvo para mostrarme el que era correcto. Por ello, este trabajo no es solo mío, es suyo. Pues usted lo hizo posible.

JUAN SEBASTIÁN BARREZUETA VASQUEZ.

**AGRADECIMIENTOS:**

Queremos agradecer primero y principalmente a nuestras familias, las mismas que han sido nuestro catalizador y soporte para seguir adelante. También es importante reconocer a nuestros tutores, al doctor Andrés Yarzábal y a la doctora Lenys Buela quienes supieron guiarnos e impartirnos sus conocimientos, de tal manera que nos fue posible pulir nuestras fortalezas y superar nuestras debilidades. Por otra parte, también es necesario expresar nuestro agradecimiento a las autoridades de la Universidad Católica de Cuenca y docentes que despertaron nuestro interés científico y permitieron la realización de nuestra investigación.

## RESUMEN.

**Palabras clave:** *Candida catenulata*, *Diutina catenulata*, zoonosis, virulencia y filogenia.

**Introducción:** *Diutina catenulata* es un ascomiceto que pertenece a los Saccharomycetales, esta ha sido aislada de animales domésticos y humanos.

**Objetivo:** El objetivo de la presente investigación fue determinar la expresión de factores de virulencia y la susceptibilidad antifúngica en cuatro cepas de *Diutina catenulata*, aisladas de la mucosa nasal de cuyes criados para consumo humano.

**Materiales y métodos:** Se incluyeron métodos microbiológicos y bioinformáticos: análisis macro y micro-morfológicos, temperatura óptima de crecimiento, producción de enzimas hidrolíticas, capacidad de penetración, susceptibilidad antifúngica y análisis filogenético.

La producción de proteasas, hemolisinas y fosfolipasas se determinó al cabo de 72 horas a 30 °C en medio SD. La susceptibilidad antifúngica se evaluó en presencia de cinco antimicóticos: voriconazol, fluconazol, caspofungina, micafungina y anfotericina B. Las CMI se cuantificaron con un equipo VITEK 2. Para establecer la filogenia de las cepas utilizamos el programa "MEGA 11" con el método de "máxima similitud".

**Resultados:** Las células de las cuatro cepas se multiplicaron de manera óptima a 30°C y resultaron ser ovaladas, con presencia de gemas y pseudohifas. Todas las cepas produjeron hemolisinas de tipo alfa y penetraron activamente el sustrato agarizado, con producción de hifas verdaderas. Se detectaron CMI > 8 µg/mL para fluconazol, lo cual sugiere una posible resistencia. Las cuatro cepas pertenecen a un mismo clado monofilético y se relacionan evolutivamente con una cepa clínica de *D. catenulata*.

**Conclusión:** Las cuatro cepas de *D. catenulata* demostraron poseer potencial patogénico para las personas que estén en contacto directo con estos animales.

**ABSTRACT.**

**Keywords:** *Candida catenulata*, *Diutina catenulata*, zoonosis, virulence and phylogeny.

**Introduction:** *Diutina catenulata* is an ascomycete belonging to the Saccharomycetales and has been isolated from domestic animals and humans.

**Objective:** The aim of this investigation was to determine the expression of virulence factors and antifungal susceptibility in four strains of *Diutina catenulata* isolated from the nasal mucosa of guinea pigs raised for human consumption.

**Materials and Methods:** Microbiological and bioinformatic methods were used: macro- and micromorphological analysis, optimal growth temperature, hydrolytic enzyme production, penetration capacity, antifungal susceptibility, and phylogenetic analysis.

Protease, hemolysin, and phospholipase production were determined after 72 hours at 30°C in the SD medium. Antifungal susceptibility was evaluated in the presence of five antifungal agents: voriconazole, fluconazole, caspofungin, micafungin, and amphotericin B. MICs were quantified using a VITEK 2 kit. To establish the strains phylogeny, the "MEGA 11" program was used with the "maximum similarity" method.

**Results:** The cells of the four strains multiplied optimally at 30°C and were oval, with the presence of gems and pseudohyphae. All strains produced alpha-type hemolysins and actively penetrated the agar substrate with the production of true hyphae. MICs > 8 µg/mL were detected for fluconazole, indicating possible resistance. All four strains belong to the same monophyletic clade and are evolutionarily related to a clinical strain of *D. catenulata*.

**Conclusion:** All four strains of *D. catenulata* were shown to have pathogenic potential for humans in direct contact with these animals.

**ÍNDICE**

INTRODUCCIÓN .....	9
CAPÍTULO I .....	3
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	3
I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN. ....	4
I.2.- JUSTIFICACIÓN .....	6
I.2.1.- PREGUNTAS CIENTÍFICAS: .....	7
I.2.2.- HIPOTESIS.....	8
I.3.- OBJETIVOS.....	8
I.3.1.-Objetivo General:.....	8
I.3.2.-Objetivos Específicos:.....	8
I.4.- MARCO TEÓRICO .....	8
I.4.1.- Antecedentes:.....	8
I.4.2.- Marco referencial: .....	10
Zoonosis .....	10
Enfermedades infecciosas causadas por microorganismos. ....	11
Levaduras y mohos. ....	11
Levaduras patógenas. ....	12
<i>Diutina catenulata</i> . ....	12
Taxonomía.....	12
Fisiología. ....	13
Aspectos genéticos.....	13
Genes asociados con factores de virulencia. ....	13
Ubicación filogenética.....	14
Aspectos de relevancia clínica.....	14
Factores de virulencia de <i>D. catenulata</i> .....	15
Sensibilidad antifúngica de <i>D. catenulata</i> . ....	15
CAPÍTULO II .....	17
METODOLOGÍA .....	17
II.1.- Diseño de investigación. ....	18
II.2.- Población y muestra. ....	18
II.2.1. Universo - Población:.....	18
II.2.2 Muestreo y muestra: .....	18
II.4.- Definición y clasificación de las variables .....	18
II.4.1- Medios de cultivo.....	18

II.4.2-Temperatura de cultivo.....	18
II.4.3- Formación de colonias.....	18
II.4.4- Color de colonias.....	18
II.4.5- Aspecto de colonias.....	19
II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.....	19
Análisis morfológico, celular y fenotípico de las colonias producidas por las cepas de <i>Diutina catenulata</i> .....	19
Temperatura ideal de crecimiento en cepas de <i>D. catenulata</i> .....	19
Actividad Fosfolítica.....	19
Actividad Hemolítica.....	20
Actividad proteolítica.....	20
Capacidad invasora o penetrancia levaduriforme.....	20
SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA.....	21
UICACIÓN FILOGENETICA DE LAS CEPAS DE <i>D. CATENULATA</i> .....	21
II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos.....	21
II.6.- Aspectos éticos.....	22
CAPÍTULO III.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
Análisis morfológico de las colonias y células de las cepas de <i>D. catenulata</i> .....	24
Temperatura óptima de crecimiento de las cepas de <i>D. catenulata</i> .....	29
Actividad lipolítica.....	31
Actividad hemolítica.....	31
Actividad proteolítica.....	33
Capacidad de penetración de sustrato semi-sólido.....	33
Susceptibilidad antifúngica.....	35
Identificación y filogenia molecular.....	36
<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
CAPÍTULO IV.....	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
IV.1.- CONCLUSIONES.....	45
IV.2.- RECOMENDACIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
GLOSARIO.....	52
ANEXOS.....	53

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por microorganismos son un tema muy relevante para la salud pública. Pueden definirse como el ingreso y la multiplicación de un microorganismo patógeno en un hospedero humano o animal, proceso favorecido por ciertos factores exógenos, como las condiciones ambientales, o por factores endógenos, como las propiedades intrínsecas del microorganismo (1).

Por otro lado, las zoonosis, son infecciones causadas por microorganismos que pueden transmitirse de forma natural entre animales vertebrados y el hombre; o, se desplazan entre diferentes animales hospedadores hasta llegar al ser humano. Por lo general, los animales y los seres humanos comparten microorganismos y enfermedades como inevitable consecuencia de una coexistencia natural (2).

Hasta la actualidad, se conocen miles de especies de microorganismos en nuestro planeta; pero sólo se han identificado alrededor de 1.400 microorganismos capaces de producir infecciones en el ser humano. Según un informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) se estima que el 60% de las infecciones humanas son de origen animal y el 75% de las enfermedades infecciosas emergentes en humanos son zoonóticas(2).

Los hongos son microorganismos que juegan un papel fundamental en la descomposición de materia orgánica y el reciclado de materiales. No obstante, existen especies que se catalogan como patógenos verdaderos o como patógenos oportunistas y son capaces de causar enfermedades tanto en humanos, como en animales y plantas (3).

En humanos, las infecciones por hongos pueden ser de tipo superficial o sistémica; estas últimas se deben a la diseminación de los mismos por todo el organismo, la colonización y afectación de tejidos u órganos internos. Según la Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, las especies de hongos pertenecientes a los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocytis* e *Histoplasma* son responsables del 90% de aproximadamente un millón y medio de muertes anuales asociadas con micosis invasoras (3).

Por otra parte, las infecciones zoonóticas en su mayoría son de tipo bacteriana, viral y parasitaria. En contraparte, las micosis zoonóticas son minoritarias y en la mayoría de los casos son frecuentes en pacientes inmunocomprometidos (4).

Un estudio realizado en México demostró que varias especies del género *Sporothrix schenckii*, causantes de esporotricosis en humanos, tienen un potencial de micosis zoonótica para la transmisión en humanos. Asimismo, dicha micosis subcutánea es la más prevalente en la población mexicana. (5).

Otro estudio realizado en Argentina, explicó que los dermatofitos (tiñas) en los caninos son una micosis zoonótica que se distribuye en todo el mundo. Esta infección es dada por hongos dermatofitos como *Microsporium canis* y *Nannizzia gypsea* que tienen la capacidad de utilizar la queratina o tejidos queratinizados de animales y humanos como un nutriente (6).

En la actualidad se han descubierto una gran variedad levaduras patógenas emergentes. Dentro de este grupo se encuentra *Diutina catenulata*, levadura ascomiceta perteneciente a los *Saccharomycetales*. Entre las características de este hongo destaca la capacidad de contaminar productos lácteos y de degradar hidrocarburos (7).

Su importancia clínica radica en la capacidad de ser un patógeno oportunista que coloniza especies animales como perros, aves de corral, cuyes, aves silvestres, lechones, animales vacunos y varias fuentes ambientales (8). Ocasionalmente puede infectar también a seres humanos.

**CAPÍTULO I**  
**PLANTEAMIENTO TEÓRICO.**

## I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

A nivel mundial, las infecciones causadas por microorganismos desempeñan un papel fundamental en la afectación de la salud de los seres vivos, convirtiéndose desde hace milenios en un problema de salud pública. Una de las maneras más comunes para adquirir una infección es a través del contacto directo o indirecto, con animales colonizados o infectados por microorganismos patógenos, dando origen a las denominadas “zoonosis”. Este término puede definirse como aquellas enfermedades en las cuales un agente infeccioso se transmite desde un animal hacia un hospedador humano que desarrollará una patología. La adquisición del patógeno puede ocurrir a través del consumo de alimentos de origen animal contaminados (9)(10).

De manera global, se estima que el 61% de los patógenos del ser humano poseen características zoonóticas y de acuerdo a un artículo publicado en 2020, alrededor de 2,7 millones de personas mueren por este tipo de enfermedades cada año (11). Las zoonosis pueden tener diferentes agentes etiológicos, que abarcan desde estructuras abióticas como los priones, hasta microorganismos como virus, bacterias, parásitos y hongos (9)(10).

Los hongos pertenecientes al género *Candida* se asocian con muchas patologías en el ser humano. Su representante más importante, desde el punto de vista clínico, es *Candida albicans*. No obstante, también existen otras especies de hongos levaduriformes de importancia clínica, muchas de las cuales aún no han sido estudiadas de forma exhaustiva.

Entre este grupo de especies resalta *Diutina catenulata*, anteriormente conocida como *Candida catenulata*, *Candida ravautii* y *Candida brumptii* (11)(12). En animales, esta especie de levadura ha sido aislada a partir de las heces y huevos producidos por algunas gallinas(8). Así como también, algunos investigadores han demostrado su presencia asociada a caninos con halitosis y su identificación como agente causal de enfermedades crónicas, como la neumonía (13)(14).

Adicionalmente, *D. catenulata* actuando en sinergia con *Candida famata* ha sido responsable de la primera infección doble adquirida de forma natural en un criadero de ratas albinas (15).Otros artículos indican su presencia en la leche de

algunas vacas e inclusive se ha asociado a esta especie con el desarrollo de mastitis (16).

Por otro lado, también se han reportado infecciones producidas por este patógeno en humanos. Según Kopsa et.al, se ha evidenciado su presencia en un caso de dermatomicosis. Adicionalmente, *D. catenulata* ha sido obtenida de muestras de pacientes con cáncer gástrico, endocarditis e infecciones vulvovaginales (11)(17). Generalmente los pacientes infectados presentaron síntomas como dolor abdominal, fiebre, fatiga, hepatomegalia entre otros (11)(17). En cuanto a parámetros de laboratorio, la sumatoria de casos encontrados en la literatura describen la presencia de leucocitosis, pancitopenia, anemia y disminución en los niveles de enzimas hepáticas (11)(17).

Con estos antecedentes se puede presumir que *D. catenulata* es una especie de importancia desde un punto de vista clínico, ya que, al estar presente en animales domésticos -como los perros- y de granja -como las vacas- sumado a las infecciones reportadas en personas, hacen de esta levadura un potencial agente zoonótico.

Por lo tanto, el control y estudio riguroso en el cuidado de los animales domésticos y de ganado bovino es fundamental, para limitar los riesgos asociados con este hongo. No obstante, a nivel mundial y local hay pocos o nulos estudios que se centren en esta levadura. Esto no indica que en Ecuador no exista la presencia de *D. catenulata* puesto que, en un reciente estudio, investigadores de la Universidad Católica de Cuenca han aislado e identificado 4 cepas de dicha especie a partir de fosas nasales de cuyes (*Cavia porcellus*) criados en la región de Cañar para consumo humano (18).

## I.2.- JUSTIFICACIÓN

En las regiones andinas, la comercialización de cuyes tiene gran importancia. Esto se debe a la alta demanda de los consumidores, debido a su apreciada carne. Si bien, esto refuerza la economía de los pequeños y medianos productores, las prácticas aplicadas en la alimentación y cuidado de estos animales muchas veces no es la ideal (19). En Ecuador se usan técnicas de cría de cuyes similares a las de países vecinos, como el Perú, especialmente en lo referente a la alimentación; pero, en general, estas técnicas no son eficientes y por tanto facilitan la adquisición de una infección (19).

Por consiguiente, debido a la capacidad de los cuyes de actuar como reservorios de patógenos, pueden convertirse en fuentes de infección para el criador, el intermediario, el vendedor, e –inclusive- el consumidor. Su capacidad patogénica está determinada por sus factores de virulencia (ver más abajo). En una investigación realizada en gallinas, se demostró que algunas cepas de *D. catenulata* eran productoras de fosfolipasas y hemolisinas (8). Este aspecto tiene importancia clínica, pues la producción de hemolisinas le confiere a la levadura la capacidad de hemolizar los glóbulos rojos y, por ende, podría migrar por la sangre hacia otros órganos y tejidos. Por otro lado, las fosfolipasas, además de favorecer la degradación de tejidos y células, han sido vinculadas a la resistencia frente a algunos compuestos anti-fúngicos como el fluconazol (8).

Por consiguiente, la presente investigación busca aportar al conocimiento científico en este ámbito, mediante la generación y divulgación de información. En efecto, con la caracterización fenotípica y filogenética de cepas de origen animal de *D. catenulata*, se pueden obtener datos útiles que indiquen su grado de virulencia y resistencia.

De esta manera, considerando que estos rasgos están estrechamente relacionados con la patogenicidad de estas cepas, se puede identificar potenciales peligros a los que pueden estar expuestos los seres humanos que interactúan con estos animales (por ejemplo, los criadores y los consumidores) y por ende sugerir medidas de prevención y control.

La investigación es novedosa, ya que, hasta donde hemos podido averiguar consultando la bibliografía, en el territorio ecuatoriano no se han publicado

estudios sobre esta especie de levadura, considerada un patógeno emergente responsable, ocasionalmente causante de infecciones sistémicas y resistentes a algunos anti fúngicos (7).

Por otra parte, entre los principales beneficiarios de esta investigación se encuentran:

Los tesisistas, que seremos beneficiados mediante el aprendizaje experimental y teórico que lleguemos a adquirir durante la realización de la investigación la cual, además, nos permitirá graduarnos.

La Universidad Católica de Cuenca, también se verá beneficiada, ya que incorporará en sus archivos datos que aporten a la comunidad científica.

Los tutores investigadores de la Universidad Católica de Cuenca, puesto que con la investigación a realizar obtendrán más datos para fortalecer uno de sus proyectos de investigación.

Otros beneficiados de manera indirecta son aquellos trabajadores del campo debido a que la información obtenida, será de utilidad para en un futuro establecer medidas preventivas que salvaguarden su salud.

Finalmente, en cuanto a la factibilidad de recursos (equipos, instrumentos y reactivos), estos serán dispuestos por el laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad Católica de Cuenca a partir de un proyecto titulado “Diversidad de cepas del género *Candida* que colonizan mucosas y tejidos de animales de granja en la provincia del Cañar (Ecuador 2021): Resistencia a compuestos antifúngicos y factores de virulencia”, cuyo coordinador es el Dr. Andrés Yarzabal.

### **I.2.1.- PREGUNTAS CIENTÍFICAS:**

- ¿Qué características fenotípicas y morfológicas presentan las colonias y las células de las cepas de *D. catenulata* aisladas a partir de mucosa nasal de cuyes?
- Las cepas en estudio de *D. catenulata* ¿son capaces de producir factores de virulencia como fosfolipasas, hemolisinas y proteasas?
- ¿Cuál es la susceptibilidad que presentan las cepas de *D. catenulata* en estudio a antifúngicos de relevancia clínica como el fluconazol y caspofungina?
- ¿Cuál es la ubicación filogenética de las diferentes cepas de *D. catenulata* en estudio?

**I.2.2.- HIPOTESIS:** Aunque se trata de un estudio de tipo observacional y descriptivo (no experimental), podemos aventurarnos a plantear la siguiente hipótesis: las cepas de *D. catenulata* aisladas a partir de mucosa nasal de cuyes tienen el potencial patogénico para convertirse en especies de relevancia clínica.

### **I.3.- OBJETIVOS**

#### **I.3.1.-Objetivo General:**

- Determinar la producción de factores de virulencia y la resistencia antimicrobiana en cepas de *Diutina catenulata* aisladas a partir de las fosas nasales de cuyes (*Cavia porcellus*) en la provincia del Cañar.

#### **I.3.2.-Objetivos Específicos:**

- Caracterizar morfológicamente cepas de *D. catenulata* aisladas a partir de cuyes criados para consumo humano.
- Determinar la expresión de factores de virulencia (hemolisinas, fosfolipasas, proteasas y capacidad de penetración) de cepas de *D. catenulata* de origen animal.
- Evaluar la susceptibilidad de cepas de *D. catenulata* frente a compuestos antifúngicos de uso terapéutico.
- Ubicar filogenéticamente, mediante técnicas moleculares y bioinformáticas a las cepas de *Diutina catenulata* aisladas de las fosas nasales de cuyes en la provincia del Cañar.

### **I.4.- MARCO TEÓRICO**

**I.4.1.- Antecedentes:** Al ser un patógeno emergente que no ha recibido demasiada atención en los últimos años, la literatura disponible sobre *D. catenulata* es escasa a nivel mundial y casi nula a nivel latinoamericano. Así lo reflejan los resultados de la búsqueda bibliográfica que hemos realizado en revistas científicas indexadas en plataformas como: Pubmed, Scopus, ProQuest, Scielo, Latindex y Redalyc. La evidencia que hemos obtenido se presenta a continuación.

En Corea del Sur, un perro de raza Shih-Tzu fue tratado con antibióticos y corticoides para reducir los síntomas de la dermatitis atópica. Tras varias semanas se realizó un examen de tórax revelando opacidades en vidrio esmerilado en todo el parénquima pulmonar sugiriendo una neumonía generalizada, tras el lavado traqueal los fluidos se sometieron a cultivo bacteriano/fúngico. Tras la identificación de *D. catenulata*, posteriormente, al

aislado se le realizaron pruebas moleculares, una de ellas fue la amplificación de la región ITS1, 5.8S e ITS2. Al momento de comparar con las secuencias de la base de datos de GenBank, la secuencia deducida fue 100% idéntica a la de *Candida catenulata* (14).

En un criadero de ratas albinas en la India, 200 ejemplares contrajeron infecciones por *C. famata* y *C. catenulata* en el cerebro, corazón, pulmones, hígado, riñones, bazo y estómago. De los 200 roedores examinados, 40 revelaron una infección diseminada, 10 presentaron colonización a nivel cerebral. De esta manera, *C. catenulata* estuvo involucrada en el primer caso de doble infección adquirida de forma natural en ratas albinas (15).

En Rusia, un estudio evaluó el número de levaduras y la diversidad de especies en heces de palomas (*Columba livia*) en varios parques, patios recreativos y recintos escolares de la ciudad de Moscú. Las cepas se identificaron mediante análisis bioinformático mediante BLAST. Los criterios de similitud para la identificación se basaron en porcentajes de identidad entre 99,8 al 100%. En total, se encontraron 13 especies de levaduras: ocho ascomicetos y cinco basidiomicetos. *D. catenulata* fue aislada como patógeno oportunista con una frecuencia del 50% (20).

Un estudio realizado en Polonia mostró la prevalencia de ciertas especies levaduriformes en el tracto gastrointestinal de pavos de cinco semanas de edad. Las muestras recolectadas pertenecieron a la cavidad oral, buche y la cloaca, estas se cultivaron y se clasificaron usando análisis morfológicos, bioquímicos y genéticos basados en la secuenciación del fragmento ITS1-5.8rRNA-ITS2. El tipo de levadura aislada con mayor frecuencia fue *D. catenulata* (30,7%) en las muestras del tracto gastrointestinal de los pavos (21).

En Brasil, un estudio de análisis clínico y micológico en la cavidad bucal de caninos mostró que 59 hembras presentaron infecciones por 11 tipos de especies levaduriformes; entre estas se encontraba *C. catenulata*, cuyos aislados fueron más prevalentes en los perros con halitosis (85,7%) en comparación a los perros sin halitosis (46,2%) (13).

En Colombia, se realizó un estudio en el que se analizaron muestras óticas provenientes de cerdos para evidenciar la presencia de microorganismos. Los

resultados mostraron la presencia de 6 aislados de *Candida* spp. Estos fueron caracterizados de forma macroscópica y microscópica, de los cuales un aislado correspondió a *Candida catenulata* (22).

Por otra parte, en México una investigación identificó varios tipos de levaduras procedentes de aves de corral. Para la identificación de estas se realizaron análisis morfológicos y moleculares en los que se incluyó la amplificación de la subunidad larga D1/D2 por PCR. Luego de comparar las secuencias en el GenBank, los resultados arrojaron una identidad del 100% de cuatro aislados con *C. catenulata*. Por tal motivo fueron identificados y reportados de esa forma (23).

#### **I.4.2.- Marco referencial:**

##### **Zoonosis**

En la actualidad, las enfermedades infecciosas emergentes son de gran preocupación para la comunidad científica, puesto que las nuevas infecciones son producto de la evolución de los microorganismos existentes y se extienden a nuevas áreas geográficas o poblaciones. De tal forma que muchas de estas enfermedades son de tipo zoonóticas (24).

Para que exista la propagación de patógenos entre diferentes especies es necesario la interacción en conjunto de procesos genéticos y ecosistémicos (24).

La incidencia de las zoonosis aumenta cuando el ser humano vive en estrecho contacto con los animales y cuando entra en contacto con los mismos en nuevas regiones geográficas (10). Es así que las infecciones aparecen en áreas que están sufriendo una transformación ecológica, o algunas reemergen debido a una resistencia a los antimicrobianos(10).

Alrededor del 60% de todas las enfermedades infecciosas humanas provienen de animales vertebrados (9). Se estima que el 75% de los agentes patógenos considerados emergentes en la especie humana contagian a otro hospedador animal (24). El contacto humano directo con los animales se ha ampliado con la domesticación de animales vertebrados, por tal razón, se incrementan las enfermedades infecciosas producidas por zoonosis (9).

### **Enfermedades infecciosas causadas por microorganismos.**

Una enfermedad infecciosa puede ser provocada por la acción de varios agentes microbianos sobre un organismo que actúa como hospedador. Dichos agentes son hongos, bacterias, micoplasmas, chlamydias, rickettsias, virus, priones y protozoarios (1).

Las infecciones de etiología vírica son las más frecuentes a nivel mundial. Existe una amplia variedad de virus causantes de infecciones, como los de la gripe A y B, Ébola, Hepatitis, SIDA, entre otros. La mayoría de estos virus poseen una alta variabilidad genética, que determina una evolución constante, que afecta aspectos como su tropismo, su capacidad de transmisión, su virulencia, su capacidad de evadir la respuesta inmune y su resistencia a los fármacos antivirales (1).

Las infecciones bacterianas son responsables de otra gran cantidad de enfermedades que perjudican a un gran número de personas. Estas se producen cuando las bacterias colonizan órganos o tejidos que no son sus hábitats naturales; un claro ejemplo de esto son aquellas especies de bacterias que afectan el tracto urinario, principalmente en mujeres. Otros ejemplos incluyen invasiones al tejido respiratorio por agentes bacterianos como *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (25).

Por otra parte, las infecciones fúngicas son ubicuas. De acuerdo a datos de la OMS afectan del 20% al 25% de la población mundial. Los agentes micóticos aumentan drásticamente en criaderos de animales y el trabajo agrícola (26).

### **Levaduras y mohos.**

La clasificación más sencilla para el reino fungi se basa en la morfología microscópica de las células; de esta manera, los hongos se dividen en Levaduras y Mohos. Los segundos se caracterizan por ser multicelulares y producir hifas (largas cadenas de células que permanecen unidas luego de la división) que, en conjunto, forman una compleja estructura en red llamada micelio. Por otro lado, las levaduras son microorganismos unicelulares que tienen la particularidad de reproducirse por gemación o fisión binaria, aunque algunas producen pseudohifas o hifas. Esto último es un fenómeno conocido como “cambios en el fenotipo inducidos por el entorno o ambiente” (“phenotypic switch”). Esta

capacidad de cambiar su morfología es característica de algunas levaduras, que la utilizan para producir hifas e invadir tejidos (27).

### **Levaduras patógenas.**

De manera general, algunas levaduras actúan como patógenos oportunistas frente a pacientes inmunosuprimidos. Por tanto, en ambientes hospitalarios pueden ser responsables de infecciones nosocomiales. Las especies de levaduras patógenas más prevalentes incluyen a las pertenecientes al género *Candida*, puesto que, de acuerdo a una lista emitida por la OMS en 2020, *C. albicans* y *C. auris* se encuentran dentro del grupo de patógenos de prioridad crítica(28).

También otras especies como *C. glabrata* y *C. krusei* pertenecen a grupos de alta y mediana prioridad, respectivamente (28). La importancia clínica de estos agentes infecciosos radica en su alta incidencia por año, el número de muertes producidas por sus infecciones y la resistencia a los tratamientos antifúngicos (28). Por ejemplo, algunas cepas de *C. glabrata* y *C. auris* han demostrado poseer resistencia a azoles, anfotericina B y equinocandinas (29).

Por otro lado, también son de importancia médica especies de levaduras pertenecientes a géneros como *Cryptococcus*, *Malazessia*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*. Tal es el caso de *Cryptococcus neoformans*, un patógeno oportunista en pacientes con SIDA (30).

### ***Diutina catenulata.***

*Diutina catenulata* es una levadura perteneciente al filo ascomycota. Originalmente ha sido considerada un contaminante común de productos lácteos, como el queso de origen australiano; también es utilizada por su capacidad para degradar hidrocarburos. Su importancia clínica radica en su naturaleza de patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos. También ha sido aislada de la cavidad oral de perros, heces de aves de corral, aves silvestres, cuyes, lechones y fuentes ambientales. Hasta la actualidad, existen pocos estudios sobre *D. catenulata* (31).

### **Taxonomía.**

De manera general, las especies pertenecientes al género *Diutina* se caracterizan por presentar células unicelulares, ovoides o elipsoidales. Tiene la

particularidad de crecer de forma multilateral mediante pseudohifas y sin formar ascosporas (31)(32). *D. catenulata* en un inicio perteneció a los Saccharomycetales. No obstante, posteriores análisis la ubicaron en los Debaryomycetaceae/Metschnikowiaceae.

### **Fisiología.**

La literatura sugiere que *D. catenulata* es capaz de metabolizar monosacáridos como la glucosa y galactosa, aunque también puede fermentar alcoholes como el etanol y glucitol. Además, es importante mencionar que para su crecimiento no requiere de aminoácidos, y su temperatura óptima oscila entre los 28 y 33 °C y, un pH ácido de alrededor de 2,5 (32). No obstante, existen compuestos que no puede asimilar: un par de ejemplos son carbohidratos como la lactosa, L-arabinosa, D-arabinosa entre otros (32).

Por otra parte, cabe mencionar que es capaz de hidrolizar proteínas como la caseína (32).

### **Aspectos genéticos.**

En 1926, se aisló en Puerto Rico. la primera cepa de *D. catenulata*, a partir de las heces de un paciente con disentería, que fue identificada como "CBS565". Su genoma posteriormente fue secuenciado y está conformado por 14.464.696 pares de bases, que contienen 5.209 genes (7).

Por tal motivo, esta cepa es usada como base para comparaciones genéticas con otras cepas, de tal forma que se permita evidenciar semejanzas y diferencias entre genomas. Tal es el caso de un estudio, que comparó las secuencias genéticas de dos cepas de *D. catenulata* (CBS565 y WY3-10-4). Los análisis reflejaron un promedio de identidad de nucleótidos del 98% (7).

### **Genes asociados con factores de virulencia.**

En la literatura científica, se han encontrado genes que codifican factores de virulencia, como es el caso de las proteasas (7)(32). Otros estudios han evidenciado alteraciones en la secuencia de aminoácidos codificados por genes específicos como el ERG11P y FKS1P, los cuales han sido vinculados con resistencia a antimicóticos, como los azoles y equinocandinas (33). Por lo que, con la ayuda de herramientas bioinformáticas fue posible secuenciar ambos

genes. Se estima que ERG11 contiene 1.563 pares de bases y FKS1 5.652. Las mutaciones en ambos derivan en algunos casos en cepas con resistencia (33) .

En un artículo publicado en 2021, los polimorfismos de ERG11, tales como C378G, C681T, C888A y C999T estaban asociados a cepas con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) superiores a los 32 microgramos por mililitro (ug/mL) para fluconazol. Además, las sustituciones de aminoácidos como el K143R han sido vinculadas con CMI superiores a 256 ug/mL para el mismo antifúngico (33). Por otra parte, en FKS1 los cambios en su composición nucleotídica también han producido resistencia a equinocandinas como la caspofungina. Un claro ejemplo es la sustitución del aminoácido F621I que deriva en una CMI superior a los 8 ug/mL (33).

### **Ubicación filogenética.**

Este apartado ha tenido gran controversia, pues desde los inicios los primeros análisis filogenéticos posicionaban a (la en ese entonces denominada) *Candida catenulata* dentro de la familia de los Saccharomycetales. No obstante, con el pasar del tiempo y con las nuevas reglas de la nomenclatura para especies que pertenezcan al género *Candida*, se estableció que únicamente aquellas especies asexuales y con parentesco en el mismo clado de *C. tropicalis* podrían llevar el nombre como tal. Por lo que, al no cumplir esos requisitos se propuso el género *Diutina* (31).

En dicho género se posicionó a *D. catenulata* en conjunto con otras especies anteriormente conocidas como *C. rugosa*, *C. neorugosa* y *C. pseudorugosa*. También, es importante dar a conocer que para en ese entonces, ninguno de los autores pudo ubicar con exactitud a *D. catenulata* en el filo de los fungí (12)(31).

Posteriores análisis demostraron que *D. catenulata* tiene relación con la familia de los Debaryomycetaceae/Metschnikowiaceae. Esto mediante la elaboración de árboles filogenéticos que compararon el genoma de una cepa de *D. catenulata* con el de algunas especies de la familia Saccharomycetales (31).

### **Aspectos de relevancia clínica.**

De manera general, algunos hongos filamentosos y levaduriformes son patógenos oportunistas, es decir, causan enfermedad a una persona cuando su sistema inmunológico está deprimido o suprimido, ya sea por la administración

de medicamentos o por causa de enfermedades autoinmunes. De esta manera y dependiendo del entorno que rodee al microorganismo, este puede inducir cambios en la expresión de algunos genes de su genoma. Por tal motivo, puede sintetizar factores de virulencia, los cuales tienen importancia clínica, ya que muchos de estos determinan el peligro al que se enfrentan los pacientes y sus probabilidades de supervivencia.

#### **Factores de virulencia de *D. catenulata*.**

La producción de enzimas extracelulares como las fosfolipasas, hemolisinas y proteasas conllevan a un mayor grado de patogenicidad de las cepas de distintas especies de levaduras. En el caso de *D. catenulata* en la literatura se ha descrito la presencia de estas enzimas (8).

En una investigación realizada en gallinas de corral en 2020, se aislaron 17 cepas de *D. catenulata*, de las cuales el 23% produjo hemolisinas y fosfolipasas (8).

Por otra parte, en otro estudio realizado sobre la cepa QD16 de *D. catenulata*, se encontró la producción de lipasas inducida por una exposición previa de la cepa a antifúngicos como el fluconazol e itraconazol. Adicionalmente mediante otros experimentos se determinó que el pH óptimo y la temperatura ideal para la producción de esta enzima es de 5,5 y 37°C respectivamente. Cualquier aumento o descenso extremos tanto en la temperatura como en el pH disminuye la actividad enzimática (34).

#### **Sensibilidad antifúngica de *D. catenulata*.**

Un ensayo de sensibilidad antifúngica puede definirse como la capacidad que tiene un determinado antimicótico para inhibir el crecimiento de un hongo. Para ello se determina una concentración mínima inhibitoria (CIM), es decir la menor concentración que produce una inhibición considerable.

En el caso de *D. catenulata* las investigaciones han provisto datos en los que la levadura ha demostrado poseer resistencia a antifúngicos como el fluconazol, voriconazol e itraconazol. Curiosamente, de acuerdo a un estudio hecho en gallinas, los aislados obtenidos de las heces demostraron poseer una mayor resistencia que aquellos de provenientes de los huevos de las aves (8). Por otro lado, también se ha evidenciado una susceptibilidad dependiente de la dosis

para itraconazol, pues así lo sustenta un artículo en el que los investigadores presenciaron dicho fenómeno en 7 de 10 aislados de *D.catenulata* (35).

Los valores de corte o CIM de acuerdo a la literatura pueden comprender para el fluconazol una inhibición del 50 % a concentraciones de 8 mg/L. Por otra parte, para itraconazol es de 0,5 mg/L. En cuanto a porcentajes, otros estudios han encontrado que de 6 aislados de *D. catenulata* el 50% eran resistentes y de 4 aislados, el 25% presentaron resistencia al voriconazol (36).

**CAPÍTULO II**  
**METODOLOGÍA**

## **II.1.- Diseño de investigación.**

La presente investigación tiene un enfoque mixto, es decir cuantitativo y cualitativo. Es de tipo descriptiva, observacional, empírica y de corte transversal.

## **II.2.- Población y muestra.**

**II.2.1. Universo - Población:** La población parte de una colección de cepas obtenidas en un proyecto titulado ““Diversidad de cepas del género *Candida* que colonizan mucosas y tejidos de animales de granja en la provincia del Cañar (Ecuador 2021): Resistencia a compuestos antifúngicos y factores de virulencia”.

**II.2.2 Muestreo y muestra:** Debido a que las cepas del conjunto población ya estaban asiladas de los animales diana, únicamente se procedió a reactivar cinco cepas de *D. catenulata*. Sin embargo, para el análisis y realización del trabajo se escogieron únicamente cuatro cepas de la levadura.

## **II.4.- Definición y clasificación de las variables**

### **II.4.1- Medios de cultivo.**

**Definición:** Son el sustrato que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano.

**Escala:** Agar Sabouraud Dextrosa; Chromoagar Candida; PDA.

### **II.4.2-Temperatura de cultivo.**

**Definición:** El valor de la temperatura con la que se inoculan los cultivos en medio agarizado.

**Escala:** °C.

### **II.4.3- Formación de colonias.**

**Definición:** Acumulación de millones de células microbianas, idénticas entre sí, que se derivan de una única célula parental y forman una estructura macroscópica característica.

**Escala:** Presencia/Ausencia

### **II.4.4- Color de colonias.**

**Definición:** Coloración que adquiere una colonia por acción de un cromógeno o un pigmento.

**Escala:** Observación de colores como lila, celeste o sin color.

#### **II.4.5- Aspecto de colonias.**

**Definición:** Manifestación fenotípica de la proliferación microbiana.

**Escala:** Observación de la forma de las colonias que pueden presentar formas lisas, cremosas, cóncavas, convexas, brillosas u opacas.

#### **II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.**

##### **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MORFOLÓGICA.**

##### **Análisis morfológico, celular y fenotípico de las colonias producidas por las cepas de *Diutina catenulata*.**

Para este análisis empleamos tres medios de cultivo: agar Sauboraud Dextrosa (SD), PDA y Chromogar Candida. Las cuatro cepas de *D. catenulata* fueron inoculadas mediante la técnica de siembra por agotamiento en los tres medios. También se incluyó a una cepa de *Candida albicans* como control. Posteriormente los cultivos fueron llevados a incubación por 48 horas a 30°C.

Para la visualización de la morfología celular preparamos suspensiones de cada cepa y control con suero fisiológico al 0,9 %. Posteriormente, las células levaduriformes fueron observadas mediante el microscopio.

##### **Temperatura ideal de crecimiento en cepas de *D. catenulata*.**

Para este ensayo, los experimentos se hicieron por duplicado. En cada uno preparamos suspensiones de levadura de las 4 cepas de *D. catenulata* y una cepa control de *C. albicans* con solución salina, mismas que fueron homogeneizadas. Posteriormente, depositamos 5µL de suspensión en la superficie de cuatro medios del agar SD. Los inóculos fueron colocados en puntos estratégicos y llevados a incubación. Las temperaturas empleadas para los experimentos fueron: 23°C, 25°C, 30°C, 35°C, 37°C y 39°C.

##### **PRODUCCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA.**

##### **Actividad Fosfolítica.**

Para el ensayo de la actividad fosfolipasa, tomamos como referencia el estudio de Ellepola et. al (37). En primer lugar, preparamos suspensiones de levadura con solución salina al 0.9 %. La densidad óptica alcanzada fue de 1,3 mediada por un espectrofotómetro ajustado a 600 nanómetros. Posteriormente, se inocularon 10 µL de suspensión de cada cepa y 3 controles (*Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis* y *Staphylococcus aureus*) sobre puntos específicos en Agar

SD + Yema de huevo al 1,44% v/v. Las placas se llevaron a incubar a 30°C por 72 horas.

La evaluación de actividad enzimática, se llevó a cabo mediante la identificación de halos de con actividad fosfolipasa.

#### **Actividad Hemolítica.**

Para este ensayo tomamos como guía la investigación de Rhimi et. al(8). Primero, preparamos un medio agarizado (SD) y suplementado con sangre de cordero al 2,04% v/v y glucosa al 3%. De igual manera, elaboramos suspensiones de las 4 cepas y los mismos 3 controles con una densidad óptica de 1,3. EL volumen del inóculo depositado sobre la superficie del medio fue de 10µL sobre puntos específicos. Los cultivos fueron llevados a incubación a 30°C por 72 horas. Para evaluar la actividad hemolítica se identificó la presencia de halos de hemolisis.

#### **Actividad proteolítica.**

Para evaluar la capacidad de producción de caseinasa, nos basamos en el ensayo de Merchan et. al (38). Preparamos un medio de agar nutritivo con leche semidescremada al 10% previamente pasteurizada. Posteriormente, elaboramos inóculos y depositamos 5 µL de suspensión sobre la superficie del Agar leche. Finalmente, los cultivos fueron llevados a incubación a 30°C por 72 horas.

#### **Capacidad invasora o penetrancia levaduriforme.**

Para la evaluación de la capacidad invasora de las cepas de *D. catenulata* utilizamos como referencia el protocolo de Cullens et. al(39). Preparamos suspensiones de levadura con solución salina alcanzando una densidad óptica de 0,8. Posteriormente, para cada cepa de *D. catenulata* y los controles (*C. albicans* y *R. glutinis*) se elaboraron diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  respectivamente. Finalmente se depositaron 5µL de cada disolución sobre la superficie de un medio de cultivo SD, en puntos específicos.

Los cultivos se incubaron a 30°C por 5 días. Luego del crecimiento de cada cepa, procedimos con el lavado de las mismas con ayuda de agua destilada. Para retirar la biomasa restante que no había penetrado en el agar, frotamos suavemente la superficie de cada inóculo con un dedo húmedo (usando guantes

estériles). Posteriormente, comparamos el aspecto del medio antes y después del lavado. Por último, se observó la penetración de las levaduras en el medio mediante un microscopio.

### **SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA.**

Para este experimento enviamos clones de las cepas originales de *D. catenulata* al Hospital Vicente Corral Moscoso. Se utilizó un sistema automatizado llamado VITEK 2 compact y Cromo Candida. Este sistema determina la CMI mediante el empleo de una sola tarjeta AST que posee pocillos para un control positivo y para las diluciones con los antifúngicos. El sistema evaluó el desarrollo microbiano mediante curvas de crecimiento para determinar una CMI. Para este ensayo, los antifúngicos usados fueron: voriconazol, fluconazol, caspofungina, micafungina y anfotericina B.

### **UICACIÓN FILOGENETICA DE LAS CEPAS DE *D. CATENULATA*.**

Para este ensayo se utilizaron programas bioinformáticos disponibles de forma gratuita. Primero, utilizamos el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar el porcentaje de identidad que presentaba la región ITS de nuestras cepas frente a otras ya existentes y disponibles en bancos de secuencias nucleotídicas como el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El porcentaje de identidad, de cobertura y la longitud de pares de bases fueron escogidos como parámetros para el análisis del BLAST.

Por otro lado, una vez hecho el primer análisis, elaboramos un árbol filogenético con ayuda de un programa llamado MEGA 11 (<https://www.megasoftware.net/>). Las secuencias nucleotídicas de la región ITS de las cuatro cepas de *D. catenulata* fueron alineadas por la herramienta MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) y comparadas con otras cepas de la misma especie, con cepas del mismo género, pero diferente especie y con cepas de diferente género y especie. El árbol filogenético fue construido mediante el modelo matemático “máxima similitud”, con Bootstrap y 500 repeticiones.

#### **II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos**

Técnicas estadísticas: Para esta investigación al no ser una revisión sistemática de la literatura científica, no fue necesario utilizar un software estadístico.

**II.6.- Aspectos éticos.**

Debido a que trabajaremos con cepas previamente aisladas en otro proyecto y que forman parte de una colección microbiana de origen animal, este proyecto no incumple ninguna norma bioética. En adición, toda la información y datos obtenidos están expuestos de manera veras, es decir sin manipulaciones que tengan como fin enmascarar nuestras limitaciones.

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Análisis morfológico de las colonias y células de las cepas de *D. catenulata*.**

Para caracterizar la morfología de las colonias, se tomaron en cuenta 8 criterios: forma, color, superficie, brillo, margen, elevación, textura y aspecto. Los resultados que obtuvimos están resumidos en las Tablas No. 1, 2, 3 y 4:

*Tabla No. 1: Características morfológicas y fenotípicas de las colonias producidas por la cepa E 6.2*

CEPA E 6.2			
MEDIO	SD	PDA	CR
FORMA	Circular	Circular	Circular
COLOR	Blanco	Blanco	Verde
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa
BRILLO	Brillante	Brillante	Brillante
BORDE	Liso	Liso	Lisa
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa	Convexa
TEXTURA	Cremosa	Cremosa	Cremosa
DIAMETRO	1,8mm	1,8 mm	1mm

SD: Medio Sabouraud Dextrosa; PDA: medio agar papa dextrosa; CR: medio Chromoagar *Candida*

### CEPA F 4.2

*Tabla No. 2: Características morfológicas y fenotípicas de las colonias producidas por la cepa F 4.2*

MEDIO	SD	PDA	CR
FORMA	Circular	Circular	Circular
COLOR	Blanco	Blanco	Verde

SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa
BRILLO	Brillante	Brillante	Brillante
BORDE	Liso	Liso	Lisa
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa	Convexa
TEXTURA	Cremosa	Cremosa	Cremosa
DIAMETRO			

SD: Medio Sabouraud Dextrosa; PDA: medio agar papa dextrosa; CR: medio Chromoagar Candida

### CEPA F 2.1

*Tabla No. 3: Características morfológicas y fenotípicas de las colonias producidas por la cepa F 2.1*

MEDIO	SD	PDA	CR
FORMA	Circular	Circular	Circular
COLOR	Blanco	Blanco	Morado
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa
BRILLO	Brillante	Brillante	Brillante
BORDE	Liso	Liso	Lisa
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa	Convexa
TEXTURA	Cremosa	Cremosa	Cremosa
DIAMETRO	2 mm	2 mm	2mm

SD: Medio Sabouraud Dextrosa; PDA: medio agar papa dextrosa; CR: medio Chromoagar Candida

## CEPA PCA8

Tabla No. 4: Características morfológicas y fenotípicas de las colonias producidas por la cepa PCA8.

MEDIO	SD	PDA	CR
FORMA	Circular	Circular	Circular
COLOR	Blanco	Blanco	Verde
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa
BRILLO	Brillante	Brillante	Brillante
BORDE	Liso	Liso	Lisa
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa	Convexa
TEXTURA	Cremosa	Cremosa	Cremosa
DIAMETRO	1,5 mm	1,5 mm	1,5 mm

SD: Medio Sabouraud Dextrosa; PDA: medio agar papa dextrosa; CR: medio Chromoagar Candida

De acuerdo a los resultados presentados en las tablas anteriores, algunas cepas de *D. catenulata* presentaron un color característico en el medio Chromoagar Candida, que varió entre blanco, verde y morado, dependiendo de la cepa. En las cepas PCA8, E 6.2 y F4.2 (Ver Figuras 1y 2) se observó un color verde. Por otro lado, la cepa F 2.1 exhibió una coloración morada (Ver Figura 1).

Figura 1: Análisis morfológico de las cepas PCA8 y F 2.1





<b>ANÁLISIS MORFOLÓGICO</b>	
	
Cepa PCA8 (Medio Chromogar Candida): Presencia de brillo color verde.	Cepa F 2.1 (Medio Chromogar Candida): Presencia de brillo color morado.

Figura 2: Análisis morfológico de las cepas E 6.2 y F 4.2

<b>ANÁLISIS MORFOLÓGICO</b>	
	
Cepa E 6.2 (Medio Chromogar Candida): Presencia de brillo color verde.	Cepa F 4.2 (Medio Chromogar Candida): Presencia de brillo color verde.

Por otra parte, el análisis microscópico reveló que las cuatro cepas presentaron células con forma ovalada, formación de pseudohifas y estructuras en gemación (Ver Figuras 3, 4, 5 y 6).

Figura 3: Morfología celular de la cepa F 2.1

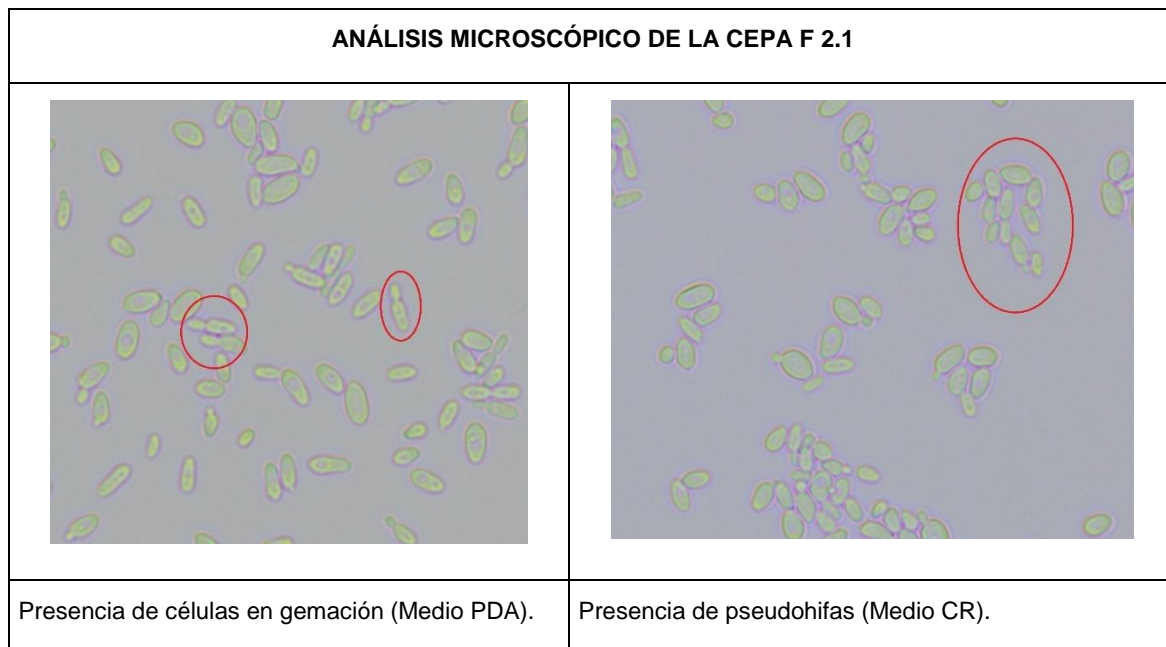


Figura 4: Morfología celular de la cepa PCA8

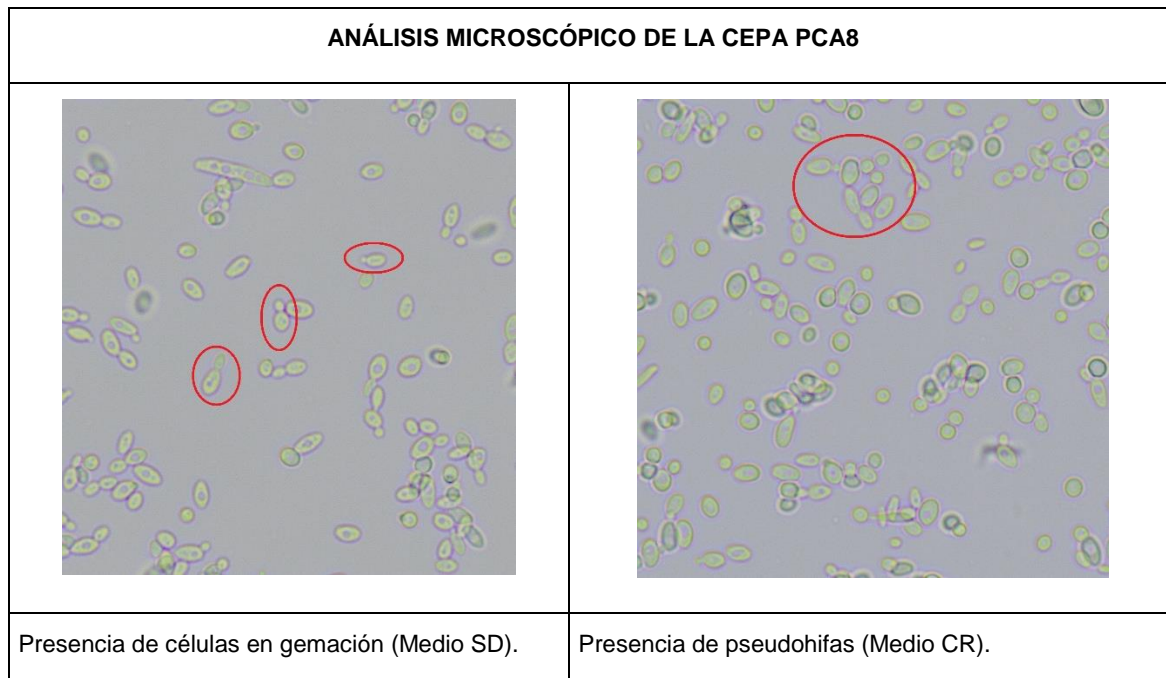


Figura 5: Morfología celular de la cepa E 6.2

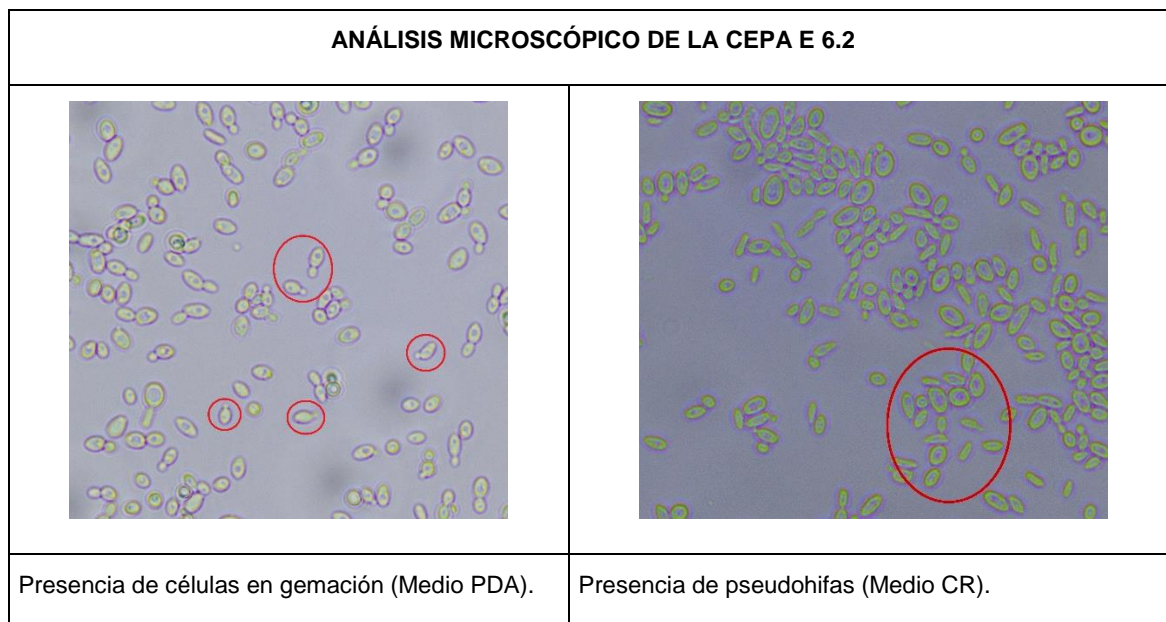
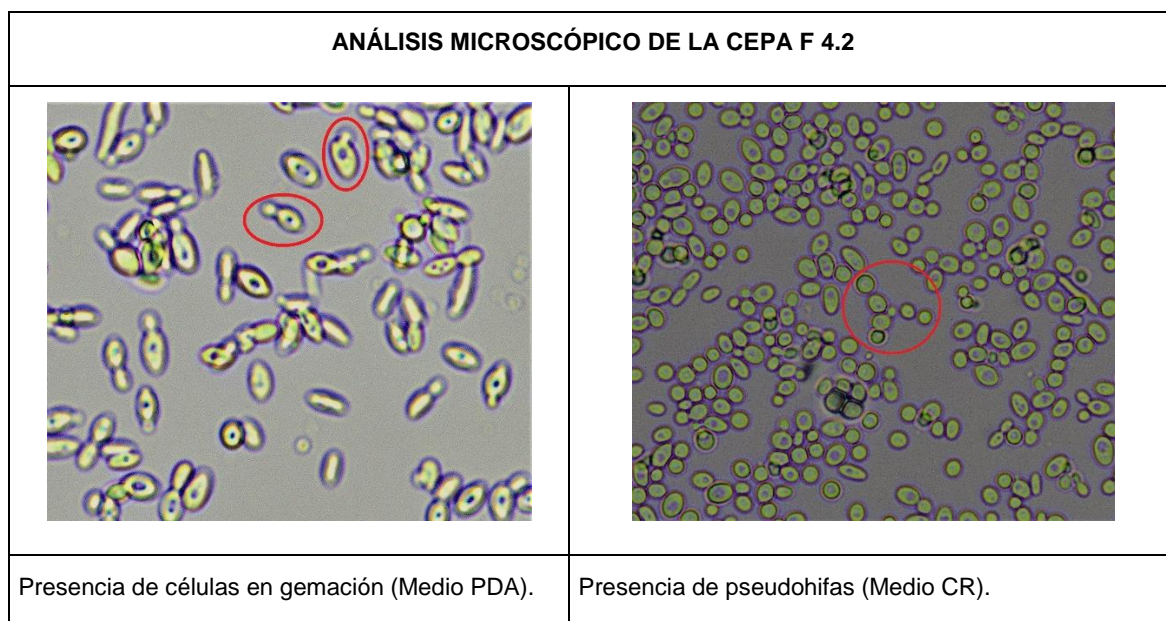


Figura 6: Morfología celular de la cepa F 4.2



### Temperatura óptima de crecimiento de las cepas de *D. catenulata*

Con el objetivo de determinar la temperatura óptima de crecimiento para posteriores ensayos, comparamos la cantidad de biomasa de las colonias y las clasificamos, de manera cualitativa en 4 grupos (Ver tabla No 5 y Figura 7).

Tras el análisis empírico, pudimos observar que las cepas no crecieron a

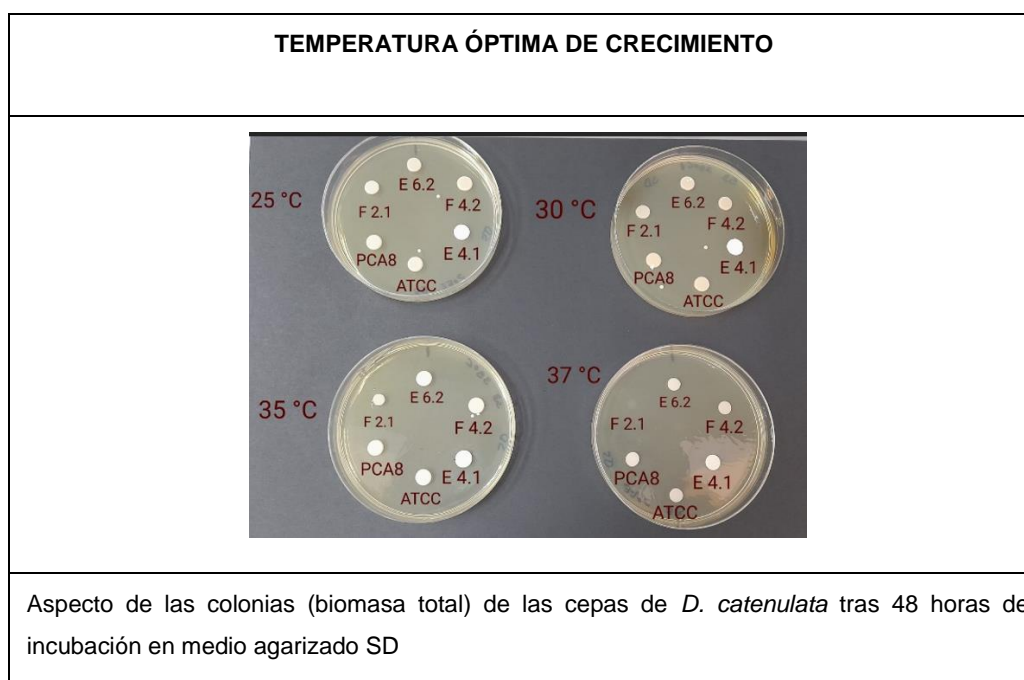
temperaturas iguales o mayores a 39°C. No obstante, todas presentaron una mayor cantidad de biomasa entre los 23 y 37°C.

Tabla No 5: Temperatura óptima de crecimiento de las cepas

CEPAS/ °T	23 °C	25°C	30°C	35°C	37°C	39°C
E 6.2	+++	++	+++	+++	++	-
F 2.1	++	+++	+++	+++	+	-
F 4.2	+++	++	+++	+++	+	-
PCA8	+++	+++	++++	++++	++	-
ATCC 90028 C. <i>albicans</i>	+++	+++	++++	++++	+	-

Por consiguiente, optamos por considerar a 30°C como temperatura óptima de crecimiento para los siguientes ensayos.

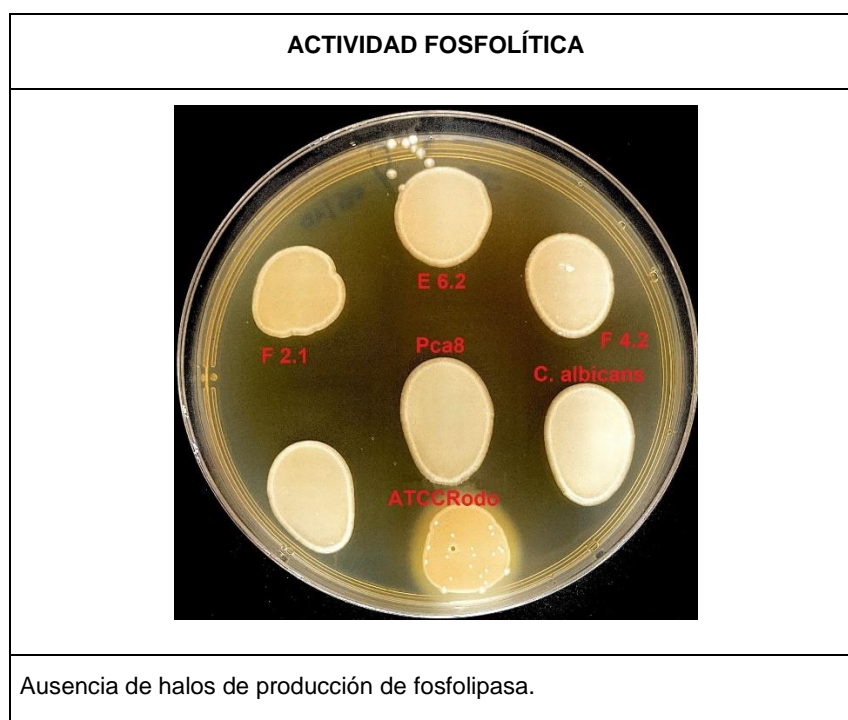
Figura 7: Estimación de la temperatura óptima de crecimiento de las diferentes cepas



### Actividad lipolítica.

Con el objetivo de determinar la presencia de enzimas con la capacidad de degradar fosfolípidos realizamos un ensayo de crecimiento en presencia de lecitina de huevo (fosfatidilcolina, un lípido abundante en la yema de huevo). Después de 72 horas de incubación, de las 4 cepas de *D. catenulata* inoculadas en Agar SD + Yema de huevo, ninguna de ellas produjo un halo de lipólisis. *C. albicans* y *S. aureus* tampoco presentaron este tipo de halos, el cual si se reveló en el caso de la cepa de *Rhodotorula glutinis* (Figura 8).

Figura 8: Actividad lipolítica



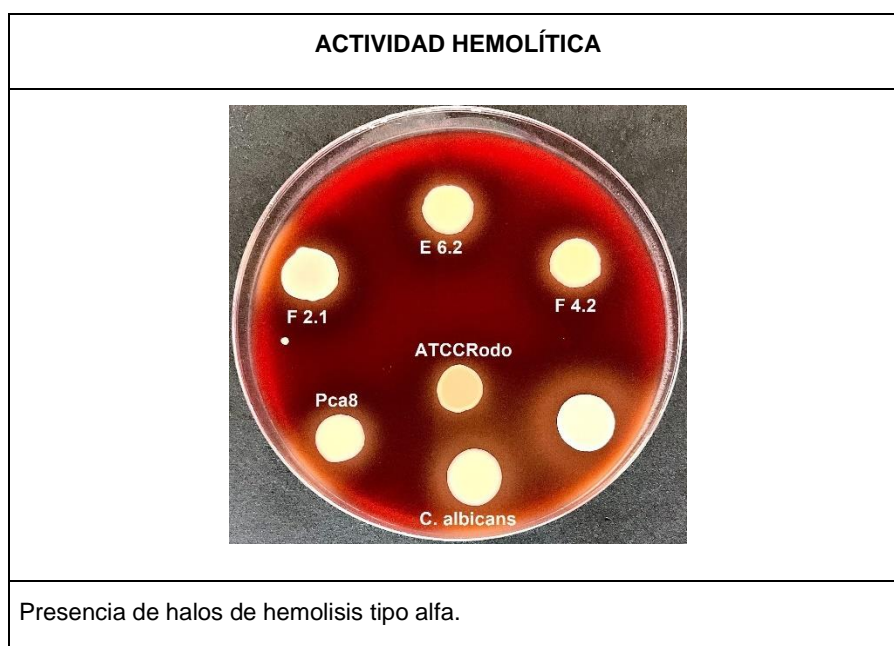
### Actividad hemolítica.

Para determinar la producción de hemolisinas, las cepas de *D. catenulata* se inocularon en un medio agarizado y suplementado con sangre de cordero. Una vez transcurridas 72 horas de incubación, evidenciamos que alrededor de las colonias de las cuatro cepas de *D. catenulata* se formaron halos de hemólisis tipo alfa. Por otra parte, las 3 cepas empleadas como controles positivos también produjeron hemolisinas de tipo alfa (Figura 9). Los valores de los diámetros de los halos de hemólisis se pueden ver en la tabla 6.

Tabla No 6: Actividad hemolítica

CEPAS	Diámetro colonia	Diámetro colonia+haloCon halo	TIPO DE HEMOLISIS	Hz
E 6.2	13mm	17,3 mm	Alfa	0,75
F 2.1	12 mm	17,4 mm	Alfa	0,68
F 4.2	9,1 mm	16,2 mm	Alfa	0,56
PCA8	11,3 mm	18,2 mm	Alfa	0,62
ATCC 90028 <i>Candida albicans</i>	10,2 mm	17,2 mm	Alfa	0,58
ATCC <i>Rhodotorula</i>	9,2 mm	14,2 mm	Alfa	0,64
ATCC <i>Staphylococcus aureus</i>	8,1	8,1	Alfa	1

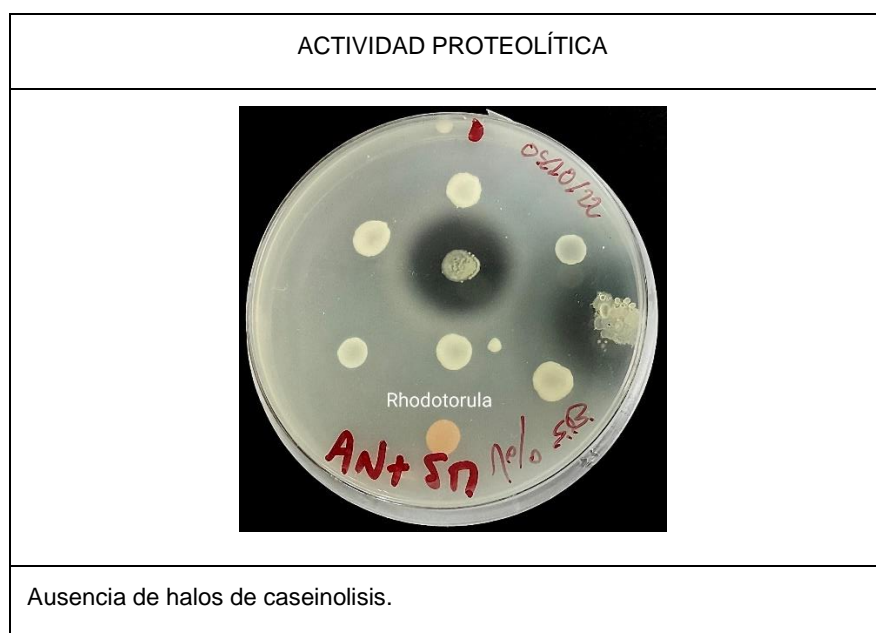
Figura 9: Actividad hemolítica



### Actividad proteolítica.

La valoración de la producción de enzimas proteolíticas se llevó a cabo mediante cultivo de las cepas de *D. catenulata* en medio agar leche. Concluidas 72 horas de incubación, observamos que ninguna de las cuatro cepas produjo un halo de caseinólisis. *R. glutinis* y *C. albicans* tampoco presentaron un halo. Por otra parte, y como era de esperarse, el control positivo (contaminante propio de la leche sin identificar) presentó un halo de caseinólisis cuyo diámetro alcanzó los 23 mm (Figura 10).

Figura 10: Actividad proteolítica



### Capacidad de penetración de sustrato semi-sólido.

Con el propósito de evidenciar la capacidad de las cuatro cepas de *D. catenulata* para penetrar activamente un medio semisólido como el agar SD, llevamos a cabo este ensayo *in vitro*. Al finalizar el periodo de incubación, y una vez eliminada la biomasa superficial, observamos que todas las cepas de fueron capaces de penetrar activamente el medio agarizado. Como puede verse en las Figuras 11 y 12, las cuatro cepas modificaron su patrón de crecimiento, penetrando hacia el interior del sustrato semi-sólido bajo la forma de hifas verdaderas, de varias decenas de células de longitud.

Pese a que no fue uno de nuestros objetivos, se logró determinar las longitudes de penetración al cabo de 5 días, a 30 °C. La cepa E 6.2 alcanzó los 562 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), la cepa F 4.2 957  $\mu\text{m}$ , la cepa PCA8 alcanzó 473  $\mu\text{m}$  y la F 2.1 411  $\mu\text{m}$ .

Figura 11: Capacidad de penetración de las cepas E 6.2, F 4.2, PCA8 y F 2.1 con aumento de 10X.

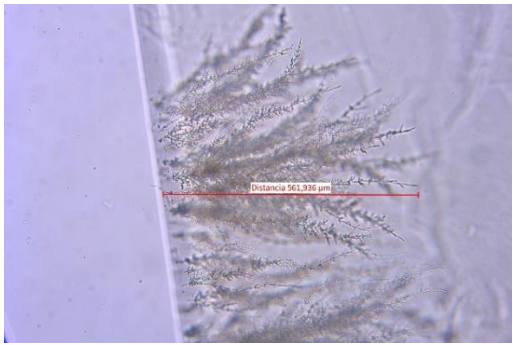

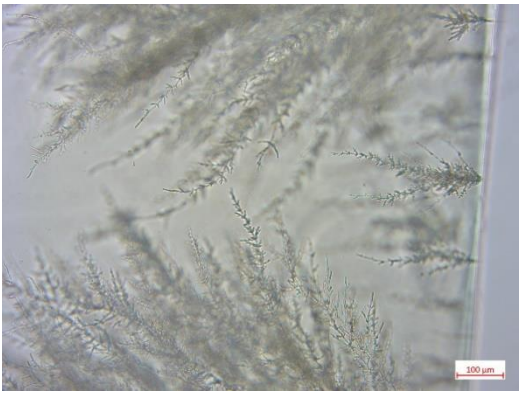
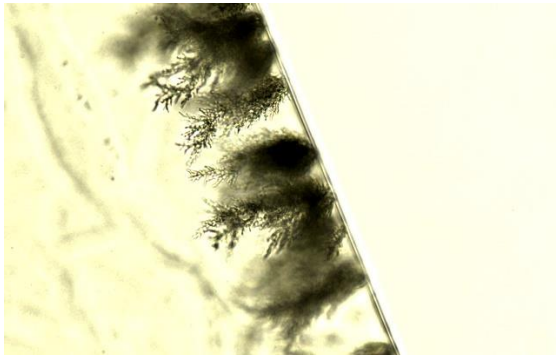
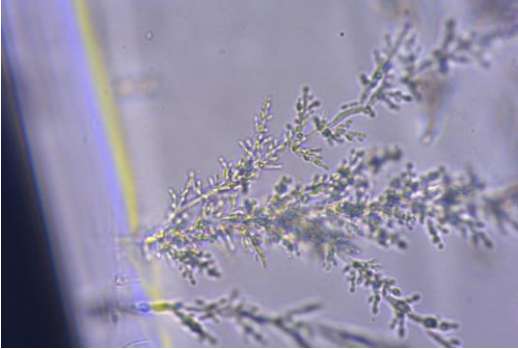
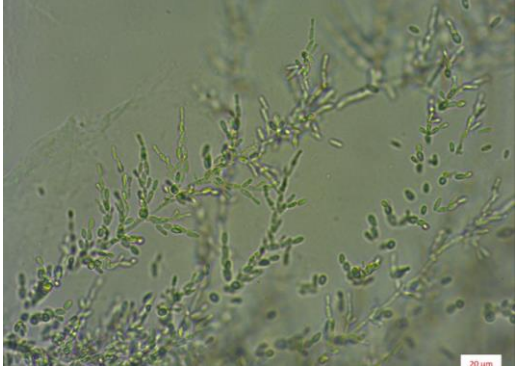
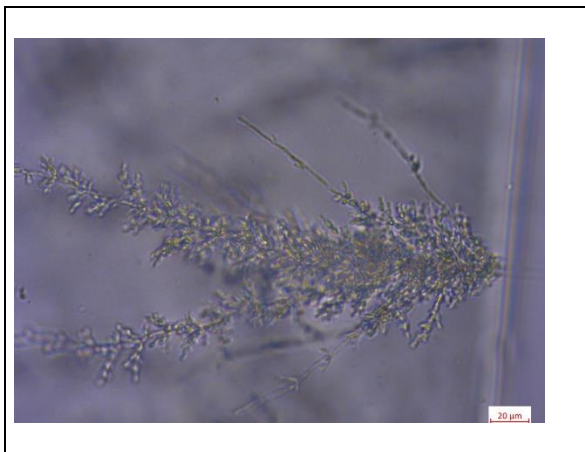
CAPACIDAD DE PENETRACIÓN CON AUMENTO DE 10X.	
	
Penetración cepa E 6.2	Penetración cepa F 4.2
	
Penetración cepa PCA8	Penetración cepa F 2.1

Figura 12: Capacidad de penetración de las cepas E 6.2, F 4.2 y PCA8 con aumento de 40X.

CAPACIDAD DE PENETRACIÓN CON AUMENTO DE 40X.	
	
Penetración cepa E 6.2	Penetración cepa F 4.2



Penetración cepa PCA8.

### Susceptibilidad antifúngica.

Con el objetivo de determinar la susceptibilidad antifúngica frente a cinco antimicóticos de relevancia clínica, llevamos a cabo el siguiente ensayo. Cabe mencionar que se incluyeron las CMI de *C. albicans* presentes en el Manual del CLSI para tener valores de referencia, ya que estos datos no existen para la especie *D. catenulata*.

Por otro lado, los resultados obtenidos nos permitieron determinar que las cepas PCA8, E 6.2 y F 4.2 presentaron valores de CMI idénticos para un mismo antimicótico, destacando los valores de aquellas cepas que obtuvieron un valor de 8 µg/mL como CMI para el fluconazol.

Por otra parte, la cepa F 2.1 presentó un valor menor de CMI para fluconazol (2 µg/mL), mientras que reflejó valores elevados de CMI para para caspofungina (2 µg/mL) y micafungina (1 µg/mL) con respecto a las CMI de *C. albicans*.

Los demás valores de CMI se presentan en la siguiente tabla:

Tabla No 7: Valores de CMI para Fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina y anfotericina B.

Cepa	CMI FLUCONAZOL	CMI VORICONAZOL	CMI CASPOFUNGINA	CMI MICA FUNGINA	CMI ANFOTERECINA B
PCA8	8µg/mL	< 0,12µg/mL	0,25 µg/mL	0,006 µg/mL	<0,5 µg/mL
E 6.2	8µg/mL	< 0,12µg/mL	0,25 µg/mL	0,006 µg/mL	<0,5 µg/mL

F 4.2	8 µg/mL	< 0,12 µg/mL	0,25 µg/mL	0,006 µg/mL	<0,5 µg/mL
F 2.1	2 µg/mL		1 µg/mL	2 µg/mL	
MIC referencia para <i>C. albicans</i> *	Sensible ≤ 2* Resistente ≥ 8*	Sensible ≤ 0,12* Resistente ≥1*	Sensible ≤ 0,25* Resistente ≥1*	Sensible ≤ 0,25* Resistente ≥1*	

Puntos de corte o CMI de *D.catenulata* y *C. albicans* para fluconazol, voriconazol, caspofungina y micafungina. Los cuadros de color verde indican CMI debajo de los valores de referencia; los cuadros rojos indican CMI elevadas según los valores de referencia.

Fuente: CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1 st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

### Identificación y filogenia molecular

Con el fin de confirmar la identificación molecular de las cuatro cepas y su ubicación filogenética, llevamos a cabo análisis de la secuencia nucleotídica de la región ITS. Los resultados se presentan en la Tabla No. 8.

Tabla No 8: Análisis de las secuencias nucleotídicas de la región ITS mediante BLAST.

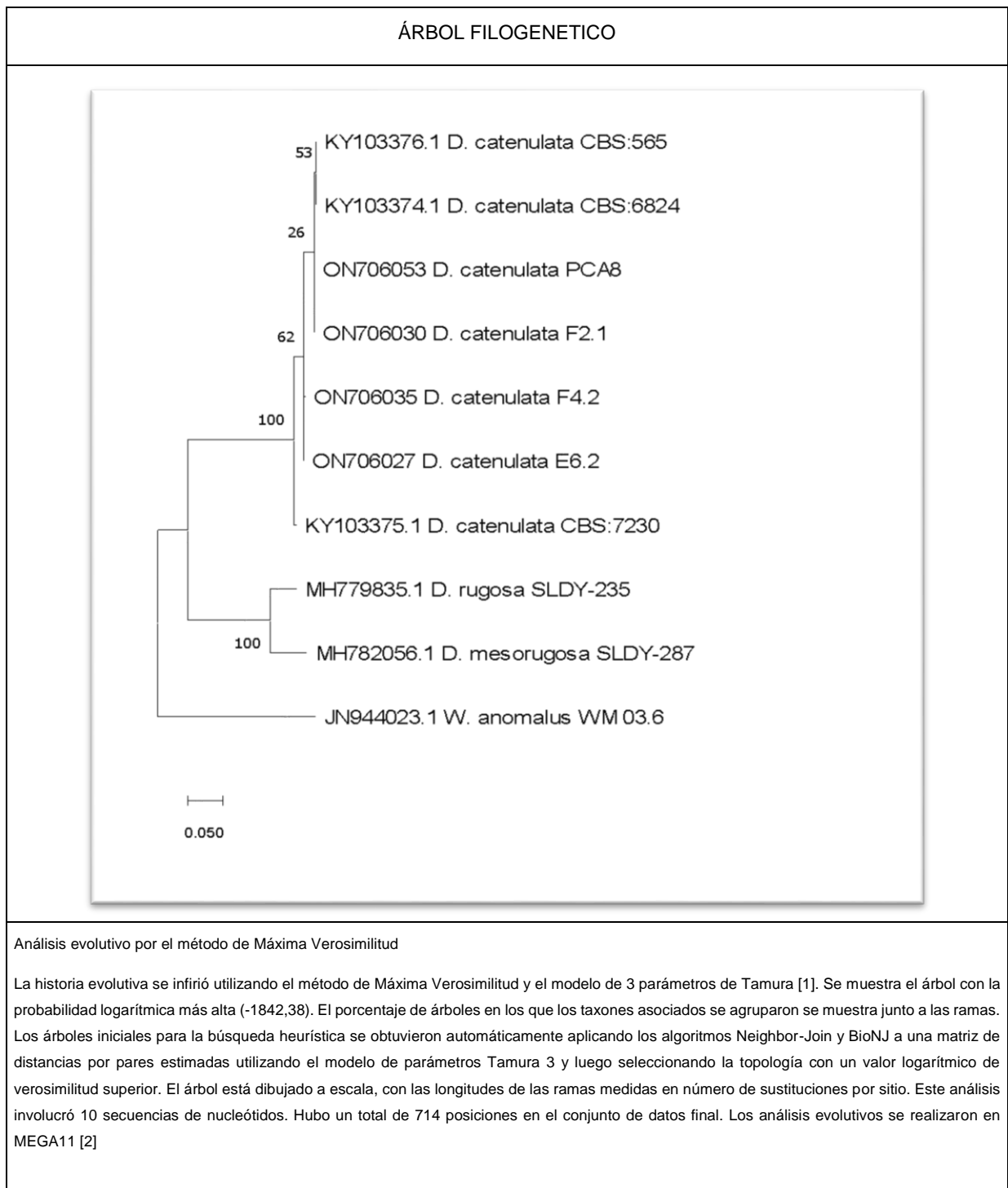
Cepas	% de identidad	Cobertura	Longitud (pares de bases, pb)	Cepa filogenéticamente más cercana
E6.2	99.48%	96%	428	<i>D. catenulata</i> CBS 565
F2.1	99.49%	96%	428	<i>D. catenulata</i> CBS 565
F4.2	99.48%	96%	428	<i>D. catenulata</i> CBS 565
PCA8	99.47%	100%	428	<i>D. catenulata</i> CBS 565

Se observa claramente que el porcentaje de identidad de las secuencias de las cuatro cepas incluidas en este estudio se aproxima al 99.5%, al compararlas con las de secuencias de cepas de *D. catenulata* disponibles en el GenBank. Esto permite ubicarlas como miembros de esta especie.

Por otra parte, los resultados del estudio filogenético mediante la plataforma MEGA 11, nos permitió generar el árbol filogenético que se presenta en la Figura 13. En el mismo se observa claramente que las cepas en estudio comparten el mismo clado con otras cepas, previamente identificadas, de *D. catenulata*. Se observa igualmente que están filogenéticamente cercanas con otras especies del mismo género como *D. rugosa* y *D. mesorugosa*. En contraposición, la relación evolutiva

de las cepas con *W. anomalus* (una especie perteneciente al género *Wickerhamomyces*) es más lejana.

Figura 13: Árbol filogenético



## Discusión.

El propósito de este trabajo de investigación era profundizar en relación con la expresión de ciertos factores de virulencia, en cepas de *D. catenulata* aisladas a partir de cuyes criados para consumo humano en la Provincia de Cañar. Los resultados obtenidos muestran que algunas de estas cepas expresan factores de virulencia (como la producción de hemolisinas y la capacidad de penetrar activamente sustratos semi-sólidos) que sugieren un potencial patogénico que no debe ser descuidado.

En relación con el primer aspecto, los resultados reflejaron la producción de enzimas con actividad hemolítica de tipo alfa en todas las cepas de *D. catenulata*. Esto es similar a los resultados previamente reportados por Rhimi *et al.*, en los que el 23% de 17 aislados de *D. catenulata* obtenidas de las cloacas, heces y huevos de gallinas presentó actividad hemolítica (8). Ese aspecto es importante, ya que la hemólisis de eritrocitos facilita la captación del hierro como nutriente para las levaduras, de tal manera que ayuda a su proliferación y diseminación por el torrente sanguíneo, pudiendo causar infecciones sistémicas en sus hospedadores (40).

Por ejemplo, *C. albicans*, un patógeno oportunista bien conocido, se caracteriza por producir hemólisis de tipo beta en pacientes con infecciones del tracto respiratorio y en otros con onicomycosis. Adicionalmente, la presencia de *D. catenulata* en sangre de seres humanos ya ha sido demostrada en un paciente con endocarditis, lo cual refuerza su caracterización como patógeno oportunista (40)(41).

De igual manera, logramos comprobar que todas las cepas fueron capaces de penetrar activamente medio agarizado, semi-sólido. En tal sentido, destaca la formación de verdaderas hifas, de una longitud considerable. A este fenómeno de variación de la morfología celular, se le conoce como cambios en el fenotipo o "phenotype switching". Se trata de una condición en la que una levadura es

capaz de responder de esta manera, mediante la inducción de cambios en la expresión de algunos genes, al recibir señales del entorno que la rodea (27). Esto conlleva a un dimorfismo celular, el cual se caracteriza por presentar cambios en la forma y la agrupación de sus células, de forma que una levadura puede pasar de producir células individuales, a pseudohifas o hifas verdaderas, lo cual se considera como un verdadero factor de virulencia(27).

En la bibliografía consultada no hemos logrado encontrar información que refleje la capacidad invasora de cepas de *D. catenulata* o de otras especies del mismo género. Por tal razón, este hallazgo tiene gran importancia. Se trata de un fenómeno que ha sido ampliamente descrito en una especie de levadura bien conocida por comportarse como un patógeno oportunista: *C. albicans*. Esta especie es capaz de cambiar su morfología como mecanismo de respuesta a factores exógenos para invadir tejidos o medios semi-sólidos como el agar. Así lo avalan los estudios de Ling Ke et. al y Naseem et al (42)(43).

En contraparte, no pudimos determinar que las cepas produzcan fosfolipasas y proteasas, resultados que difieren con los obtenidos por Rhami et. al y Khunnamwong et. al respectivamente (8)(32). Esto puede deberse a las variaciones genéticas que existen entre cepas de una misma especie y la expresión de ciertos genes inducidos por condiciones externas. Por ejemplo, de acuerdo al trabajo de Hafez et. al., la cepa QD16 de *D. catenulata* expresó una mayor actividad lipasa, una vez que fue tratada previamente con fluconazol (34). Además, en el mismo estudio de Rhimi et. al, algunos aislados provenientes de los huevos de gallinas, tampoco produjeron cantidades significativas de fosfolipasas (8). Por tanto, el entorno que rodea a las células y la presión selectiva que se ejerza sobre ellas, influye de cierta manera en la secreción de estas enzimas.

Por otro lado, los ensayos de susceptibilidad antifúngica evidenciaron valores altos de CMI para fluconazol con respecto a los valores de referencia establecidos para *C. albicans*. En base a este resultado, y tomando en cuenta las limitaciones de nuestro estudio y la ausencia de valores de referencia para cepas de la misma especie, podríamos suponer que las cepas PCA8, F 4.2 y E 6.2 son resistentes al fluconazol.

Por otra parte, determinamos valores de CMI elevados para caspofungina y micafungina por parte de la cepa F 2.1. una vez más, comparando con los valores de referencia para una cepa de *C. albicans*, podríamos presumir que esta cepa es resistente a dichos antifúngicos.

Como hemos dicho, la ausencia de valores de referencia impone grandes limitaciones a la hora de estimar susceptibilidad frente a compuestos antifúngicos. A pesar de ello, y al igual que hemos hecho en este trabajo, Rhimi et al, Sukol et al, Borman et al y Chen et al., han utilizado como base para sus análisis los puntos de corte preestablecidos para las especies del género *Candida*, en sus estudios con otros aislados de *D. catenulata*(8)(33)(35)(36).

Aislados de *D. catenulata* reportados en el artículo de Sokol et. al algunos fueron resistentes al fluconazol con valores de CMI de 16 µg/mL (35). Por otro lado, Cheng et. al y Rhimi et. al también reportaron aislados resistentes al mismo antifúngico con valores de CMI de 8 µg/mL (8)(35). Por lo tanto, si comparamos esos últimos valores con los resultados que obtuvimos con las cepas PCA8, E 6.2 y F 4.2 (CMI de 8 ug/mL), podemos notar que son similares. Por lo tanto, muy probablemente se trata de cepas resistentes. Para ilustrar de mejor manera esta comparación presentamos la Tabla No 9.

Tabla No: 9 Cuadro comparativo entre las CMI para fluconazol de las cepas PCA8, E 6.2 y F 4.2 frente a las CMI de Cheng, Rhimi y Sokol.

CMI para fluconazol en las cepas PCA8, E 6.2 y F 4.2.	CMI para fluconazol en los aislados de Chen et.al .	CMI para fluconazol en aislados de Rhimi et. al	CMI para fluconazol en aislados de Sokol et. al
8 µg/mL	8 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL

Valores obtenidos de: Rhimi W, Aneke CI, Annoscia G, Camarda A, Mosca A, Cantacessi C, et al. Virulence and in vitro antifungal susceptibility of *Candida albicans* and *Candida catenulata* from laying hens. *Int Microbiol.* 2021;24(1):57–63.; Chen XF, Zhang W, Fan X, Hou X, Liu XY, Huang JJ, et al. Antifungal Susceptibility Profiles and Resistance Mechanisms of Clinical *Diutina catenulata* Isolates With High MIC Values. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(October):1–8 y Sokół I, Tokarzewski S, Bobrek K, Gawel A et al. E-test determination of antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from turkeys. *J Vet Res.* 2020;64(4):517–21.

Por otro lado, Sokol et al en su estudio también determinó sensibilidad al voriconazol y anfotericina B en los aislados de *D.catenulata*. Los valores de MIC fueron de 0,19 µg/mL (voriconazol) y 1 µg/mL (anfotericina B) (35) (Tabla No 10). Por lo cual, si nuevamente comparamos estos valores con los resultados de las cepas PCA8, E 6.2 y F 4.2 (MIC de 0,12 µg/mL para voriconazol y 0,5 para anfotericina B), podemos presumir una muy posible sensibilidad a dichos antifúngicos.

Tabla 10: Cuadro comparativo de las CMI para voriconazol y anfotericina B entre las cepas PCA8, E 6.2 y F 4.2 frente a los valores de CMI de Sokol

MIC para voriconazol y anfotericina B en las cepas PCA8, E 6.2 y F 4.2.	MIC para voriconazol y anfotericina B en los aislados de Sokol.
0,12 µg/mL (voriconazol)	0,19 µg/mL (voriconazol)
0,5 µg/mL (anfotericina B)	1 µg/mL (voriconazol)

Valores obtenidos de: Sokół I, Tokarzewski S, Bobrek K, Gawel A et al. E-test determination of antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from turkeys. *J Vet Res.* 2020;64(4):517–21.

En cuanto a las relaciones evolutivas que se pueden presentar entre nuestras cepas con otras cepas de la misma especie, así como con cepas de especies diferentes, logramos aclarar algunos aspectos. En primer lugar, las secuencias nucleotídicas de la región ITS de las cuatro cepas de *D. catenulata* presentan un porcentaje de identidad de más del 99% con respecto a la misma secuencia de una cepa de *D. catenulata* aislada de un paciente con disentería en Puerto Rico (7). Además, la construcción del árbol filogenético nos permitió evidenciar que las cepas forman parte de un mismo clado, que descende de un ancestro común, y por lo tanto están estrechamente relacionadas. En conjunto, estos resultados coinciden en permitirnos afirmar que, efectivamente, se trata de cepas que pertenecen a esta especie.

Es importante dar a conocer algunas de las limitaciones de nuestro estudio.

En primer lugar, es necesario comentar que, para determinar con exactitud la patogenicidad de estas cepas, se requiere de ensayos *in vivo*. Sin embargo, desde un punto de vista ético, esto presenta serias dificultades. En segundo lugar, la estimación de la susceptibilidad frente a distintos antifúngicos se hubiese beneficiado de ensayos por duplicado o por triplicado. Esto no fue

posible, debido a limitaciones financieras. Finalmente, hubiese sido conveniente incluir un mayor número de cepas en el estudio, para tener una visión más amplia de la diversidad de las mismas en la región a partir de la cual se aislaron originalmente.

Sin embargo, queremos destacar que, en el presente proyecto, hemos combinado análisis de microbiología clásica con ensayos bioquímicos y moleculares para fortalecer y darle una mayor consistencia a nuestro estudio. Además, hemos incluido un ensayo de penetración de sustratos semi-sólidos que no había sido incluido en estudios similares publicados con anterioridad. Por lo que, con los datos que hemos obtenido podemos presumir que las cepas estudiadas tienen características que sugieren una potencial patogenicidad que las hace virulentas.

En síntesis, en el que es el primer estudio en su tipo, hemos puesto en evidencia la expresión de, al menos, dos factores de virulencia en cepas de *D. catenulata* aisladas a partir de la fosa nasal de cuyes criados para consumo humano. Estos resultados sugieren que dichas cepas (y otras similares) podrían representar un riesgo importante para todas aquellas personas que se entran en contacto de manera frecuente con estos animales: criadores, transportistas, comerciantes y consumidores. Por esta razón es necesario profundizar aún más en su estudio para aclarar esta situación.

**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### IV.1.- CONCLUSIONES

- Las cuatro cepas de *D. catenulata* incluidas en este estudio producen hemolisinas de tipo alfa y son capaces de penetrar activamente sustratos semi-sólidos
- Estas cepas manifiestan un marcado dimorfismo, alternando entre células individuales (levaduras) y largos filamentos (hifas), al momento de penetrar en el sustrato.
- Las elevadas concentraciones inhibitorias mínimas frente al fluconazol, indican que las cepas de *D. catenulata* podrían ser resistentes a este compuesto antifúngico.
- Las cuatro cepas forman parte de un clado monofilético, en el que también está presente una cepa clínica de la misma especie, aislada a partir de un paciente.

## IV.2.- RECOMENDACIONES

- Sugerimos realizar estudios de cinética y velocidad de penetración de sustrato semi-sólido con estas cepas de *D. catenulata*.
- Recomendamos ampliar los parámetros de caracterización para cepas de *D. catenulata*, es decir incluir más pruebas enzimáticas.
- Recomendamos realizar un estudio donde se evidencien la presencia de genes de resistencia en el genoma de las cepas de *D. catenulata*.
- Sugerimos informar y concientizar a los trabajadores del sector, acerca del posible rol de los cuyes como reservorio de microorganismos potencialmente patógenos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Palomo J, Balbín J, Parra J, et al. Enfermedades Aspectos generales y específicos de las infecciones . Criterios enfermedad infecciosa . Pruebas Criterios de indicación. *Medicine (Baltimore)*. 2010;10(49):3251–64.
2. Organización Mundial de la Salud. Prevenir próximas pandemias. Zoonosis: cómo romper la cadena de transmisión. *Fronteras del PNUMA*. 2020. Accessed April 8 2022 <https://reliefweb.int/report/world/prevenir-la-pr-xima-pandemia-zoonosis-y-c-mo-romper-la-cadena-de-transmisi-n>
3. Galvis-acosta D, Aycardi-morinelly MP, Contreras-martínez OI et al. Prevalencia de infecciones fúngicas en centros hospitalarios de Montería-Cordova, Colombia *Introducción*. 2020;1–13.
4. Chen IL, Chiu NC, Chi H, Hsu CH, Chang JH, Huang DTN, et al. Changing of bloodstream infections in a medical center neonatal intensive care unit. *J Microbiol Immunol Infect* 2017;50(4):514–20.
5. Zurabián R, Hernández Hernández F et al. Esporotricosis: la micosis más frecuente en México. *Rev la Fac Med*. 2019;62(5):48–55.
6. Rosa D, Reynaldi F, Reinoso E et al. Importancia de la confirmación diagnóstica en el laboratorio de las dermatofitosis en caninos. *InVet*. 2020;22(2):1–11.
7. Boden S, Morio F, Zhou M, Ende BG van den, Hagen F et al. De novo Nanopore Genome Sequencing of the Clinical *Diutina catenulata* Type-strain CBS565. 2022;0123456789:3–6.
8. Rhimi W, Aneke CI, Annoscia G, Camarda A, Mosca A, Cantacessi C, et al. Virulence and in vitro antifungal susceptibility of *Candida albicans* and *Candida catenulata* from laying hens. *Int Microbiol*. 2021;24(1):57–63.
9. Rahman MT, Sobur MA, Islam MS, Levy S, Hossain MJ, Zowalaty MEE, et al. Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control. *Microorganisms*. 2020;8(9):1–34.
10. McArthur DB et al. *Emerging Infectious Diseases*. 2020;(January):1–16.
11. Radosavljevic M, Koenig H, Letscher-Bru V, Waller J, Maloisel F, Lioure B, et al. *Candida catenulata* fungemia in a cancer patient. *J Clin Microbiol*.

- 1999;37(2):475–7.
12. Ming C, Huang J, Wang Y, Lv Q, Zhou B, Liu T, et al. Revision of the medically relevant species of the yeast genus *Diutina*. *Med Mycol*. 2019;57(2):226–33.
  13. Santin R, Souza Mattei A, Bressan Waller S, Martins Madrid I, Cleff MB, Orzechowski Xavier M, et al. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. *Brazilian J Microbiol*. 2013;44(1):139–43.
  14. Han JI, Lee CM, Kim T, Lee I, Choi SY, Park HM et al. Pulmonary candidiasis in a dog receiving long-term management for atopic dermatitis. *J Vet Clin*. 2015;32(3):259–62.
  15. Nawange SR, Singh K, Naidu J, Singh SM et al. Naturally acquired systemic dual infection caused by *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) and *Candida catenulata* in albino rats bred for sale in the market at Jabalpur (Madhya Pradesh), India. *Mycoses*. 2010;53(2):173–5.
  16. Da Costa GM, Da Silva N, Rosa CA, De Figueiredo HCP, Pereira UDP et al. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cienc Rural*. 2008;38(7):1938–42.
  17. Ha M V., Choy MS, McCoy D, Fernandez N, Suh JS et al. *Candida catenulata* Candidaemia and Possible Endocarditis in a Cirrhotic Patient Successfully De-escalated to Oral Fluconazole. *J Clin Pharm Ther*. 2018;43(6):910–3.
  18. Zona D, Santiago M, Vanessa K, Pazmiño B, Empresas CDA De, De UA, et al. JEFATURA DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN Título del Proyecto Director del Proyecto : Colaboradores del Proyecto Código de Proyecto : PICCOVID-19-25 PICCOVID-19-25 Cuenca , agosto de. 2021;
  19. Castro Muñoz E, Narváez Jiménez PX, Ortega Ojeda CA et al. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LEVADURA DE CERVEZA (*Saccharomyces cerevisiae*) Y PROMOTORES EN LA GESTACIÓN Y RECRÍA DE CUYES (*Cavia porcellus*). *La Granja*. 2016;25(1):45.
  20. Glushakova AM, Rodionova EN, Kachalkin A V et al. Yeasts in Feces of Pigeons (*Columba livia*) in the City of Moscow. *Curr Microbiol*. 2021;78(1):238–43.

21. Sokół I, Gawel A, Bobrek K et al. The Prevalence of Yeast and Characteristics of the Isolates from the Digestive Tract of Clinically Healthy Turkeys. *Avian Dis.* 2018;62(3):286–90.
22. Pulido-Villamarín A, Damme-Pedraza Bact S, Castañeda-Salazar R, Linares-Linares M, Barbosa-Buitrago A et al. Identificación de la Microbiota Levaduriforme en Canal Auditivo de Porcinos con y sin Secreción Ótica. *Rev Investig Vet del Perú.* 2017;28(3):687.
23. Ulloa M, Lappe P, Aguilar S, Park H, Pérez-Mejía A, Toriello C, et al. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: An integrative study in Guerrero, Mexico. *Rev Mex Biodivers.* 2006;77(2):153–68.
24. Sánchez A, Contreras A, Corrales JC, de la Fe C et al. In the beginning it was zoonosis: One Health to combat this and future pandemics. *SESPAS Report 2022. Gac Sanit.* 2022;36(January):S61–7.
25. Solórzano P et al. Las infecciones bacterianas y su resistencia a antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmont Solca”, Portoviejo. *Univ y Soc.* 2018;10(5):219–23.
26. Ramos BOE et al. Prevalencia De Las Micosis En Los Miembros Superiores E Inferiores De Las Personas Que Residen En La Parroquia Rural De Pinguilí Santo Domingo Del Cantón Mocha. 2020;69.
27. Palková Z, Váchová L et al. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;57:110–9.
28. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Accessed April 8, 2022: [https://reliefweb.int/report/world/who-releases-first-ever-list-health-threatening-fungi?gclid=Cj0KCQjwocShBhCOARIsAFVYq0j9p1YP9FstrR9mnDV5Y1VCE87hDN5QGPQHD-KjxGPE17UdHplZUeMaAkcKEALw\\_wcB](https://reliefweb.int/report/world/who-releases-first-ever-list-health-threatening-fungi?gclid=Cj0KCQjwocShBhCOARIsAFVYq0j9p1YP9FstrR9mnDV5Y1VCE87hDN5QGPQHD-KjxGPE17UdHplZUeMaAkcKEALw_wcB)
29. Farmakiotis D, Kontoyiannis DP et al. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. *Int J Antimicrob Agents.*

- 2017;50(3):318–24.
30. Mendoza<sup>1</sup> M et al. Importancia de la identificación de levaduras. Rev la Soc Venez Microbiol 2005;25(1):15–23.
  31. O'Brien CE, McCarthy CGP, Walshe AE, Shaw DR, Sumski DA, Krassowski T, et al. Genome analysis of the yeast *Diutina catenulata*, a member of the Debaryomycetaceae/Metschnikowiaceae (CTG-Ser) clade. PLoS One. 2018;13(6):1–12.
  32. Khunnamwong P, Lertwattanasakul N, Jindamorakot S, Limtong S, Lachance MA et al. Description of *diutina* gen. nov. *diutina siamensis*, f.a. Sp. Nov and reassignment of *Candida catenulata*, *Candida mesorugosa*, *Candida neorugosa*, *Candida pseudorugosa*, *Candida ranongensis*, *Candida rugosa* and *Candida scorzettiae* to the genus *diutina*. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(12):4701–9.
  33. Chen XF, Zhang W, Fan X, Hou X, Liu XY, Huang JJ, et al. Antifungal Susceptibility Profiles and Resistance Mechanisms of Clinical *Diutina catenulata* Isolates With High MIC Values. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11(October):1–8.
  34. Hafez RM, Abdel-rahman TMA, Abed NN, Mostafa EE, Atef A et al. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE VIRULENT FACTOR LIPASE EXTRACTED FROM *CANDIDA CATENULATA*. 2020;20(2):7069–79.
  35. Sokół I, Tokarzewski S, Bobrek K, Gawel A et al. E-test determination of antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from turkeys. J Vet Res. 2020;64(4):517–21.
  36. Borman AM, Muller J, Walsh-Quantick J, Szekely A, Patterson Z, Palmer MD, et al. MIC distributions for amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole, flucytosine and anidulafungin and 35 uncommon pathogenic yeast species from the UK determined using the CLSI broth microdilution method. J Antimicrob Chemother. 2020;75(5):1194–205.
  37. Ellepola ANB, Samaranayake LP, Khan ZU et al. Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers,

- diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene, echinocandin and azole antimycotics. *Brazilian J Microbiol.* 2016;47(4):911–6.
38. Merchán A V., Ruiz-Moyano S, Vázquez Hernández M, Benito MJ, Aranda E, Rodríguez A, et al. Characterization of autochthonal yeasts isolated from Spanish soft raw ewe milk protected designation of origin cheeses for technological application. *J Dairy Sci.* 2022;105(4):2931–47.
  39. Cullen PJ, Sprague GF et al. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13619–24.
  40. Mohammadi F, Ghasemi Z, Familsatarian B, Salehi E, Sharifynia S, Barikani A, et al. Relationship between antifungal susceptibility profile and virulence factors in *Candida albicans* isolated from nail specimens. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53(May 2019):1–7..
  41. Danis Vijay D, Jayanthi S, Meenakshi N, Meharaj SHS, Sujhithra A, Perumal J. Characterization of virulence factors, antifungal resistance with ERG-11 gene among *Candida* species isolated from pulmonary samples. *Microb Pathog.* 2019;137(August)..
  42. Ke CL, Liao YT, Lin CH et al. MSS2 maintains mitochondrial function and is required for chitosan resistance, invasive growth, biofilm formation and virulence in *Candida albicans*. *Virulence.* 2021;12(1):281–97.
  43. Naseem S, Douglas L, Konopka J et al. *Candida albicans* Agar Invasion Assays. *Bio-Protocol.* 2020;10(16):1–13.

**GLOSARIO.**

CIM: Concentración Mínima Inhibitoria.

OMS: Organización mundial de la salud.

SD: Sabouraud Dextrosa.

PDA: Agar papa dextrosa

**ANEXOS**

## DOCUMENTO ANTIPLAGIO.



Tesis Barrezueta -  
Carreño (1).pdf

## FORMATO PDF DE LA TRADUCCIÓN FIRMADA Y SELLADA DEL CENTRO DE IDIOMAS



23-570  
BARREZUETA VASQL

## RESUMEN.









RESUMEN OURS 2.0 PORTADA CD.docx  
.docx

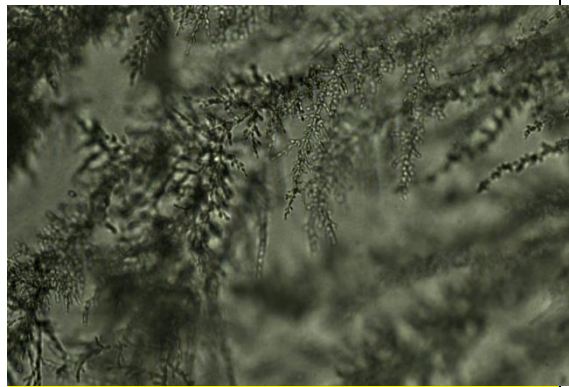
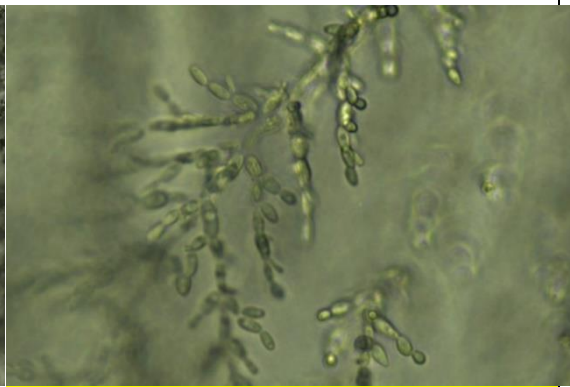
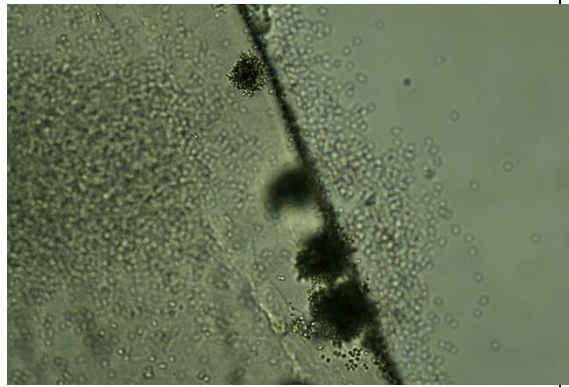
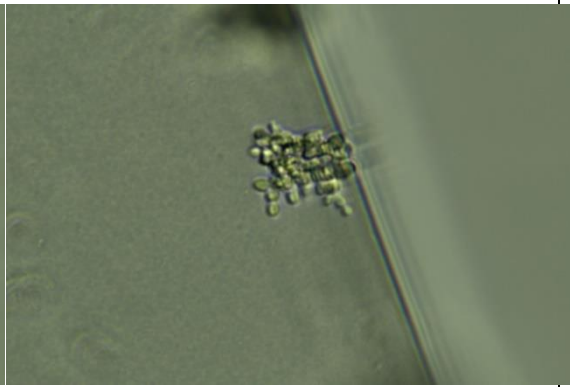
## ILUSTRACIONES.

*Análisis morfológico.*

PDA	SD
	
E 6.2	

	
F 2.1	F 2.1
	
F 4.2	F 4.2
	
PCA8	PCA8

Capacidad de penetración de los controles.

	
<i>C. albicans</i> 10 x	<i>C. albicans</i> 40x
	
<i>R. glutinis</i> 4 x	<i>R. glutinis</i> 40x

**Secuencias nucleotídicas de la región ITS usadas para la construcción del árbol filogenético.**

>ON706027 *D. catenulata* E6.2

TCTTGGTTCAATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA  
 ACCTGCGGAAGGATCATAAAAACTAATTTACACGCGATTTAAAATTGCTTA  
 CTTCAATAACCTATTAACAATCAACCAACTAATACCAAAAACTTCCAACAA  
 CGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG  
 TAATATGAATTGCAGATTTTGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG  
 CCCGTGGGTATTCCCGCGGGCATGCGTGTGTGAGCGGTTATCTCCCTCGC  
 AGGTAATGGACATACGGCGTCAGCTGTTCCCTCCAAAAAGTGATTGGTGTG  
 GTATTACAGTTTACTCACAACCATACTTTCCCTCACACAC

>ON706030 *D. catenulata* F2.1

TTCTTGGTTTAAATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT  
GAACCTGCGGAAGGATCATAAAAACTAATTTACACGCGATTTAAAATTGC  
T TACTTCAATAACCTATTAACAATCAACCAACTAATACCAAAAACTTCCAA  
CAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT  
ACGTAATATGAATTGCAGATTTTGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCGTGGGTATTCCCGCGGGCATGCGTGTGTGAGCGGTTATCTCCC  
TCGCAGGTAATGGACATACGGCGTCAGCTGTTCCCTCCAAAAAGTGATTGG  
TG TAGTATTACAGTTTACTCACAACCATACTTTCCCTCACACACGTAAGA

>ON706035 *D. catenulata* F4.2

TTGGTCCAATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC  
CTGCGGAAGGATCATAAAAACTAATTTACACGCGATTTAAAATTGCTTACT  
TCAATAACCTATTAACAATCAACCAACTAATACCAAAAACTTCCAACAACG  
GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAA  
TATGAATTGCAGATTTTGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC  
CGTGGGTATTCCCGCGGGCATGCGTGTGTGAGCGGTTATCTCCCTCGCAG  
GTAATGGACATACGGCGTCAGCTGTTCCCTCCAAAAAGTGATTGGTGTAGTA  
TTACAGTTTACTCACAACCATACTTTCCCTCACACACGTA

>ON706053 *D. catenulata* PCA8

TAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATAAAA  
AACTAATTTACACGCGATTTAAAATTGCTTACTTCAATAACCTATTAACAAT  
CAACCAACTAATACCAAAAACTTCCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT  
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATTTTGT  
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTGGGTATTCCCGCGGG  
CATGCGTGTGTGAGCGGTTATCTCCCTCGCAGGTAATGGACATACGGCGT  
CAGCTGTTCCCTCCAAAAAGTGATTGGTGTAGTATTACAGTTTACTCACAAC  
CATACTTTCCCTCAC

>KY103376.1 *D. catenulata* CBS:565

TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT  
CATAAAAACTAATTTACAC

GCGATTTAAAATTGCTTACTTCAATAACCTATTAACAATCAACCAACTAATA  
CCAAAACTTCCAACAA

CGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG  
TAATATGAATTGCAGATTTT

GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTGGGTATTCCCGCG  
GGCATGCGTGTGTGAGCGGT

TATCTCCCTCGCAGGTAATGGACATACGGCGTCAGCTGTTCCCTCCAAAAG  
TGATTGGTGTAGTATTACA

GTTTACTCACAACCATACTTTTTCCCTCACACACGTAAGACTACCCGCTGA  
ACTTAAGCATATCATAA

>KY103375.1 *D. catenulata* CBS:7230

TGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGA  
GGTATCGGGACCGACCAGA

AGGGGTGACCTTTCGGGTTGGAAACCTTATCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
AGTAAAAGTCGTAACAAGG

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATAAAAACTAATTTACACGCGA  
TTTAAAATTGCTTACTTCA

ATAACCTATTAACAATCAACCAACTAATACCAAAAACTTCCAACAACGGAT  
CTCTTGGTTCTCGCATCG

ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATTTTGTGA  
ATCATCGAATCTTTGAACG

CACATTGCGCCCGTGGGTATTCCCGCGGGCATGCGTGTGTGAGCGGTTAT  
CTCCCTCGCAGGTAATGGAC

ATACGGCGTCAGCTGTTCCCTCCAAAAGTGATTGGTGTAGTATTACAGTTT  
ACTCACAACCATACTTTTT

CCCTCACACACGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

>KY103374.1 *D. catenulata* CBS:6824

TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATAAAAACTAA  
TTTACACGCGATTTAAAAT

TGCTTACTTCAATAACCTATTAACAATCAACCAACTAATACCAAAAACTTC  
CAACAACGGATCTCTTGG

TTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGC  
AGATTTTGTGAATCATCGA

ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTGGGTATTCCCGCGGGCATGCGTG  
TGAGCGGTTATCTCCCTCGC

AGGTAATGGACATACGGCGTCAGCTGTTCTCCAAAAAGTGATTGGTGTA  
GTATTACAGTTTACTCACAA

CCATACTTTTTCCCTCACACACGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAT  
CAT

>MH779835.1 *D. rugosa* SLDY-235

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAACAACAAT  
ACAACCTTGTGTCTGAACA

ATAACTTCAAGTACCGATCATCAAATTGTTAAAACAAAACCTTTCAACAACGG  
ATCTCTAGGTTTTCGCAT

CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTACGAAACGCAAGTCGTG  
AATCATCGAATCTTTGAACG

CACATTGCGCTGTGTGGCATTCCGCACAGCATGCCTGTTTGAGCAATATTT  
CTCTCGCAAGGTGTTGG

GCACCACGCCGGCAGGCGTCTGCCCGAAACGCGACCGTCTAAAACAGTT  
AAGCTTGTTACAGGACTCACG

ATCTTATTCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCT

>MH782056.1 *D. mesorugosa* SLDY-287

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAACACTGTT  
TAACACTGTGTCTGAGCAC

GATACACGCAAACCGATCATCAACACGCTAAACAAAACCTTTCAACAACGGA  
TCTCTAGGTTCTCGCATCG

ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTACGAAACGCAAGTCGTGAA  
TCATCGAATCTTTGAACGCA

CATTGCGCTTGCGGCATTCCGCACAGCATGCCTGTTTGAGCAATATTTCTC  
TCTCGCAAGGTGTTGGGC

ACCACGCCGGCAGGCGTCTGTCCGAAACGCAGCCGTCCAAAACAGTTAAG  
CTTGTTACGGACCCTTTGAC

GTTATTCTCAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>JN944023.1 *W. anomalus* WM 03.6

AAGGATCATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGGCGATAAAC  
CTTACACACATTGTCTAGT

TTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCT  
AAACACATTTTTTTAATGT

TAAAACCCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTAAAATCTTC  
AAAACCTTCAACAACGG

ATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATT  
GTGAATTGCAGATTTTCGT

GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGT  
ATGCCTGTTTGAGCGTCAT

TTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTT  
AACTTGAAATATTGACTTA

GCAAGAGTGTAATAAGCAGTCTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCC  
AACTCGTTATATCAGCTA

GGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTACAACAATAAACTAAAAGTTT  
GACCTAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTA

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

Nosotros, **Barrezueta Vásquez Juan Sebastián y Carreño Parra Rómulo Adrián** portadores de la cédula de ciudadanía N° **0106849904 y 1400617468**.

En calidad de autores y titulares de los derechos patrimoniales del proyecto de titulación “**Caracterización de la virulencia y resistencia antimicrobiana de cepas de *Diutina catenulata* que circulan entre cuyes (*Cavia porcellus*) criados para consumo en la provincia del 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, 31 de mayo del 2023.



Barrezueta Vásquez Juan Sebastián

C.I. 0106849904



Carreño Parra Rómulo Adrián

C.I. 1400617468