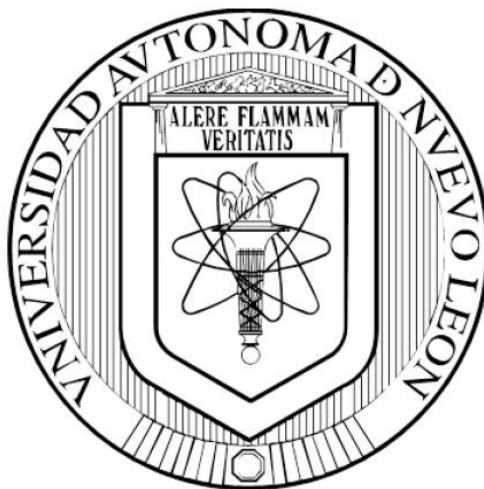


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SERTRALINA EN  
MONOTERAPIA Y TERAPIA COMBINADA EN UN MODELO MURINO  
INMUNOCOMPROMETIDO DE CANDIDEMIA POR *Candida auris***

**POR**

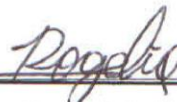
**BIOL. SERGIO ARMANDO ALANÍS RÍOS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**AGOSTO, 2023**

**“EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SERTRALINA EN  
MONOTERAPIA Y TERAPIA COMBINADA EN UN MODELO MURINO  
INMUNOCOMPROMETIDO DE CANDIDEMIA POR *Candida auris*”**

Aprobación de la Tesis:



---

**Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel**

Director



---

**Dr. C. Gloria María González González**

Co-director



---

**Dr. C. Miguel Ángel Becerril García**

Miembro de la comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

Subdirector de Estudios de Posgrado

**“EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SERTRALINA EN  
MONOTERAPIA Y TERAPIA COMBINADA EN UN MODELO MURINO  
INMUNOCOMPROMETIDO DE CANDIDEMIA POR *Candida auris*”**

Presentado por: Biól. Sergio Armando Alanís Ríos

Este trabajo contó con la aprobación del Comité de Ética y Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.) con el número de registro: MB22-00001. La ejecución experimental tuvo lugar en el Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, así como en el Laboratorio de Microbiología Experimental, ambos pertenecientes al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. El trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel y la co-dirección de la Dr. C. Gloria María González González.



---

**Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel**

Director de Tesis

*“Quizá solo hay un camino oscuro delante de ti, pero aun así debes creer y seguir adelante. Cree en que las estrellas iluminarán tu camino, aunque sea sólo un poco”*

**Kaori Miyazono, Your Lie In April**

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi cariño a todas las personas que aprecio en la vida. A mi familia por su apoyo incondicional, y a mis amigos por acompañarme en las buenas y en las malas. Gracias a todos por confiar en mí, incluso en los momentos donde yo había dejado de hacerlo. *Atra esterní ono thelduin, mor'ranr lífa unin hjarta onr un du evarínya ono varda*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco al CONACyT por el apoyo otorgado durante este proceso de mi formación académica.

A mi familia, por su apoyo incondicional y amor, así como la enorme paciencia que me tienen. A mis amigos, por su compañía, sus consejos, y su apoyo ante las adversidades.

A mi comisión de tesis: El Dr. Rogelio de Jesús Treviño por creer en mí y confiarme la línea de investigación, así como su apoyo durante todo el proyecto, a la Dra. Gloria González y al Dr. Miguel Becerril por sus enseñanzas y sus consejos a lo largo de esta maestría.

A los profesores del Departamento de Microbiología, por sus enseñanzas en esta disciplina, que sin duda me ayudarán a ser un mejor profesionalista.

A mis compañeros de posgrado, por prestarme sus oídos cuando se presentaba algún contratiempo. Siempre es refrescante escuchar una perspectiva externa para tratar de resolver las adversidades que se presenten. Asimismo, gracias por tantos recuerdos que atesoraré sin duda para siempre.

Finalmente, quiero agradecer de manera simbólica a todos los animales de laboratorio que fueron utilizados durante el proyecto. Este trabajo no hubiera sido posible sin ellos, muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes históricos	1
1.2. Características microbiológicas de <i>C. auris</i>	4
1.2.1 Filogenia	4
1.2.2 Características microbiológicas	6
1.3. Aspectos clínicos de la infección por <i>C. auris</i>	10
1.4. Resistencia a antifúngicos	11
1.5. Estrategias terapéuticas novedosas para las infecciones ocasionadas por <i>C. auris</i>	13
1.5.1. Terapia combinada	13
1.5.2. Re-propósito de fármacos	15
1.6. Modelos experimentales de infección por <i>C. auris</i>	20
1.6.1. <i>Galleria mellonella</i>	20
1.6.2. <i>Drosophila melanogaster</i> deficiente de Toll	21
1.6.3. Modelo murino inmunocomprometido	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.1. Estrategia experimental	26
5.2. Aislamientos de <i>C. auris</i>	26
5.3. Fármacos utilizados	27

<b>5.4. Susceptibilidad antifúngica</b>	27
5.4.1. <i>Ensayo de microdilución en caldo</i>	27
5.4.2. <i>Susceptibilidad en combinación: Modelo de tablero de damas</i>	28
<b>5.5. Modelo animal</b>	29
5.5.1. <i>Declaración de ética</i>	29
5.5.2. <i>Animales de laboratorio</i>	29
5.5.3. <i>Inmunosupresión</i>	29
5.5.4. <i>Preparación del inóculo</i>	30
5.5.5. <i>Infección y determinación de CF</i>	30
5.5.6. <i>Supervivencia animal</i>	31
5.5.7. <i>Análisis estadístico</i>	31
<b>6. RESULTADOS</b>	32
<b>6.1. Determinación de la susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i> de la SRT, MFG y VCZ solos y en combinación contra <i>C. auris</i></b>	32
<b>6.2. Evaluación de la actividad antifúngica de la SRT en monoterapia en un modelo murino inmunosuprimido de candidemia por <i>C. auris</i></b>	37
<b>6.3. Evaluación de la actividad antifúngica de la SRT en combinación con VRC en un modelo murino inmunosuprimido de candidemia por <i>C. auris</i></b>	44
<b>7. DISCUSIÓN</b>	47
<b>8. CONCLUSIONES</b>	52
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	53
<b>10. REFERENCIAS</b>	54



## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Casos de identificación errónea de <i>C. auris</i>	7
<b>Tabla 2.</b> Ensayos moleculares para la identificación de <i>C. auris</i>	9
<b>Tabla 3.</b> Cepas de <i>C. auris</i> resistentes a antifúngicos de uso clínico provenientes de 3 clados.	12
<b>Tabla 4.</b> Combinaciones de antifúngicos probadas in vitro contra <i>C. auris</i>	14
<b>Tabla 5.</b> Fármacos de re-propósito con actividad antimicrobiana en diferentes fases de estudio	17
<b>Tabla 6.</b> Reportes del efecto antifúngico de la sertralina contra diferentes patógenos fúngicos	19
<b>Tabla 7.</b> Interacción de la combinación de SRT + MFG.	34
<b>Tabla 8.</b> Interacción de la combinación de SRT + VRC.	35
<b>Tabla 9.</b> Interacción de la combinación de VRC + MFG.	36
<b>Tabla 10.</b> Reducción de CF con las dosis de SRT probadas	38
<b>Tabla 11.</b> Resultados obtenidos con las dosis analizadas de VRC en monoterapia.	41
<b>Tabla 12.</b> Reducción logarítmica de carga fúngica tisular promedio de los tratamientos.	44
<b>Tabla 13.</b> Reducción logarítmica de carga fúngica tisular promedio de los tratamientos en monoterapia y terapia combinada	45

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Línea de tiempo con acontecimientos importantes en la emergencia de <i>C. auris</i> alrededor del mundo.	3
<b>Figura 2.</b> Clados genéticos descritos de <i>C. auris</i> y su relación filogenética con otras especies de la familia Metschnikowiaceae.	5
<b>Figura 3.</b> Localizaciones de colonización, factores de riesgo y espectro de infección ocasionado por <i>C. auris</i> .	11
<b>Figura 4 .</b> Comparación de la vía tradicional para el desarrollo de fármacos vs. el propósito de un fármaco aprobado para su uso clínico.	16
<b>Figura 5.</b> CF observada en los tratamientos de SRT analizados.	39
<b>Figura 6.</b> Supervivencia animal para los tratamientos de SRT analizados.	40
<b>Figura 7.</b> CF observada en los tratamientos de VCZ analizados.	42
<b>Figura 8.</b> Supervivencia animal para los tratamientos de VRC analizados.	43
<b>Figura 9.</b> CF observada en terapia combinada comparadas con una dosis subóptima de VRC y el grupo control.	46
<b>Figura 10.</b> Supervivencia animal de la terapia combinada comparada con el grupo control y con una dosis subóptima de VRC en monoterapia.	47

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>5-FC:</b> 5-Flucitosina	<b>PCR:</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>POS:</b> Posaconazol
<b>AMB:</b> Anfotericina B	<b>qPCR:</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
<b>ASD:</b> Agar Dextrosa de Saboraud	<b>RPMI:</b> Medio Roswell Parl Memorial Institute
<b>CDC:</b> Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades	<b>SRT:</b> Sertralina
<b>CFG:</b> Caspofungina	<b>UCI:</b> Unidad de Cuidados Intensivos
<b>CRCEI:</b> Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas	<b>UFC:</b> Unidades formadoras de colonia
<b>ECDC:</b> Centro Europeo para el Control y la Prevención de Enfermedades	<b>VRC:</b> Voriconazol
<b>ERG 11:</b> Gen de Lanosterol 14- $\alpha$ -Desmetilasa	<b><math>\mu</math>g:</b> Microgramos
<b>FDA:</b> Administración Federal de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América	<b><math>\mu</math>l:</b> Microlitros
<b>FIC:</b> Concentración Inhibitoria Fraccionada	<b><math>^{\circ}</math>C:</b> Grados Celsius
<b>FICI:</b> Índice de Concentración inhibitoria fraccionada	<b>%:</b> Porciento
<b>FLU:</b> Fluconazol	
<b>g:</b> Gramos	
<b>h:</b> Horas	
<b>Kg:</b> Kilogramos	
<b>MALDI-TOF:</b> desorción/ionización láser asistida por matriz	
<b>mg:</b> Miligramos	
<b>MFG:</b> Micafungina	

## RESUMEN

Biól. Sergio Armando Alanís Ríos

Fecha de Graduación: Agosto, 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

**Título del Estudio:** EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SERTRALINA EN MONOTERAPIA Y TERAPIA COMBINADA EN UN MODELO MURINO INMUNOCOMPROMETIDO DE CANDIDEMIA POR *Candida auris*

**Número de Páginas:** 70

Candidato al grado de MAESTRÍA en CIENCIAS con orientación en Microbiología Médica

**Área de estudio:** Micología Médica

**Propósito y Método de estudio:** *Candida auris* es un patógeno fúngico emergente de importancia crítica según la OMS debido a su acelerada aparición en el mundo, así como su capacidad de ocasionar brotes nosocomiales asociados a elevadas tasas de mortalidad, debido en gran parte al perfil multifármacorresistente que caracteriza a este hongo. En el desarrollo de estrategias para el manejo clínico de infecciones por *C. auris*, se han propuesto abordajes como el re-propósito de fármacos y la terapia combinada. Aunque la sertralina, un antidepresivo, presenta un reporte de actividad antifúngica *in vitro* contra *C. auris*, esto aún no ha sido demostrado en un modelo animal. El presente trabajo evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de la sertralina sola y en combinación con micafungina y voriconazol, lo cual se corroboró posteriormente en un modelo murino inmunocomprometido de candidemia por *C. auris*.

**Contribuciones y Conclusiones:** La sertralina mostró actividad antifúngica contra todas las cepas de *C. auris* probadas, así como una interacción sinérgica con voriconazol en el 33% de las mismas. En el modelo animal adoptado, el grupo tratado con sertralina a 10 mg/Kg exhibió un efecto antifúngico comparable, en términos de supervivencia animal, a que aquel que recibió voriconazol a 2.5 mg/Kg. El efecto antifúngico de la terapia combinada con sertralina fue mayor que el de la monoterapia, representando una estrategia factible para el manejo clínico de las infecciones por *C. auris*, ampliando así las limitadas opciones terapéuticas actualmente disponibles.



---

Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Director de Tesis

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes históricos

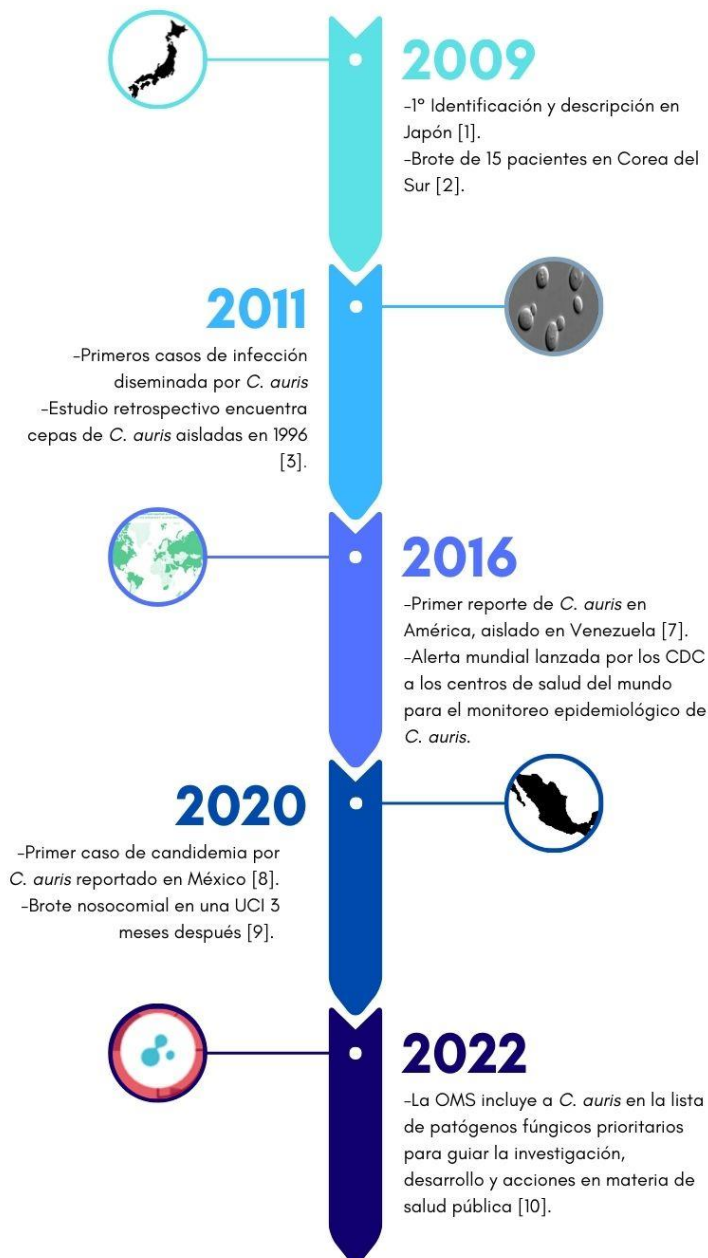
*Candida auris* fue descrita por primera vez en 2009, recuperada a partir de la secreción ótica de una paciente en Japón [1]. Durante este mismo año, se aisló en 15 pacientes con cuadros de otitis media crónica en Corea del Sur, estableciendo a *C. auris* como una especie patógena de reciente emergencia [2]. Dos años después, en este mismo país, se reportaron los primeros casos de fungemia ocasionados por *C. auris*, afectando a 2 pacientes, quienes recibieron tratamiento con fluconazol y anfotericina B en combinación, el cual resultó en fracaso terapéutico y la muerte de ambos pacientes. A partir de este brote, se realizó un estudio retrospectivo con el cepario de un hospital escuela en este mismo país, encontrando un aislado adicional de esta especie del año 1996, proveniente de sangre de una paciente de 1 año de edad [3]. Durante los años posteriores, comenzaron a registrarse reportes de aislados de este patógeno alrededor del mundo [4-6], siendo reportado por primera vez en América en el 2016, a partir de un brote nosocomial que afectó a 18 pacientes en Venezuela [7]. En este mismo año, el Centro de Control de Enfermedades (CDC), en conjunto con los Centros de Control de Enfermedades Europeos (ECDC) enviaron una alerta a los centros de salud del mundo para el monitoreo de esta especie.

*C. auris* fue reportada por primera vez en México en el 2020, aislada a partir del hemocultivo de una paciente de 58 años con un historial de endometriosis severa de larga evolución. Tras instaurar como tratamiento caspofungina en

combinación con anfotericina B liposomal, la paciente mostró una evolución favorable; sin embargo, semanas después desarrolló shock séptico y falleció [8]. Tres meses después, se reportó un brote ocasionado por este patógeno en el mismo hospital, el cual afectó a 12 pacientes alojados en la unidad de cuidados intensivos, en donde la tasa de mortalidad reportada fue del 83.3% [9]. En el año 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la lista de patógenos fúngicos prioritarios para guiar la investigación, desarrollo y acciones en materia de salud pública, ubicando a *C. auris* como una especie de importancia crítica para su investigación [10].

# Candida auris

## Línea de Tiempo



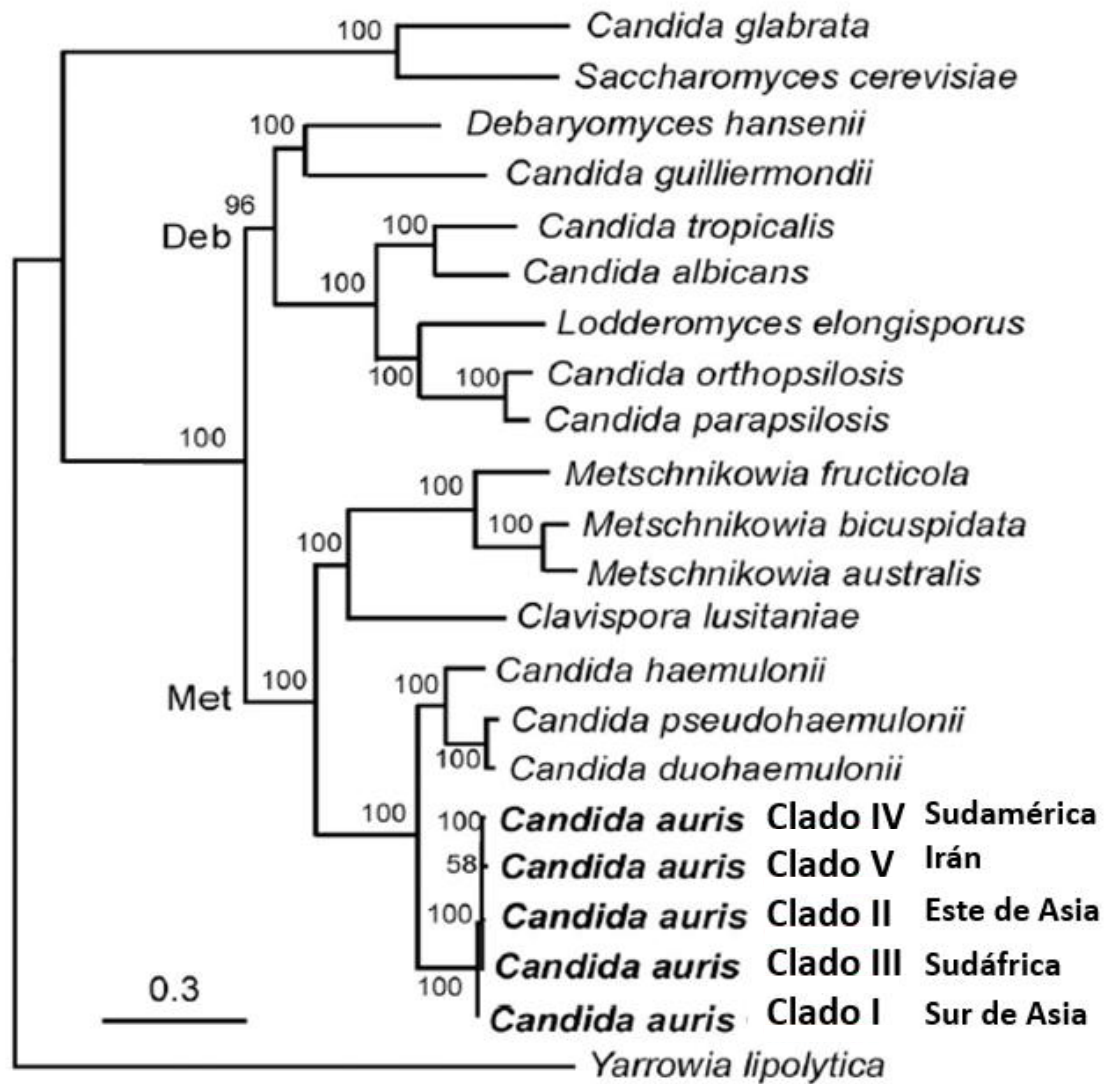
**Figura 1.** Línea de tiempo con acontecimientos importantes en la emergencia de *C. auris* alrededor del mundo.

## 1.2 Características microbiológicas de *C. auris*

### 1.2.1 Filogenia

*C. auris* es un miembro del clado Clavispora, perteneciente a la familia Metschnikowiaceae. Se han descrito 5 clados genéticos, nombrados con base al continente donde fue aislado originalmente el organismo (Figura 2). Estos clados se encuentran estrechamente emparentados filogenéticamente a especies como *Candida haemulonii* y *Candida pseudohaemulonii* [11-13]. Los métodos convencionales para la identificación de estas especies no permiten discriminar fehacientemente a *C. auris* debido a esta cercanía genética. Resultan de especial importancia clínica las cepas pertenecientes a los clados I, III y IV (Sur de Asia, Sudáfrica y América del sur, respectivamente) debido a que las cepas pertenecientes a estos clados suelen asociarse a brotes nosocomiales de infecciones diseminadas con un perfil multifármacorresistente [14].





**Figura 2.** Clados genéticos descritos de *C. auris* y su relación filogenética con otras especies de la familia Metschnikowiaceae. Modificado de Du [15].

### 1.2.2 Características microbiológicas

*C. auris* es un organismo levaduriforme con una forma ovoide similar a *Candida glabrata*, capaz de crecer en cultivo a 37°C en agar dextrosa de Saboraud, desarrollando colonias redondeadas, cremosas de color blanco. En CHROMagar *Candida*®, desarrolla colonias rosas a moradas; sin embargo, no es posible realizar la identificación definitiva de especie únicamente por este método, debido a que pudiera presentarse una alta variación en la tonalidad de las colonias dependiendo del país de origen y el clado al que pertenezca el aislado.

Una característica fisiológica que diferencia a *C. auris* de otras especies del mismo género es su alta termotolerancia y halotolerancia, ya que puede crecer a temperaturas mayores a 40°C y con un contenido de sal de hasta el 10% [15], representando posibles pruebas preliminares para una identificación presuntiva antes de su confirmación por otras metodologías.

Métodos de identificación basados en pruebas bioquímicas comerciales son usados globalmente en laboratorios para la identificación de aislados clínicos de levaduras [16]. Sin embargo, los sistemas de identificación bioquímica existentes pueden identificar de manera errónea aislados de *C. auris*. En este sentido, algunos ejemplos de errores comunes pueden observarse en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Casos de identificación errónea de *C. auris*

Método bioquímico utilizado	Identificación errónea	Referencia
VITEK 2	<i>C. haemulonii</i>	[17]
VITEK 2	<i>C. duobushaemulonii</i>	[18]
RapID Yeast Plus	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	[19]
AuxaColor 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[20]
API ID20C	<i>C. sake</i>	
VITEK MS	<i>C. lusitaniae</i>	
MicroScan	<i>C. famata</i> , <i>C. guilliermondi</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lusitaniae</i>	[21]
API 20C AUX	<i>Rhodotorula glutinis</i>	
BD Phoenix	<i>C. catenulata</i> , <i>C. haemulonii</i>	

La versión 8.01 de la base de datos de VITEK 2 es capaz de identificar aislados de *C. auris*, siendo especialmente sensible para los clados I y III. Sin embargo, no es capaz de identificar cepas pertenecientes al clado II, identificándolas erróneamente como *C. duobushaemulonii* [22]. Incluso en sus versiones más actualizadas, el VITEK 2 presenta una sensibilidad promedio para la identificación de esta levadura del 52% [18].

El uso del método de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) permite la identificación de *C. auris*, con la limitante de la existencia de un espectro definido para el organismo dependiendo la base de datos utilizada al momento del análisis. Existen casos en los que cepas de *C. auris* han sido identificadas erróneamente como *C. haemulonii*. Este obstáculo para la identificación de aislados puede ser superado al utilizar bases de datos de Uso Exclusivo para Investigación (*Research Use Only*), las cuales cuentan con una mayor cantidad de espectros de referencia para la correcta identificación de cepas de esta especie [23].

La identificación por medio de ensayos basados en ácidos nucleicos no suele ser ampliamente utilizada debido al elevado costo y dificultad técnica. Sin embargo, la secuenciación de loci genéticos es capaz de proveer una identificación precisa de cepas de *C. auris* [24].

Se han desarrollado distintos ensayos moleculares para la correcta identificación de esta levadura proveniente de diferentes fuentes, utilizando principalmente PCR y PCR en tiempo real (qPCR). Se presentan algunos ejemplos de estos ensayos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Ensayos moleculares para la identificación de *C. auris*

Fuente	Método	Referencia
Frotis de piel	qPCR SYBR green	[25]
Sangre, orina, úlcera por presión, herida en axila, herida en ingle	PCR con sonda LightCycler® Red 610nm	[26]
Colonia aislada	qPCR con sonda TaqMan, sistema BD Max	[27]
Sangre, orina, exudado purulento, recto, catéter venoso central	PCR de genes de proteínas GPI específicas de la especie	[28]
Sangre, orina, catéter venoso central	PCR Multiplex de genes de proteínas GPI específicas de la especie	[29]

El estudio de la virulencia de *C. auris* muestra que su patrón de crecimiento es similar a los de otras especies del mismo género, llegando a su fase estacionaria aproximadamente a las 20 h de cultivo [30]. Se han reportado dos morfologías de *C. auris*: levaduras aisladas que se reproducen normalmente por gemación y células que se reproducen, pero su separación de la célula madre es incompleta, formando agregados [31]. Se ha asociado esta morfología agregativa a una mayor patogenicidad, con una mayor producción de biopelícula *in vitro* y respuestas proinflamatorias en un modelo murino [32]. Aunque normalmente esta levadura no presenta la capacidad de filamentar (generar tubo germinal), algunos estudios han reportado el cambio de morfología de cepas levaduriformes a la formación de

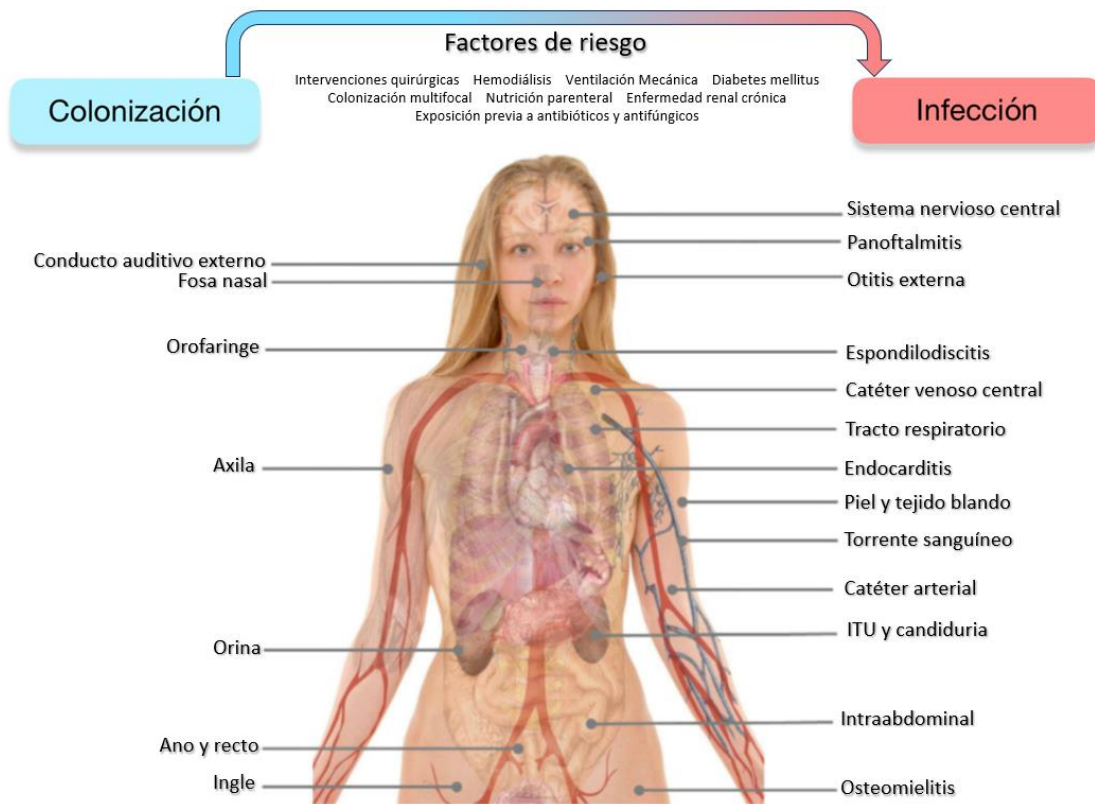
pseudohifas al exponerlas a estrés genotóxico [33] o realizando una infección sistémica en un ratón y cultivando posteriormente las células recuperadas de hígado y riñón en Agar Extracto de Levadura, Peptona y Dextrosa [34]. En general, existe poca información acerca de los mecanismos de virulencia y patogenicidad de *C. auris* en comparación con otras levaduras del mismo género, mostrando una alta variabilidad entre aislados y algunas cepas presentando incluso una virulencia comparable a *C. albicans*, considerada como la más virulenta del género [31]. Las diferencias en la virulencia de los aislados de esta especie se encuentran estrechamente asociadas al clado al que pertenece la cepa analizada [35].

### **1.3 Aspectos clínicos de la infección por *C. auris***

A diferencia de otras especies de *Candida*, *C. auris* no forma parte de las especies que colonizan naturalmente al ser humano, ni se considera un comensal común en el tracto intestinal. Este patógeno tiene una alta capacidad de transmisión horizontal entre pacientes por medio de contacto directo, teniendo elevada afinidad a la piel, especialmente en zonas con un alto contenido de humedad. Se ha reportado la colonización por este microorganismo en pacientes dentro de ambientes intrahospitalarios, a pesar del uso de clorhexidina, nistatina y equinocandinas, sugiriendo una alta capacidad de supervivencia una vez establecido, asociada a su extraordinaria habilidad de formar biopelículas conformadas por múltiples capas con una alta adherencia [36].

El rango de infecciones que puede ocasionar *C. auris* es similar al de otras especies patógenas de su género (Figura 3). La infección del torrente sanguíneo (candidemia) es la entidad clínica más común, asociada con frecuencia al uso de dispositivos

intravasculares. La tasa de mortalidad asociada a candidemias ocasionadas por este patógeno oportunista varía entre el 30% a más del 80% en algunas regiones del mundo [37], relacionado a la dificultad de su tratamiento, por lo que es esencial reconocer los factores de riesgo que predisponen a una infección diseminada por *C. auris*.



**Figura 3.** Localizaciones de colonización, factores de riesgo y espectro de infección ocasionado por *C. auris*. Modificado de García-Bustos [38].

## 1.4 Resistencia a antifúngicos

En el entorno clínico, las cepas de *C. auris* aisladas de pacientes resultan de especial importancia debido a que frecuentemente presentan un perfil resistente a una o más clases de antifúngicos utilizados para el tratamiento de infecciones fúngicas (Tabla 3) [11].

**Tabla 3.** Cepas de *C. auris* resistentes a antifúngicos de uso clínico provenientes de 3 clados. Resultados de Lockhart [11] N=54

Resistencia antifúngica	
Antifúngico	% de cepas resistentes
Fluconazol	93%
Anfotericina B	35%
Equinocandinas	7%
Perfil Multirresistente	
2 o más clases de antifúngicos	41%
3 clases de antifúngicos	4%

*C. auris* posee diversos mecanismos de resistencia a los antifúngicos de uso clínico. Se ha reportado que la mayoría de los aislados analizados presentan resistencia a triazoles, misma que se encuentra asociada a la sobreexpresión de bombas de eflujo y una gran cantidad de mutaciones en el gen *ERG11*[39]. También se han reportado cepas con diversas mutaciones en los genes *ERG*, con una reducción total del ergosterol en la célula fúngica, relacionándose esto a resistencia a la anfotericina B. El perfil de resistencia antifúngica se encuentra altamente relacionado al clado al cual pertenezca la cepa analizada. Recientemente, la frecuencia de aparición de aislados multirresistentes y panresistentes de *C. auris* se



ha incrementado, alarmando a la comunidad médica y científica por las limitadas opciones de tratamiento efectivas para el manejo clínico de infecciones por este microorganismo [40, 41].

### **1.5 Estrategias terapéuticas novedosas para las infecciones ocasionadas por *C. auris***

Debido al reto terapéutico que representan las infecciones ocasionadas por *C. auris*, relacionado a su perfil multifármacorresistente, resulta necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas novedosas que sean seguras y efectivas para combatir a este patógeno emergente.

#### *1.5.1 Terapia combinada*

La terapia combinada consiste en el uso de dos o más fármacos con diferentes mecanismos de acción que alcanzan una interacción sinérgica, incrementando así la posibilidad de éxito en el tratamiento [42]. El estudio de las interacciones entre distintos fármacos antimicrobianos comienza con estudios *in vitro*. En este contexto, resulta particularmente conveniente el modelo de tablero de damas, el cual consiste en un arreglo de concentraciones crecientes de dos compuestos, que permite calcular el índice de concentración inhibitoria fraccionada (FICI, por sus siglas en Inglés) [43].

Se han evaluado diversas combinaciones de antifúngicos *in vitro* contra *C. auris*, encontrando distintos porcentajes de sinergia en las cepas analizadas (Tabla 4).

**Tabla 4.** Combinaciones de antifúngicos probadas *in vitro* contra *C. auris*

Antifúngico 1	Antifúngico 2	% de sinergia	Referencia
AMB	5-FC	14%	[44]
MFG	5-FC	14%	
VRC	5-FC	0%	
MFG	FLU	0%	[45]
MFG	VCZ	100%	
CFG	POS	100%	[46]

AMB: Anfotericina B. MFG: Micafungina. VRC: Voriconazol. CFG: Caspofungina. POS: Posaconazol. 5-FC: 5-

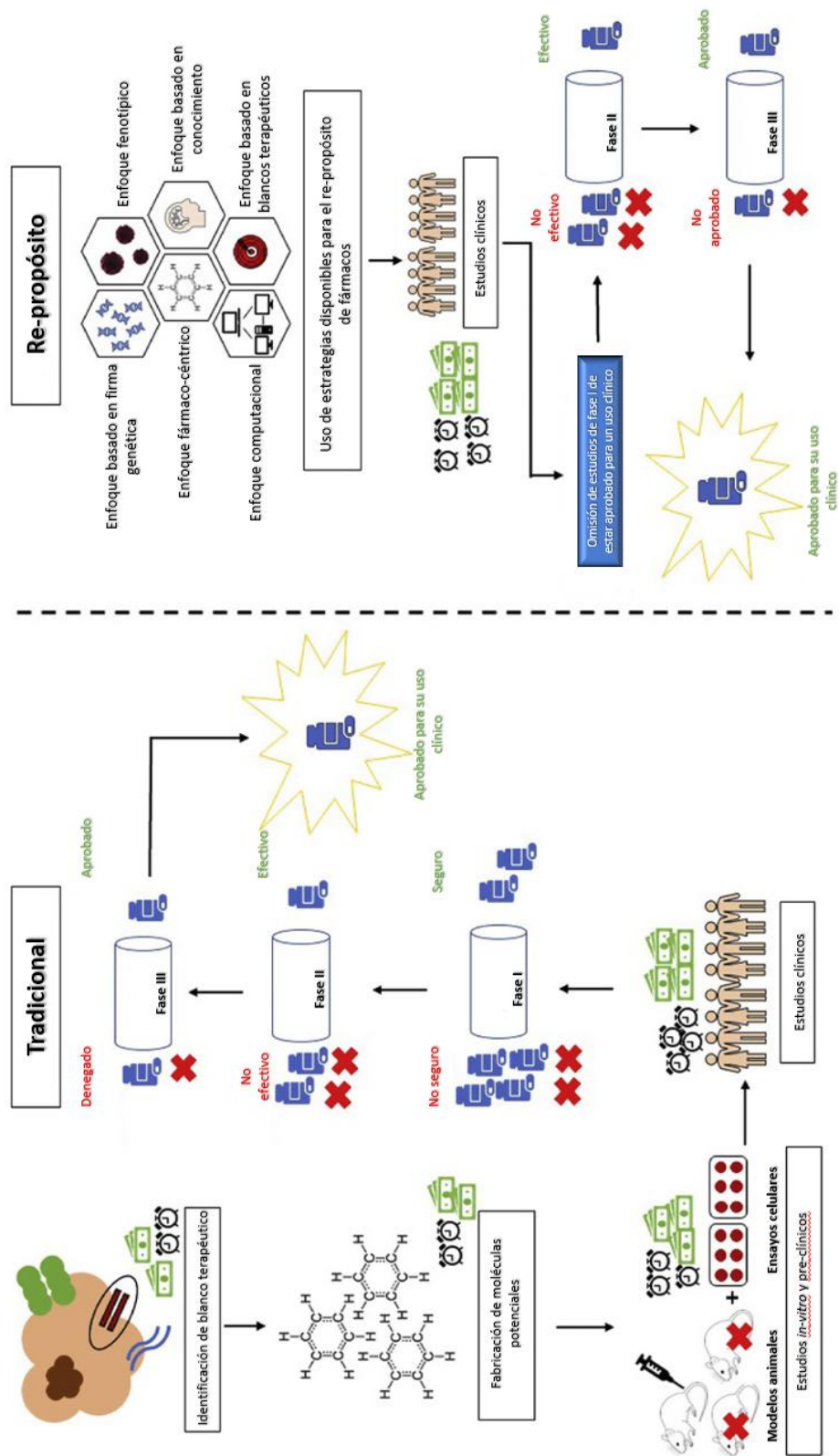
Flucitocina. FLU: Fluconazol

El CDC recomienda el uso de equinocandinas como antifúngico de primera línea para el tratamiento de infecciones fúngicas ocasionadas por microorganismos emergentes, incluyendo a *C. auris* [47]. Si el microorganismo muestra resistencia al tratamiento primario, se sugiere modificar el esquema terapéutico a anfotericina B liposomal en monoterapia o administrar en combinación con la equinocandina empleada inicialmente. Ya se han probado algunas combinaciones de equinocandinas con otros antifúngicos para su uso en el tratamiento de candidemias por *C. auris* en brotes nosocomiales, mostrando resultados alentadores [48].

### 1.5.2 *Re-propósito de fármacos*

El proceso para el desarrollo de nuevos fármacos para un determinado uso terapéutico conlleva una inversión significativa, tanto de tiempo como económica. Esto es debido a que, para su aprobación por las agencias de regulación sanitaria como la Administración Federal de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en Inglés), el fármaco debe pasar una batería rigurosa de pruebas que demuestren su seguridad y efectividad. Recientemente, las compañías farmacéuticas han comenzado a orientar sus esfuerzos hacia la investigación moléculas ya conocidas que no hayan mostrado efectividad para la actividad deseada y, por ende, carezcan de una autorización para su uso terapéutico, o que ya se encuentren aprobadas por la FDA para un uso terapéutico con una potencial actividad adicional, utilizando una estrategia denominada re-propósito de fármacos. El re-propósito de fármacos supone una ventaja sobre la vía tradicional para el desarrollo de nuevos tratamientos, ya que, si el fármaco se encuentra aprobado por una agencia regulatoria, es posible omitir las pruebas de bioseguridad, lo cual conlleva a un ahorro significativo de tiempo y recursos. (Figura 4).

El re-propósito de fármacos con un potencial efecto antimicrobiano es una estrategia novedosa para hacer frente a la creciente aparición de microorganismos multifármacorresistentes [49]. Se han probado una gran variedad de fármacos de re-propósito para el tratamiento de enfermedades infecciosas, con diferentes grados de avance para su aprobación por la FDA (Tabla 5).



**Figura 4 .** Comparación de la vía tradicional para el desarrollo de fármacos vs. el re-propósito de un fármaco aprobado para su uso clínico. Modificado de Parvathaneni [50]

**Tabla 5.** Fármacos de re-propósito con actividad antimicrobiana en diferentes fases de estudio

Fármaco	Uso inicial	Uso de re-propósito	Estado de aprobación por la FDA	Referencia
Doxiciclina	Antibacteriano	Antipalúdico	Uso a discreción	[51]
Tamoxifeno	Cáncer de mama	Antifúngico	Descubrimiento reciente	[52]
Penfluridol	Antipsicótico	Antibacteriano	Descubrimiento reciente	[53]
Talidomida	Náuseas matutinas	Lepra	Aprobado	[54]
Zidovudina	Cáncer	VIH	Descubrimiento reciente	[55]
Sertralina	Antidepresivo	Antibacteriano	Fase III completa	[56]
		Antifúngico	Fase III completa	[57]

Esta estrategia resulta de especial interés para la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas contra infecciones fúngicas debido al limitado armamento antifúngico actualmente disponible. Existen solamente cuatro clases de antifúngicos utilizados en la práctica clínica, los cuales presentan limitantes que pueden resultar en un fallo terapéutico, como la resistencia intrínseca a ciertas clases de antifúngicos presente en diversas especies de hongos patógenos oportunistas.

Entre los fármacos de re-propósito propuestos para el tratamiento de infecciones fúngicas destaca la sertralina, un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina. La sertralina es el antidepresivo más prescrito a nivel mundial. El amplio uso de este fármaco supone una ventaja para la investigación de la sertralina como fármaco de re-propósito debido a la gran cantidad de estudios acerca de su biodisponibilidad y efectos en el organismo, así como su metabolismo y bioseguridad. La actividad antifúngica de la sertralina contra hongos de importancia clínica ha sido evaluada en diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* (Tabla 6).

**Tabla 6.** Reportes del efecto antifúngico de la sertralina contra diferentes patógenos fúngicos

Especie fúngica	Modelo experimental	Efecto observado	Referencia
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>In vitro e In vivo</i>	Reducción estadísticamente significativa de la CF en cerebro, riñón y bazo con respecto al control.	[58]
		Efecto antifúngico de un tratamiento con 15 mg/Kg de SRT comparable a un esquema con la misma concentración de fluconazol	[59]
<i>Sporothrix schenckii</i>	<i>In vitro</i>	Actividad antifúngica contra 15 cepas, interacción sinérgica con itraconazol en una cepa.	[60]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>In vitro</i>	Interacción antifúngica sinérgica con anfotericina B en las 7 cepas analizadas	[61]
	<i>In vivo</i>	Mejoría en el puntaje de bienestar de larvas de <i>Galleria mellonella</i> . Una dosis de SRT de 10mg/kg mostró reducción de CF comparable a un tratamiento de 3 mg/Kg de anfotericina B y de 10 mg/Kg de voriconazol.	[62]
<i>C. auris</i>	<i>In vitro</i>	Actividad antifúngica contra las 3 cepas analizadas, enfoque sobre el posible mecanismo de acción antifúngico.	[63]

Aunque la sertralina como fármaco de re-propósito para el manejo clínico de diversas infecciones fúngicas ha mostrado resultados alentadores en esquemas de monoterapia y de terapia combinada, su actividad antifúngica contra *C. auris* resulta de especial interés como una posible alternativa de tratamiento. Sin embargo, esta actividad aún no ha sido comprobada en un modelo *in vivo*.

## **1.6 Modelos experimentales de infección por *C. auris***

Los ensayos *in vitro* en donde se han evaluado diversas estrategias de tratamiento, tanto con antifúngicos de uso clínico, fármacos de re-propósito, o bien terapia combinada han permitido identificar posibles candidatos para el tratamiento de infecciones diseminadas por *C. auris*. Sin embargo, esta actividad antifúngica debe ser comprobada en modelos animales que permitan emular la infección sistémica que ocurre en el humano. Estos modelos de infección permiten ampliar la comprensión del comportamiento de la enfermedad, así como evaluar la efectividad de posibles estrategias para su tratamiento.

### *1.6.1 Galleria mellonella*

*G. mellonella* es reconocido como un organismo modelo para el estudio de infecciones sistémicas al presentar diversas ventajas: la obtención y mantenimiento de larvas de *G. mellonella* no supone un costo económicamente significativo, y éstas presentan una respuesta inmune celular y humoral similar a la de mamíferos. Los tiempos de generación cortos y la capacidad de incubar las larvas a temperaturas fisiológicas humanas presentan una ventaja en especial para el estudio de factores de virulencia e interacciones hospedero-patógeno [64].



### 1.6.2 *Drosophila melanogaster* deficiente de Toll

El uso de *D. melanogaster* para el estudio de infecciones fúngicas permite ampliar el conocimiento de la patogénesis y mecanismos de defensa del hospedero. El empleo de este modelo permite el análisis de diferentes rutas de infección, ya sea por inyección directa, colonización o por ingestión. Esta especie es de un bajo costo de mantenimiento y tiene un tiempo de generación corto, lo que facilita la evaluación del efecto antifúngico de diversos agentes. La respuesta humoral de las larvas suele ser suficientemente fuerte como para eliminar a la mayoría de los hongos oportunistas, por lo que se han desarrollado cepas de *D. melanogaster* deficientes de receptores tipo Toll para su estudio. Una de las limitantes conocidas de este modelo animal es que la extrapolación al humano de la posible efectividad de los tratamientos evaluados se vuelve complicada al tratarse de un artrópodo, por lo que suele ser utilizado solamente para ampliar un estudio con mamíferos [65].

### 1.6.3 *Modelo murino inmunocomprometido*

La candidosis sistémica por *C. auris* es una entidad clínica de especial importancia, al asociarse a una elevada tasa de mortalidad y representar un reto terapéutico para el clínico. El uso de modelos murinos de infección diseminada por hongos está reconocido como el *gold standard* para la investigación de la patogénesis de la enfermedad y la evaluación de la efectividad de tratamientos. Sin embargo, habitualmente la respuesta inmune humoral del ratón es lo suficientemente efectiva para resolver la infección murina. Por lo anterior, es necesario emular las condiciones que predisponen a pacientes a una infección por *C. auris*, especialmente una inmunosupresión que permita el establecimiento de

una infección diseminada ocasionada este patógeno oportunista para su posterior estudio. Esta puede llevarse a cabo al administrar agentes con un efecto inmunosupresor como la ciclofosfamida [66] o el uso de ratones *knock-out* [67]. Una de las consideraciones con el uso de este modelo animal es la posibilidad de sobreinfección, por lo que deben tomarse ciertas medidas, como la adición de antibióticos profilácticos en el agua para beber y una manipulación aséptica de los murinos [68]. La infección se realiza por medio de la inoculación del microorganismo a través de la vena lateral de la cola. Conforme se establece la infección en el ratón, suele encontrarse una mayor concentración de levaduras en riñón, cerebro y bazo. En los modelos tratados con un agente inmunosupresor, los animales suelen recuperar su capacidad de respuesta inmune conforme avanza el modelo, habitualmente siendo capaces de resolver la infección. Las causas de muerte observadas en estos estudios suelen reconocerse como falla renal o sepsis fúngica.

## CAPÍTULO 2

### JUSTIFICACIÓN

*C. auris* es un patógeno fúngico oportunista de importancia crítica según la OMS debido a su emergencia en todo el mundo y su asociación a candidemias con una alta tasa de mortalidad relacionada a su elevada adaptabilidad medioambiental y perfil multifármacorresistente. Es por esto que surge la necesidad de proponer nuevas y mejores estrategias de tratamiento que sean seguras, efectivas y mejoren el pronóstico clínico en infecciones diseminadas por *C. auris*.

Aunque recientemente se reportó que la sertralina, un fármaco de re-propósito, posee actividad antifúngica *in vitro* contra *C. auris*, esta actividad aún no se ha comprobado en ensayos preclínicos, por lo tanto, es importante evaluarla empleando un modelo animal de candidemia por *C. auris*.

### **CAPÍTULO 3**

#### **HIPÓTESIS EXPERIMENTAL**

La sertralina posee actividad antifúngica en monoterapia y, especialmente en terapia combinada, en un modelo murino inmunosuprimido de candidemia por *C. auris*.

## CAPÍTULO 4

### OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de la sertralina en monoterapia y terapia combinada en un modelo murino inmunosuprimido de candidemia por *C. auris*.

#### 4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de la sertralina (SRT), micafungina (MFG) y voriconazol (VRC) solos y en combinación contra *C. auris*.
2. Evaluar la actividad antifúngica de la SRT en monoterapia en un modelo murino inmunosuprimido de candidemia por *C. auris*.
3. Evaluar la actividad antifúngica de la sertralina en combinación con un antifúngico en un modelo murino inmunosuprimido de candidemia por *C. auris*.

## CAPÍTULO 5

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.1 Estrategia experimental

Se partió de 12 aislados clínicos de *C. auris* reactivados metabólicamente, con los cuales se realizó un ensayo de microdilución en caldo utilizando el modelo de tablero de damas, determinando la actividad antifúngica de los fármacos: MFG, VRC y SRT solos y en combinación. De los resultados obtenidos, se seleccionó el aislado de *C. auris* que presentara la interacción sinérgica más fuerte, tomando como referencia el valor de FICI menor obtenido de la combinación de SRT con uno de los dos antifúngicos analizados. Este valor permitió además seleccionar el antifúngico a evaluar en monoterapia junto con la SRT en un modelo murino inmunosuprimido de candidosis diseminada por esta levadura. El esquema de tratamiento en monoterapia permitió determinar una dosis sub-óptima del antifúngico al ser comparable con el tratamiento más alto de SRT tanto en la reducción de carga fúngica (CF) como en supervivencia animal, misma que fue utilizada en un esquema de terapia combinada con las mismas dosis de SRT previamente analizadas, permitiendo así la comparación de un esquema de monoterapia contra uno de terapia combinada utilizando SRT.

#### 5.2 Aislamientos de *C. auris*

A partir de una colección de 12 aislados clínicos de *C. auris* recuperados de un brote nosocomial en México [9], donde el 50% de las cepas se aislaron de sangre, el 66% de orina y el 16% de ambos orígenes. Los aislados se encuentran previamente identificados por MALDI-TOF y genotipificados mediante análisis de secuencias multilocus, agrupándose en el clado IV (América del Sur). Estas

cepas se encuentran resguardadas en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (C.R.C.E.I.) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 15%. Las cepas se sembraron en placas de agar Saboraud dextrosa (ASD) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h antes de cada ensayo.

### **5.3 Fármacos utilizados**

Los fármacos utilizados fueron micafungina (Mycamine®; Astellas Pharma, Deerfield, IL, E.U.A.), voriconazol (Pfizer, New York, NY, E.U.A.) y sertralina (TCI Chemicals Inc., New York, NY, E.U.A.). Para los estudios *in vitro*, los fármacos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) al 100% (Bio Basic, E.U.A.), para obtener soluciones stock con una concentración de 3,200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estas soluciones se alicuotaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para los estudios *in vivo*, se realizaron diluciones de VRC y SRT en agua destilada estéril libre de pirógenos.

### **5.4 Susceptibilidad antifúngica**

#### *5.4.1 Ensayo de microdilución en caldo*

Se realizaron pruebas de microdilución en caldo de acuerdo al método descrito en el documento M27-A3 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)[69]. Se hicieron diluciones seriadas de los fármacos a partir de las soluciones stock en medio RPMI-1640 (Medio Roswell Park Memorial Institute) con 165 nM de MOPS (Hardy Diagnostics, E.U.A.) en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Corning, E.U.A.). Los rangos de concentraciones finales utilizados fueron 0.03-04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de VRC, 0.06-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MFG y 0.25-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de SRT. Se ajustó un inóculo de cada cepa por medio de

espectrofotometría. Las placas se incubaron por 24 h a 35°C y se realizó su lectura de manera visual utilizando un espejo invertido, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) a partir de los pocillos en donde el crecimiento se redujera a un 50% con respecto al control de crecimiento.

#### 5.4.2 Susceptibilidad en combinación: Modelo de tablero de damas

Se realizó un ensayo de microdilución en caldo siguiendo las indicaciones del documento M27-A3 del CLSI, adoptando el modelo de tablero de damas para el análisis de las interacciones entre los fármacos probados [43]. Con base en los resultados de CMI obtenidos de los fármacos solos y los pocillos en combinación donde se observó una inhibición completa del crecimiento de las cepas después de 24 h de incubación, se realizó el cálculo de las concentraciones inhibitorias fraccionadas (FIC) por medio de la siguiente fórmula matemática:

$$\mathbf{FIC} = \frac{\mathbf{CMI\ del\ agente\ en\ combinación}}{\mathbf{CMI\ del\ agente\ solo}}$$

La suma de las FIC calculadas determina el Índice de Concentraciones Inhibitorias Fraccionadas, lo que permite interpretar el tipo de interacción que los fármacos presentan cuando se encuentran en combinación:

$\sum \text{FIC} < 0.5$  Sinergia.

$\sum \text{FIC} > 0.5 < 0.6$  Sinergia parcial.

$\sum \text{FIC} > 0.6 < 4$  Indiferencia.

$\sum \text{FIC} > 4$  Antagonismo.

## 5.5 Modelo animal



### 5.5.1 *Declaración de ética*

El protocolo experimental se registró ante el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el código: MB22-00001, y cuenta con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), perteneciente a la misma institución. El mantenimiento y manejo de los animales utilizados en este estudio se realizó siguiendo los lineamientos descritos en la NOM-062-ZOO-1999.

### 5.5.2 *Animales de laboratorio*

Se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/c con una edad comprendida entre las 8 y 16 semanas (peso aproximado de 13-20 g), alojados en grupos de 5 ratones en cajas ventiladas de policarbonato con lecho de aserrín, en el Laboratorio de Microbiología Experimental. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar de alimentación *ad libitum*, con una temperatura de 18 a 24°C y una humedad relativa del 40 al 60%, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h. El cambio de lecho y lavado de charolas se realizó cada 48 h. El número y cepa de ratones fue seleccionado como el mínimo necesario con base en estudios previos similares.

### 5.5.3 *Inmunosupresión*

Los animales fueron sometidos a un esquema de inmunosupresión, recibiendo una dosis intraperitoneal de ciclofosfamida de 200 mg/Kg 3 días antes de la infección y un refuerzo con 150 mg/Kg 1 día después del reto. Con la finalidad de evitar una sobreinfección bacteriana, se administraron 50 ppm de

enrofloxacino (Sigma-Aldrich, E.U.A.) en el agua de los bebederos 1 día antes del reto, manteniendo esta profilaxis hasta el día 8 post-infección.

#### 5.5.4 *Preparación del inóculo*

A partir de un cultivo joven de una cepa de *C. auris* se cosecharon cuidadosamente las colonias, se lavaron por triplicado con PBS estéril, se realizó conteo con hematocitómetro y se ajustó el inóculo para obtener una concentración final de  $4.3 \times 10^7$  células/mL, la cual se corroboró posteriormente mediante cuenta viable en ASD.

#### 5.5.5 *Infección y determinación de CF*

Grupos experimentales de 17 ratones, previamente inmunosuprimidos, fueron infectados a través de la vena lateral de la cola con 100  $\mu$ L del inóculo. Los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal diariamente por 7 días, iniciando 24 h después del reto. Los esquemas de tratamiento utilizados en monoterapia fueron: 1, 5 y 10 mg/Kg/día de SRT, así como un antifúngico seleccionado con base en los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*. A partir de los resultados obtenidos en monoterapia, se seleccionó una dosis sub-óptima del antifúngico utilizado para el tratamiento con terapia combinada junto con las tres dosis de SRT previamente utilizadas.

En el día 8 post-infección se eligieron aleatoriamente 7 ratones, los cuales se eutanizaron mediante dislocación cervical previa anestesia y se les extrajeron quirúrgicamente el bazo, un riñón y el cerebro. Los órganos fueron pesados de manera aséptica, depositados en bolsas Whirl-Pak con 1 mL de PBS estéril adicionada con una mezcla de antibióticos para prevenir contaminación bacteriana, homogenizados por medio de maceración manual, realizando

diluciones seriadas en PBS y sembrando 100  $\mu$ L de las diluciones en placas de ASD, las cuales fueron incubadas por 24 h a 37°C. Tras determinar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) en cada una de las bolsas, se realizó el cálculo de las UFC por gramo, dividiendo las UFC/mL entre el peso de cada órgano analizado.

#### 5.5.6 *Supervivencia animal*

Se realizó un monitoreo diario del estado de salud de los animales en búsqueda de signos sugerentes de dolor y estrés, eutanizando aquellos ratones moribundos o que cumplieran criterios de “punto final” (falta total de actividad, pérdida de peso mayor al 25%) [70], tomando nota de los días post-infección en los que los animales morían o eran sacrificados. Con la información recabada se construyeron curvas de Kaplan-Meier para evaluar la sobrevivencia de los murinos a lo largo de 21 días, punto en el cual invariablemente se procedió a eutanizar a los animales sobrevivientes.

#### 5.5.7 *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos de la determinación de CF fueron analizados por medio del software IBM SPSS Statistics 26 (IBM, Armonk, NY, E.U.A.), determinando primero la tendencia de distribución de datos y procediendo a realizar las pruebas estadísticas correspondientes: Prueba de T si la distribución es normal. De lo contrario, se aplicará la prueba de U de Mann-Whitney con corrección *post-hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como valores significativos solamente aquellos con una  $P \leq 0.05$ . Para el análisis de supervivencia animal, así como la generación de las respectivas gráficas de

Kaplan-Meier presentadas en este trabajo, se utilizó el software GraphPad Prism versión 8 para Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, E.U.A.).

## CAPÍTULO 6

### RESULTADOS

#### 6.1 Determinación de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de la SRT, MFG y VCZ solos y en combinación contra *C. auris*.

La SRT mostró actividad antifúngica contra todas las cepas de *C. auris* analizadas, con un rango de CMI de 4-8  $\mu\text{g/mL}$ . Todos los aislados fueron susceptibles a los antifúngicos probados de manera individual, con CMIs que variaron de 0.5 a 2  $\mu\text{g/mL}$  para MFG y de 0.125 a 0.25  $\mu\text{g/mL}$  para VRC.

Al combinar la SRT con MFG (Tabla 7), se obtuvieron valores de  $\Sigma\text{FIC}_{\text{min}}$  en un rango de 0.53 a 1.03, indicando una actividad indiferente o no interacción entre los fármacos, a excepción de la cepa 3, en donde se observó una sinergia parcial ( $\Sigma\text{FIC}_{\text{min}}$  0.53). Adicionalmente, los valores de CMI de estos fármacos en combinación mostraron una reducción considerable en sus rangos en comparación con los fármacos solos, con un cambio de 0.25-4  $\mu\text{g/mL}$  para SRT y 0.06-1  $\mu\text{g/mL}$  para MFG.

Con relación a la combinación de SRT con VRC (Tabla 8), destacan tres interacciones sinérgicas en las cepas 3, 5 y 7, con un rango de  $\Sigma\text{FIC}_{\text{min}}$  de 0.37-0.49. Adicionalmente, se observó una sinergia parcial en la cepa 12, con un valor de  $\Sigma\text{FIC}_{\text{min}}$  de 0.54. Los rangos de CMI de los fármacos en combinación mostraron una reducción con valores de 0.5-4  $\mu\text{g/mL}$  para SRT y 0.03-0.06  $\mu\text{g/mL}$  para VRC.

Asimismo, la combinación de VRC y MFG (Tabla 9) reveló cuatro interacciones sinérgicas en las cepas 3, 6, 7 y 11 con un rango de  $\sum FIC_{\min}$  de 0.37 a 0.49, y una reducción en los rangos de CMI a 0.03-0.125  $\mu\text{g/mL}$  para VRC y 0.25 a 0.5  $\mu\text{g/mL}$  para MFG. No se observó actividad antagonista en ninguna de las combinaciones analizadas.

**Tabla 7.** Interacción de la combinación de SRT + MFG. Modificado de Alanís-Ríos [71]

Cepa	CMI SRT ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI MFG ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI SRT/MFG ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\sum FIC_{\min}$	Interpretación
1	8	0.5	0.25/0.5	1.03	IND
2	8	0.5	0.25/0.5	1.03	IND
3	8	2	0.25/1	0.53	PSYN
4	4	1	4/0.06	1.06	IND
5	8	1	0.25/1	1.03	IND
6	8	1	0.25/1	1.03	IND
7	8	1	0.25/1	1.03	IND
8	8	1	0.25/1	1.03	IND
9	8	1	0.25/1	1.03	IND
10	8	1	0.25/1	1.03	IND
11	8	1	2/0.5	0.75	IND
12	8	1	0.25/1	1.03	IND

SRT: Sertralina. MFG: Micafungina. IND: Indiferencia. PSYN: Sinergia Parcial

**Tabla 8.** Interacción de la combinación de SRT + VRC. Modificado de Alanís-Ríos [71]

Cepa	CMI SRT ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI VRC ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI SRT/VRC ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\sum\text{FIC}_{\text{min}}$	Interpretación
1	8	0.25	4/0.03	0.62	IND
2	8	0.25	4/0.03	0.62	IND
3	8	0.25	2/0.06	0.49	SYN
4	4	0.25	2/0.03	0.62	IND
5	8	0.25	2/0.06	0.49	SYN
6	8	0.125	2/0.03	0.74	IND
7	8	0.125	2/0.06	0.37	SYN
8	8	0.125	2/0.06	0.74	IND
9	8	0.125	2/0.06	0.71	IND
10	8	0.125	2/0.06	0.71	IND
11	8	0.125	1/0.06	0.61	IND
12	8	0.125	0.5/0.06	0.54	PSYN

SRT: Sertralina. VRC: Voriconazol. IND: Indiferencia. PSYN: Sinergia Parcial SYN: Sinergia

Tabla 9. Interacción de la combinación de VRC + MFG. Modificado de Alanís-Ríos [71]

Cepa	CMI VRC ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI MFG ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI VRC/MFG ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\Sigma\text{FIC}_{\text{min}}$	Interpretación
1	0.25	0.5	0.125/0.25	1	IND
2	0.25	0.5	0.125/0.25	1	IND
3	0.25	2	0.06/0.25	0.37	SYN
4	0.25	1	0.03/0.5	0.62	IND
5	0.25	1	0.03/0.5	0.62	IND
6	0.25	1	0.06/0.25	0.49	SYN
7	0.25	1	0.06/0.25	0.49	SYN
8	0.125	1	0.03/0.5	0.74	IND
9	0.125	1	0.06/0.25	0.71	IND
10	0.125	0.5	0.06/0.25	0.71	IND
11	0.125	0.5	0.03/0.25	0.49	SYN
12	0.125	1	0.03/0.5	0.74	IND

VRC: Voriconazol. MFG: Micafungina. IND: Indiferencia. SYN: Sinergia.



De las interacciones antifúngicas presentes en las combinaciones de SRT con MFG y VRC, destaca la sinergia observada en la cepa 7 en la combinación de SRT + VRC, la cual presentó el valor de  $\sum FIC_{\min}$  más bajo, denotando una mayor actividad sinérgica. Esta cepa fue recuperada de sangre, orina, y del catéter central de inserción periférica. En los estudios de susceptibilidad realizados durante el brote del cual se recuperó la cepa, se reportó su resistencia a fluconazol y anfotericina B [9]. Con base en estos resultados, se seleccionó la cepa 7 como la ideal para los objetivos posteriores, utilizando SRT y VRC en monoterapia y terapia combinada.

## **6.2 Evaluación de la actividad antifúngica de la SRT en monoterapia en un modelo murino inmunosuprimido de candidemia por *C. auris***

La SRT en monoterapia mostró un efecto antifúngico dosis dependiente en todos los órganos analizados, encontrando diferencias estadísticamente significativas con la dosis de 10 mg/Kg/día (Figura 5, Tabla 10). Además, la supervivencia animal mostró una mejoría a partir de la dosis más baja de SRT comparada con el control, subiendo de un 40% a un 50%. Al aumentar la dosis a 5 y 10 mg/Kg/día de SRT, la supervivencia se elevó a un 60% (Figura 6).

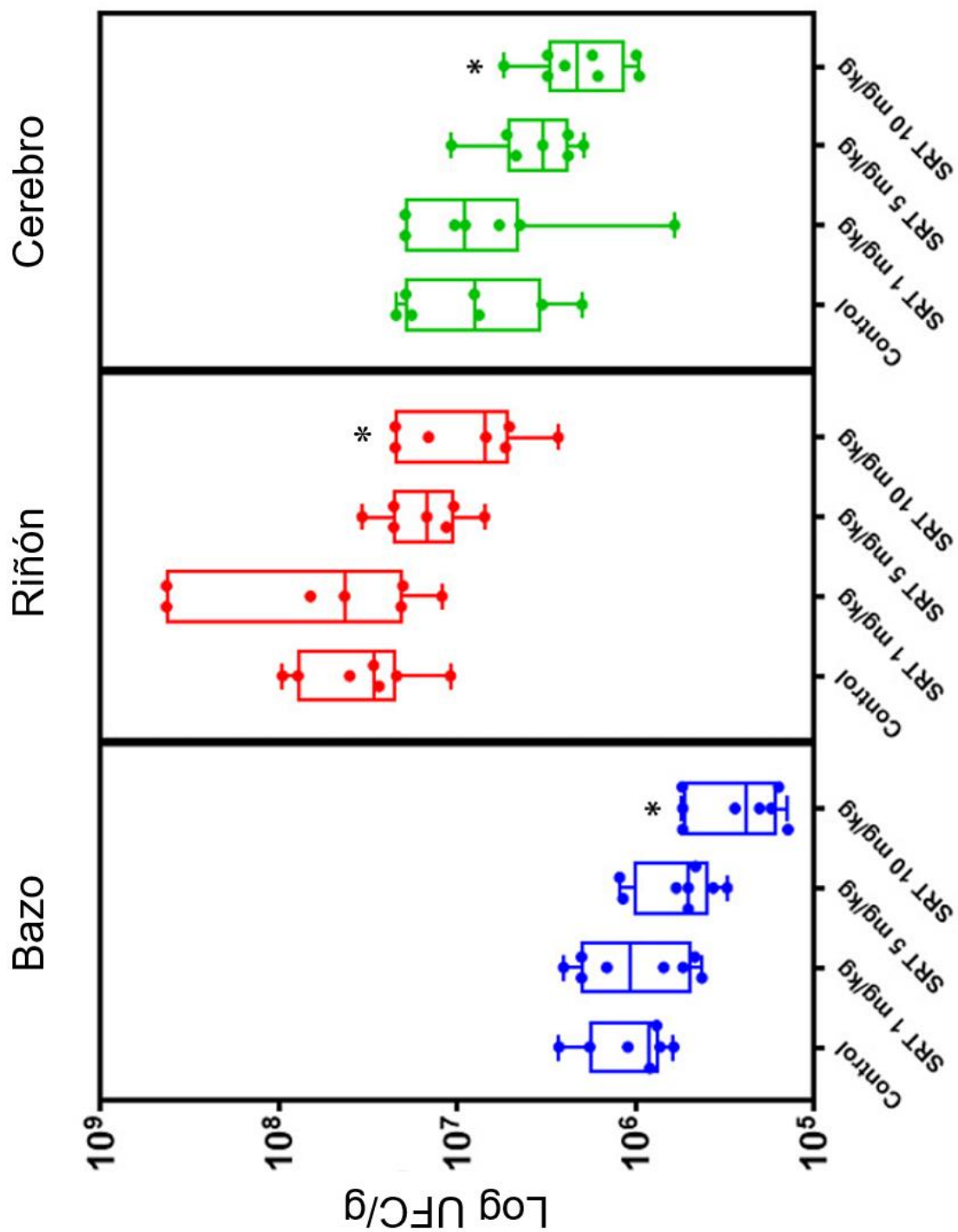
En todas las dosis analizadas de VRC se observó un efecto antifúngico estadísticamente significativo con respecto al control en bazo y riñón, mientras que en el cerebro este efecto aumentó de manera gradual conforme se aumentaba la dosis del antifúngico, alcanzando valores estadísticamente significativos con las dosis de 5 y 10 mg/Kg (Figura 7, Tabla 11). Por otra parte, la supervivencia animal mostró un incremento con todos los tratamientos evaluados, alcanzando

un 60% con la dosis más baja y hasta un 90% con la dosis más alta de VRC probada, presentando una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (Figura 8).

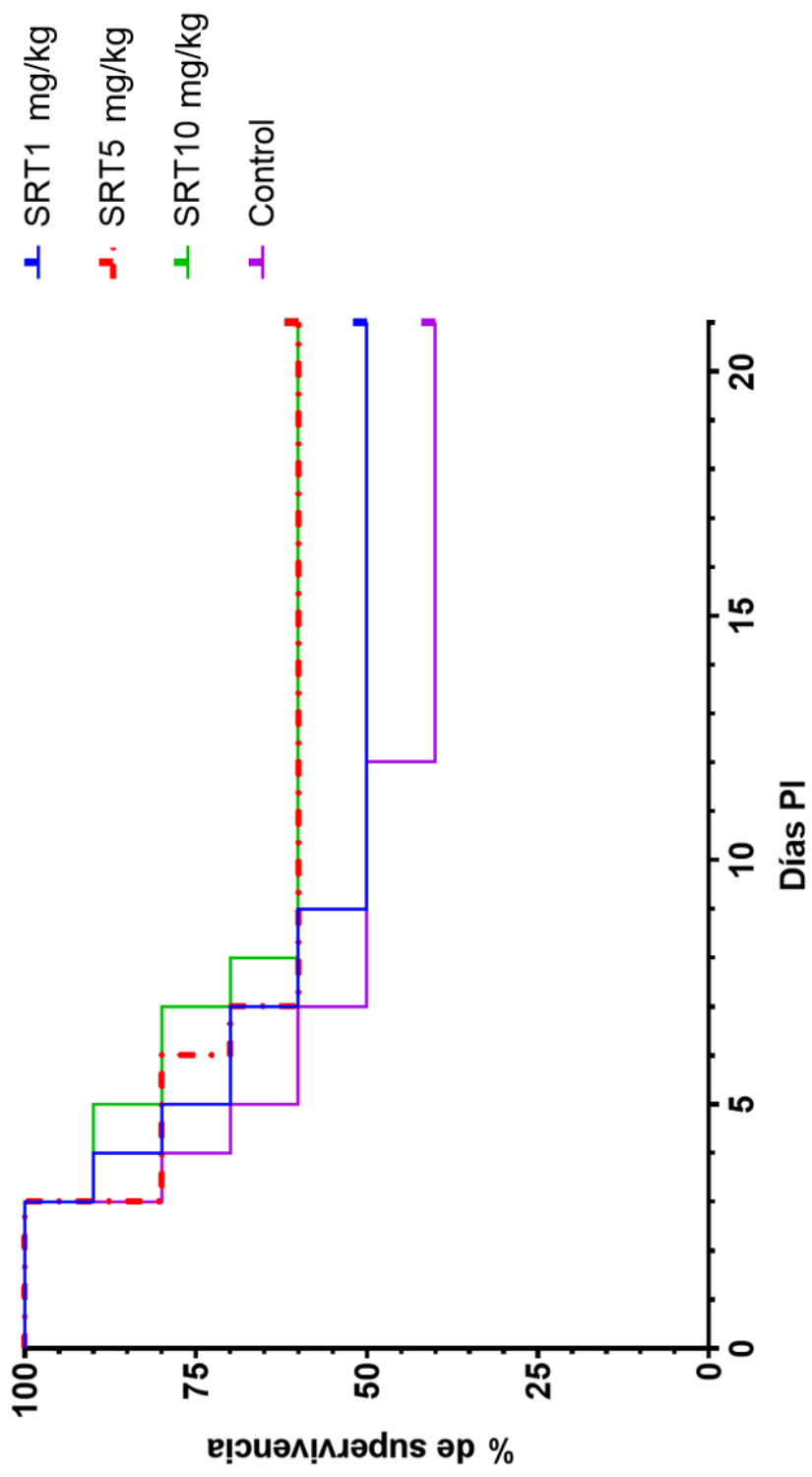
**Tabla 10.** Reducción de CF con las dosis de SRT probadas

Tratamiento	Órgano	Mediana	Reducción Log UFC	Valor de <i>P</i>
Control	Bazo	8.37x10 <sup>5</sup>		
	Riñón	2.97x10 <sup>7</sup>		
	Cerebro	8.07x10 <sup>6</sup>		
1 mg/Kg	Bazo	1.08x10 <sup>6</sup>	n/a	0.991
	Riñón	4.31x10 <sup>7</sup>	n/a	0.922
	Cerebro	9.09x10 <sup>6</sup>	n/a	0.999
5 mg/Kg	Bazo	5.09x10 <sup>6</sup>	n/a	0.293
	Riñón	1.49x10 <sup>7</sup>	0.29	0.760
	Cerebro	3.33x10 <sup>6</sup>	0.38	0.743
10 mg/Kg	Bazo	2.4x10 <sup>5</sup>	0.54	<b>0.005</b>
	Riñón	6.69x10 <sup>6</sup>	0.64	<b>0.046</b>
	Cerebro	2.13x10 <sup>6</sup>	0.57	<b>0.035</b>

UFC: Unidades Formadoras de Colonia



**Figura 5.** CF observada en los tratamientos de SRT analizados. \*=  $P \leq 0.05$ .



**Figura 6.** Supervivencia para los tratamientos de SRT analizados.

**Tabla 11.** Resultados obtenidos con las dosis analizadas de VRC en monoterapia.

Tratamiento	Órgano	Mediana	Reducción Log UFC	Valor de <i>P</i>
Control	Bazo	8.37x10 <sup>5</sup>		
	Riñón	2.97x10 <sup>7</sup>		
	Cerebro	8.07x10 <sup>6</sup>		
2.5 mg/Kg	Bazo	4.76x10 <sup>4</sup>	1.24	<b>0.034</b>
	Riñón	7.82x10 <sup>5</sup>	1.57	<b>0.035</b>
	Cerebro	2.50x10 <sup>6</sup>	0.5	0.171
5 mg/Kg	Bazo	5.22x10 <sup>4</sup>	1.20	<b>0.059</b>
	Riñón	8.03x10 <sup>5</sup>	1.57	<b>0.035</b>
	Cerebro	9.59x10 <sup>5</sup>	0.9	0.182
10 mg/Kg	Bazo	2.52x10 <sup>4</sup>	1.52	<b>0.002</b>
	Riñón	1.04x10 <sup>6</sup>	1.45	<b>0.012</b>
	Cerebro	1.5x10 <sup>5</sup>	1.73	<b>0.003</b>
20 mg/kg	Bazo	2.74x10 <sup>4</sup>	1.48	<b>0.001</b>
	Riñón	3.58x10 <sup>5</sup>	1.91	<b>0.002</b>
	Cerebro	6.02x10 <sup>4</sup>	2.12	<b>0.001</b>

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

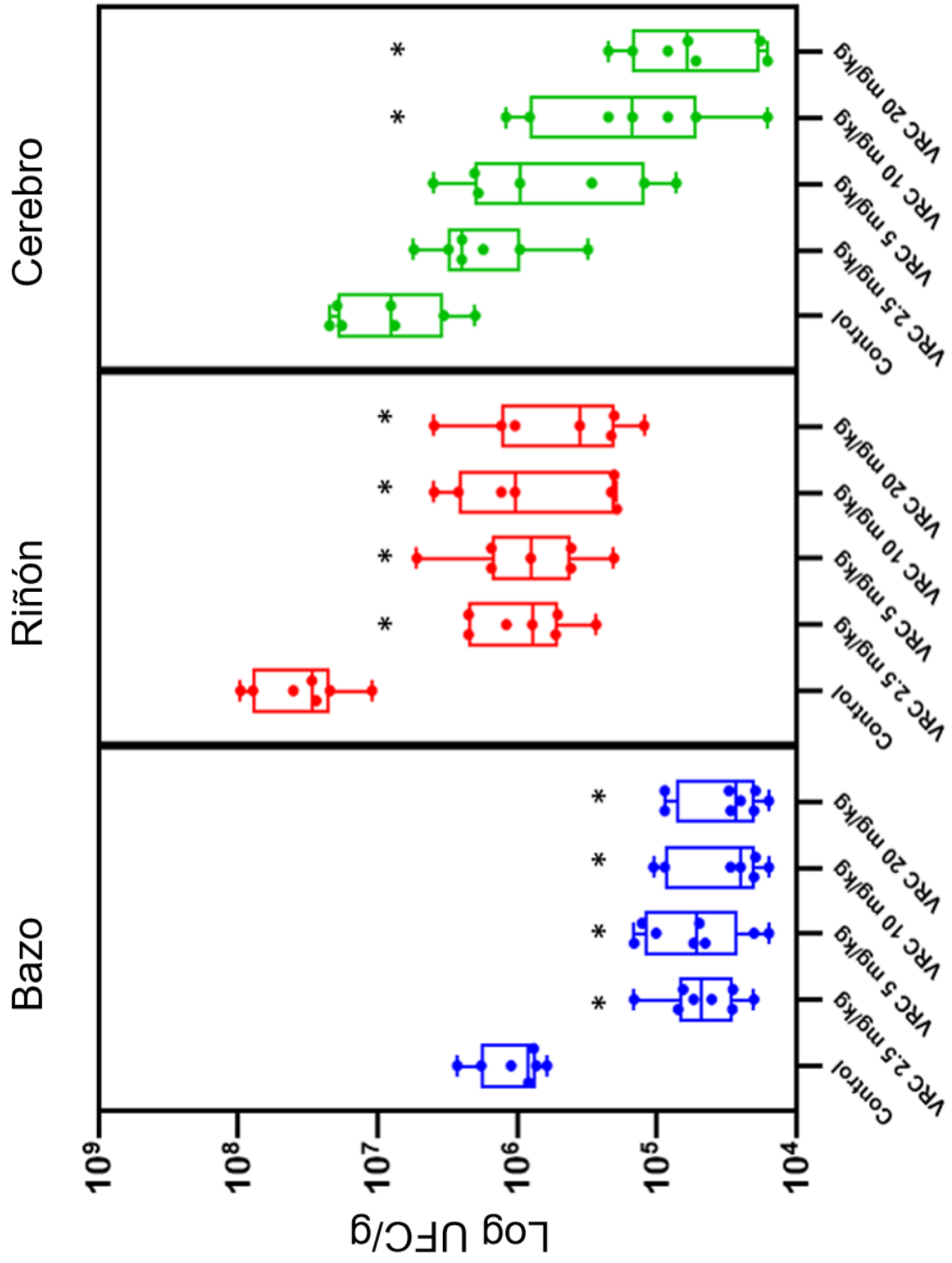
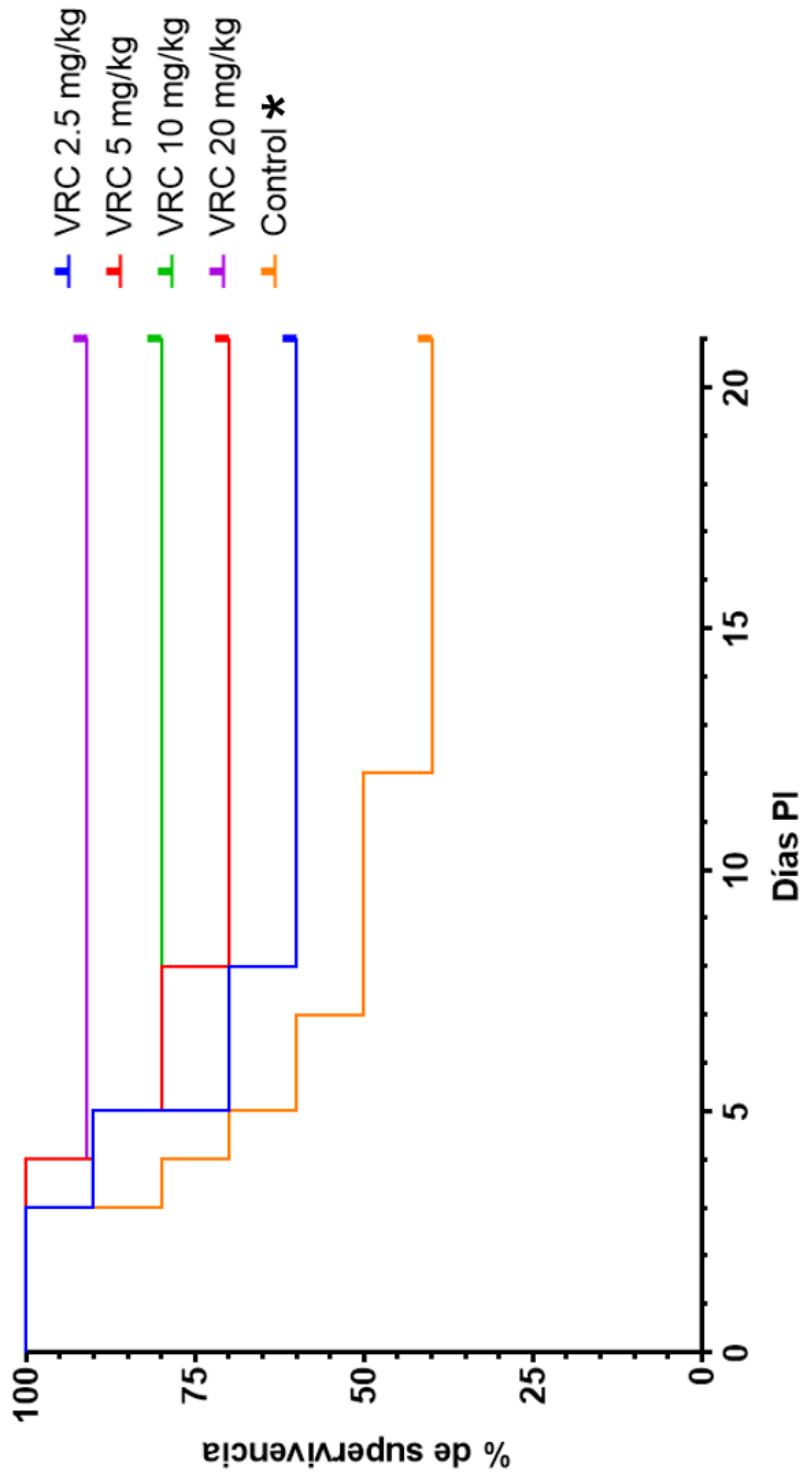


Figura 7. CF observada en los tratamientos de VCZ analizados. \* =  $P \leq 0.05$ .



**Figura 8.** Supervivencia animal para los tratamientos de VRC analizados. \* =  $P \leq 0.05$ .

En el análisis de la reducción logarítmica de CF de los tratamientos evaluados como efectivos al presentar una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 12), se observa que el tratamiento de SRT en monoterapia es más efectivo en la reducción de CF en bazo, mientras que el tratamiento de VRC resulta más efectivo en riñón. Para los posteriores análisis de terapia combinada, se seleccionó la dosis de 2.5 mg/Kg de VRC como una dosis efectiva, pero sub-óptima que permita el estudio de los fármacos en combinación.

**Tabla 12.** Reducción logarítmica de carga fúngica tisular promedio de los tratamientos.

Órgano	Tratamiento	Reducción Log UFC
Bazo	SRT	1.57
	VRC	1.36
Riñón	SRT	0.56
	VRC	1.54
Cerebro	SRT	0.67
	VRC	1.28

SRT: Sertralina. VRC: Voriconazol UFC: Unidades Formadoras de Colonia

### **6.3 Evaluación de la actividad antifúngica de la SRT en combinación con VRC en un modelo murino inmunosuprimido de candidemia por *C. auris***

La dosis sub-óptima de VRC (2.5 mg/Kg) en combinación con las dosis previamente evaluadas de SRT mostraron un efecto antifúngico dosis dependiente y más efectivo que la dosis sub-óptima de VRC en monoterapia. Todos los tratamientos evaluados mostraron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. En cerebro y riñón, todos los tratamientos presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la dosis sub-óptima de VRC (Figura 9). Además, la supervivencia animal incrementó en

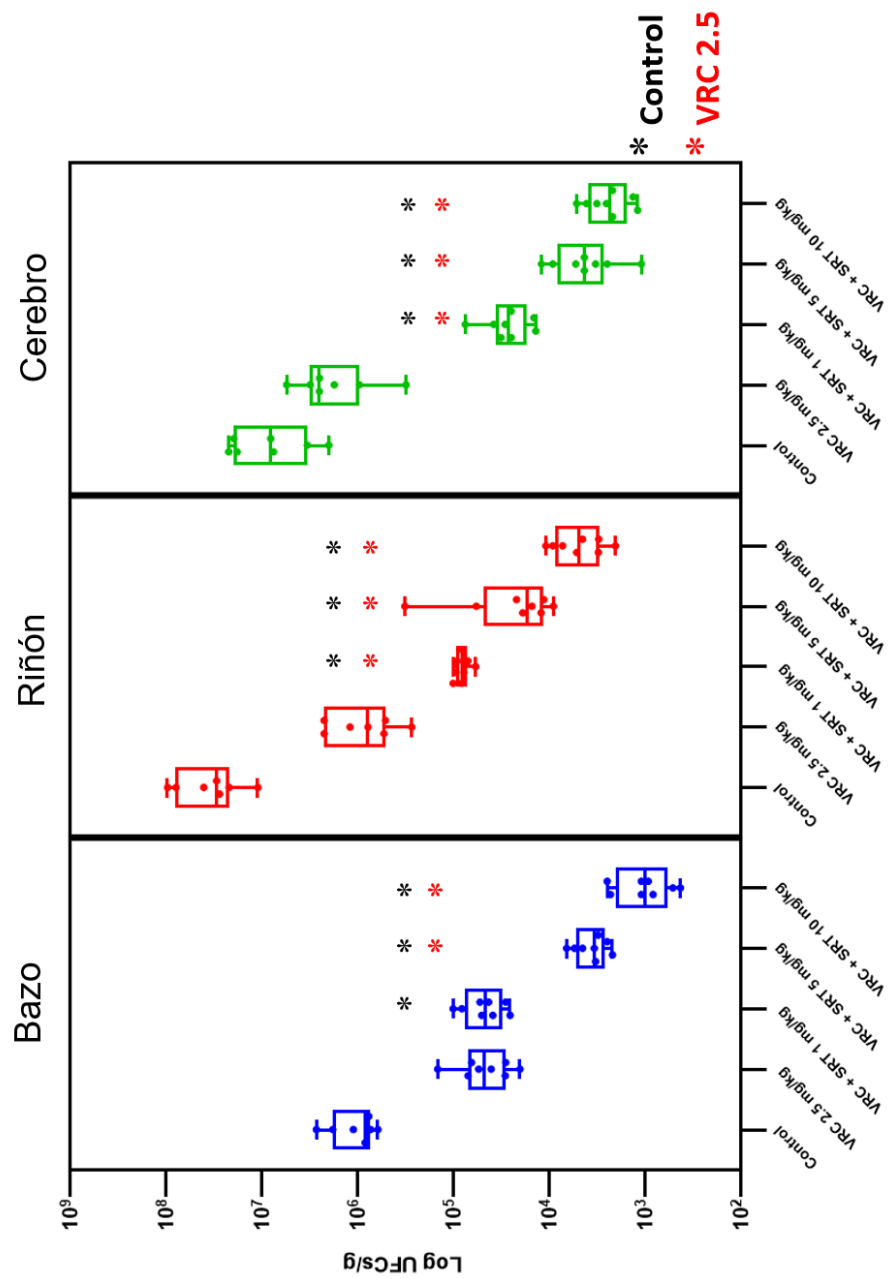


todos los grupos experimentales analizados, alcanzando un 80% con la dosis de SRT más alta en terapia combinada (Figura 10). Asimismo, al comparar la reducción logarítmica de CF tisular con respecto al control, en monoterapia y terapia combinada (Tabla 13), resulta notable una mayor reducción de CF en la terapia combinada, mostrando una mayor efectividad en riñón y cerebro.

**Tabla 13.** Reducción logarítmica de carga fúngica tisular promedio de los tratamientos en monoterapia y terapia combinada

Órgano	Tratamiento	Reducción Log UFC
Bazo	SRT	1.57
	VRC	1.36
	SRT+VRC	1.80
Riñón	SRT	0.56
	VRC	1.54
	SRT+VRC	2.95
Cerebro	SRT	0.67
	VRC	1.28
	SRT+VCZ	2.94

SRT: Sertralina. VRC: Voriconazol UFC: Unidades Formadoras de Colonia



**Figura 9.** CF observada en terapia combinada comparadas con una dosis subóptima de VRC y el grupo control. \* =  $P \leq 0.05$ .

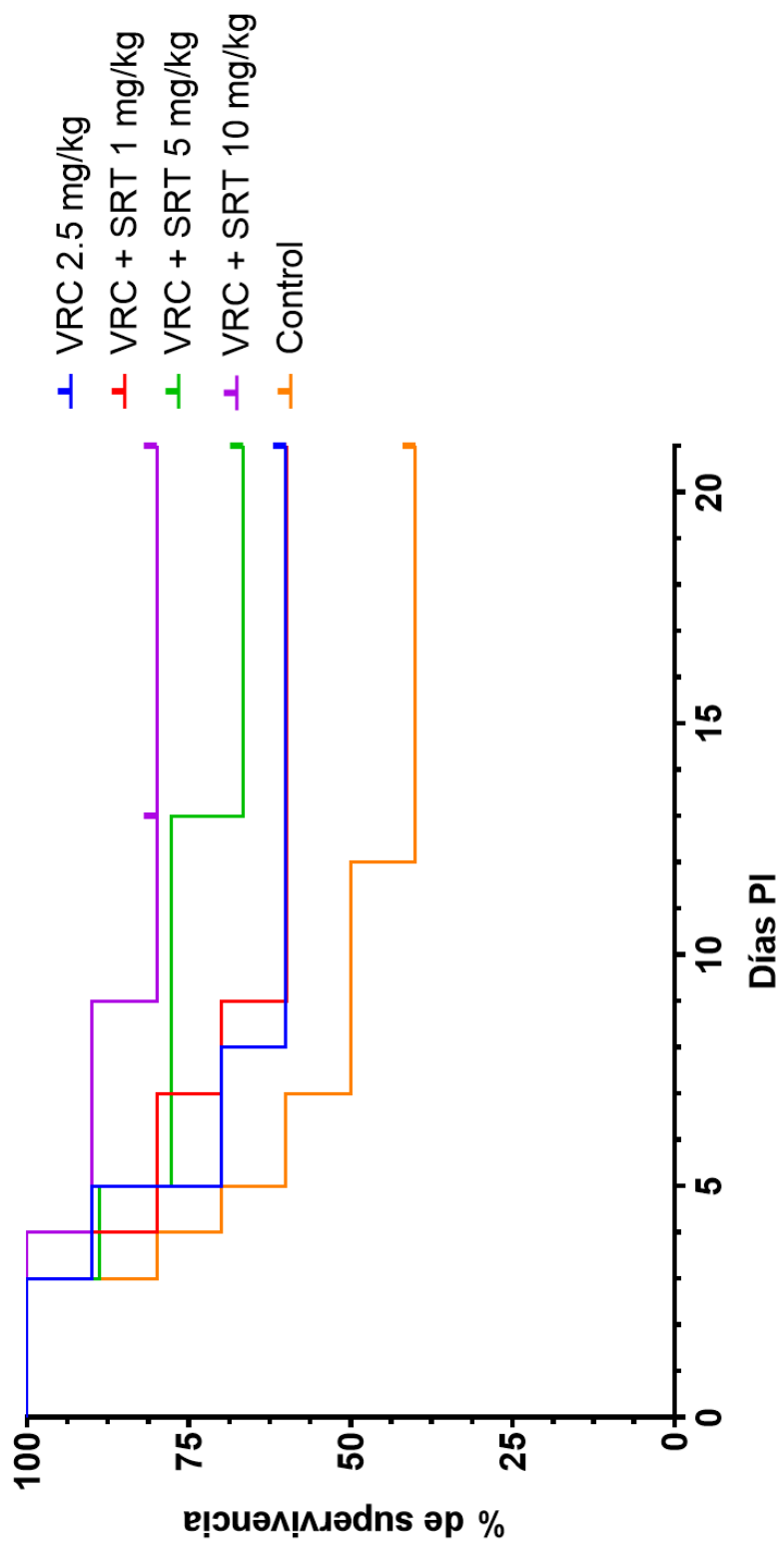


Figura 10. Supervivencia animal de la terapia combinada comparada con el grupo control y con una dosis subóptima de VRC en monoterapia.

## CAPÍTULO 7

### DISCUSIÓN

Desde su identificación en 2009 y su acelerada aparición en todo el mundo, se han generado una amplia cantidad de estudios evaluando el perfil multifármacorresistente encontrado comúnmente en aislados clínicos de *C. auris* y su actividad metabólica, así como la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento que resulten efectivas contra este hongo. Se sabe que las cepas de *C. auris* pertenecientes al clado I y IV presentan una mayor resistencia a antifúngicos con respecto del resto de los clados descritos. Debido a que la mayoría de los aislados de esta levadura presentan un alto número de mutaciones en el gen *ERG 11* [72], así como una sobreexpresión de bombas de eflujo [73], ambos asociados a una resistencia intrínseca a azoles, la cual puede ser observada en la alta cantidad de cepas aisladas que presentan resistencia a fluconazol. Por lo anterior, el CDC ha indicado que, aunque es posible que las cepas puedan tener susceptibilidad hacia otro tipo de azol, esta clase de antifúngicos no debe ser considerada como un tratamiento de primera línea [74]. Debido a esto, el CDC no definió un punto de corte específico para definir a *C. auris* como un organismo resistente a VRC. Los puntos de corte clínicos recomendados por el CLSI [75] para otras especies del mismo género definen que cepas con un CMI igual o mayor de 1-2 µg/mL de VRC (para *C. parapsilosis* y *C. krusei*, respectivamente) son consideradas resistentes, por lo cual algunos autores han determinado como un punto de corte epidemiológico tentativo de un fenotipo no-*wild type* a VRC a aquellas cepas de *C. auris* con un CMI igual o mayor a 1 µg/mL [76]. Los rangos de CMI de VRC observados en las cepas

analizadas en este estudio no mostraron en ningún caso un valor mayor a 0.25 µg/mL. Estos resultados concuerdan con los datos de susceptibilidad a VRC reportados previamente, donde se observó que una gran cantidad de cepas pertenecientes al clado IV presentaron resistencia a fluconazol, pero eran susceptibles a VRC [8], [9]. Cepas pertenecientes al clado I han mostrado un comportamiento similar, exhibiendo valores de CMI menores a 1 µg/mL para VRC, resaltando que en algunos casos, el uso de azoles, específicamente de VRC, pudiera ser considerado como un tratamiento de primera línea en aislados de *C. auris* pertenecientes a estos clados [77].

Con respecto a los valores de CMI obtenidos al utilizar MFG, el CDC recomienda emplear como punto de corte epidemiológico para *C. auris* valores de CMI < 4 µg/mL [74]. Ninguna de las cepas analizadas en este trabajo sobrepasó este valor, por lo que todas fueron susceptibles a MFG. Aunque ya existen reportes de cepas resistentes a MFG [11], la mayor parte de los aislados clínicos de *C. auris* suelen ser susceptibles a este antifúngico.

En el caso de SRT, los valores de CMI obtenidos (4-8 µg/mL) contrastan con los datos reportados por Gowri (20-40 µg/mL) [63]. Esta variación en las CMI observadas puede deberse al clado al que pertenecen las cepas estudiadas. Es importante destacar que el número de cepas que se utilizaron en este estudio (n=12) es superior al reportado previamente por Gowri (n=3).

En la combinación de SRT + MFG no se observó ninguna interacción correspondiente a sinergia. Aunque estos resultados pueden resultar desalentadores a primera vista, Heyn [78] reportó que al utilizar MFG en especies que resultan

susceptibles, las interacciones de sinergia pueden verse “enmascaradas” debido a la alta efectividad de este antifúngico.

Por otro lado, los resultados de la combinación de VRC + MFG mostraron el mayor número de interacciones sinérgicas. La sinergia entre una equinocandina y un triazol ya ha sido anteriormente reportada, resaltando que al utilizar fluconazol la interacción antifúngica suele ser indiferente, mientras que la combinación de una equinocandina (como MFG) con VRC resulta en sinergia en todas las cepas analizadas por Fakhim (n=10) [45]. La cantidad de interacciones sinérgicas reportadas en este estudio es menor a la reportada por Fakhim, por lo cual es posible que distintas combinaciones de fármacos resulten más efectivas en cepas pertenecientes a otros clados, tomando en cuenta la susceptibilidad antifúngica reportada en cada uno de ellos.

Al analizar la combinación de SRT + VRC se obtuvo una interacción antifúngica sinérgica en el 16% de las cepas analizadas, así como una sinergia parcial en otra de las cepas utilizadas en el estudio. Aunque no existen estudios que examinen el uso de VRC en combinación con SRT contra *C. auris*, se ha reportado con anterioridad la actividad antifúngica *in vitro* de esta última[63], así como actividad antifúngica sinérgica al utilizar VRC en combinación con otros fármacos, tanto en estudios *in vitro* como en reportes de casos clínicos [79] [80].

En la monoterapia de VRC, puede observarse una alta efectividad del tratamiento con las dosis evaluadas. Esto concuerda con el estudio *in vivo* realizado por Gamal en un modelo murino inmunosuprimido utilizando dosis similares de VRC [81], en donde una dosis de 12 mg/Kg incrementó la tasa de supervivencia animal hasta un 80%. Aunque no existen reportes del efecto antifúngico *in vivo* de SRT contra *C.*

*auris*, se han publicado estudios acerca de la actividad antifúngica de este fármaco contra otras especies de hongos. En este sentido, Zhai [58] demostró en su estudio que la SRT a una dosis de 2 mg/Kg tiene un efecto antifúngico similar a la misma dosis de fluconazol en un modelo murino de infección por especies pertenecientes al género *Cryptococcus*, reduciendo significativamente la CF con respecto al control. Asimismo, Treviño-Rangel [62] reportó que una dosis de SRT de 10 mg/Kg resulta en una reducción de CF en pulmón estadísticamente significativa respecto al control y comparable a la misma dosis de VRC. Estos resultados son similares a lo observado en este estudio, en donde la dosis más alta de SRT presentó un comportamiento similar en la supervivencia animal a la dosis más baja de VRC evaluada, así como una reducción estadísticamente significativa en la CF con respecto al control en todos los órganos analizados.

La terapia combinada de SRT + VRC mostró un mayor efecto antifúngico en comparación con las dosis analizadas en monoterapia. La alta efectividad de utilizar VRC en combinación con otro fármaco ya ha sido reportada con anterioridad por Eldesouky [82], quien utilizó VRC en combinación con sulfametoxazol, un antibiótico considerado como un fármaco de re-propósito debido a su actividad antifúngica contra diferentes especies de hongos [83],[84], en un modelo de infección en el nemátodo *C. elegans*. Al administrar los fármacos en combinación, Eldesouky encontró una tasa de supervivencia del 80% de los nemátodos, siendo un tratamiento más efectivo que los fármacos solos. Esta mejoría en la supervivencia animal al administrar fármacos en combinación puede observarse en los resultados obtenidos en este trabajo, en donde los tratamientos con la dosis sub-óptima de VRC

en conjunto con dosis de SRT de 5 y 10 mg/Kg incrementaron la supervivencia animal con respecto al control y la dosis sub-óptima de VRC administrada sola.

Aunque no se han reportado modelos murinos utilizando VRC en combinación con SRT, ni con otros fármacos contra *C. auris*, se ha comunicado que el uso de algunos fármacos de re-propósito pueden presentar una actividad antifúngica sinérgica contra este patógeno emergente. Tal es el caso del estudio publicado por Elgammal [85], en donde el uso del atazanavir, un inhibidor de proteasa del VIH en combinación con itraconazol resulta en la reducción estadísticamente significativa de la CF renal con respecto al control y al tratamiento con itraconazol solo en un modelo murino inmunosuprimido. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos del ensayo *in vivo* realizado, en donde la reducción de la CF resultó ser significativamente mayor con respecto al control y a la dosis más baja de VRC evaluada.



## **CAPÍTULO 8**

### **CONCLUSIONES**

La SRT mostró actividad antifúngica *in vitro* contra todas las cepas de *C. auris* analizadas en el presente estudio. La combinación de MFG + SRT exhibió solamente una sinergia parcial. Sin embargo, las combinaciones de VRC + SRT y VRC+ MFG mostraron un efecto antifúngico sinérgico en el 33% de las cepas probadas. En el modelo animal adoptado, el efecto antifúngico de la SRT se evidenció al observarse una reducción dosis-dependiente de CF y una notable mejoría en la supervivencia, especialmente con la dosis más alta analizada, la cual fue comparable con la dosis más baja de VRC. Al administrarse ambos fármacos en terapia combinada, la efectividad antifúngica, en términos de CF y supervivencia animal, fue superior en comparación con la monoterapia.

La hipótesis experimental planteada se aceptó. El efecto antifúngico de la terapia combinada con SRT fue mayor que el de la monoterapia, representando una estrategia factible para el manejo clínico de las infecciones por *C. auris*, ampliando así las limitadas opciones terapéuticas actualmente disponibles.

## **CAPÍTULO 9**

### **PERSPECTIVAS**

De este trabajo se desprenden las siguientes perspectivas:

- ❖ Analizar otros posibles fármacos de re-propósito sugeridos para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *C. auris*.
  
- ❖ Buscar interacciones sinérgicas utilizando SRT y distintas opciones terapéuticas recomendadas por la CDC para el tratamiento de infecciones por *C. auris*, incluyendo las terapias combinadas de antifúngicos ya sugeridas.
  
- ❖ Estudiar el mecanismo de acción antifúngico de la SRT, específicamente en *C. auris*.

## CAPÍTULO 10

### REFERENCIAS

1. Satoh, K., et al., *Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital*. Microbiol Immunol, 2009. **53**(1): p. 41-4.
2. Kim, M.N., et al., *Candida haemulonii and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(6): p. e57-61.
3. Lee, W.G., et al., *First three reported cases of nosocomial fungemia caused by Candida auris*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(9): p. 3139-42.
4. Chowdhary, A., et al., *Multidrug-resistant endemic clonal strain of Candida auris in India*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014. **33**(6): p. 919-26.
5. Magobo, R.E., et al., *Candida auris-associated candidemia, South Africa*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(7): p. 1250-1.
6. Emara, M., et al., *Candida auris candidemia in Kuwait, 2014*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(6): p. 1091-2.
7. Calvo, B., et al., *First report of Candida auris in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia*. J Infect, 2016. **73**(4): p. 369-74.
8. Ayala-Gaytán, J.J., et al., *First case of Candida auris isolated from the bloodstream of a Mexican patient with serious gastrointestinal complications from severe endometriosis*. Infection, 2021. **49**(3): p. 523-525.
9. Villanueva-Lozano, H., et al., *Outbreak of Candida auris infection in a COVID-19 hospital in Mexico*. Clin Microbiol Infect, 2021.
10. Organization, W.H., *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*, WHO, Editor. 2022.
11. Lockhart, S.R., et al., *Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses*. Clin Infect Dis, 2017. **64**(2): p. 134-140.
12. Chow, N.A., et al., *Potential Fifth Clade of Candida auris, Iran, 2018*. Emerg Infect Dis, 2019. **25**(9): p. 1780-1781.
13. De Luca, D.G., et al., *Four genomic clades of Candida auris identified in Canada, 2012-2019*. Med Mycol, 2022. **60**(1).
14. Muñoz, J.F., et al., *Clade-specific chromosomal rearrangements and loss of subtelomeric adhesins in Candida auris*. Genetics, 2021. **218**(1).
15. Du, H., et al., *Candida auris: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence*. PLOS Pathogens, 2020. **16**(10): p. e1008921.
16. Neppelenbroek, K.H., et al., *Identification of Candida species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques*. Oral Dis, 2014. **20**(4): p. 329-44.
17. Kathuria, S., et al., *Multidrug-Resistant Candida auris Misidentified as Candida haemulonii: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization and Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its*

- Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method.* Journal of Clinical Microbiology, 2015. **53**(6): p. 1823-1830.
18. Ambaraghassi, G., et al., *Identification of Candida auris by Use of the Updated Vitek 2 Yeast Identification System, Version 8.01: a Multilaboratory Evaluation Study.* J Clin Microbiol, 2019. **57**(11).
  19. Snayd, M., et al., *Misidentification of Candida auris by RapID Yeast Plus, a Commercial, Biochemical Enzyme-Based Manual Rapid Identification System.* J Clin Microbiol, 2018. **56**(5).
  20. Ruiz Gaitán, A.C., et al., *Nosocomial fungemia by Candida auris: First four reported cases in continental Europe.* Rev Iberoam Micol, 2017. **34**(1): p. 23-27.
  21. Mizusawa, M., et al., *Can Multidrug-Resistant Candida auris Be Reliably Identified in Clinical Microbiology Laboratories?* J Clin Microbiol, 2017. **55**(2): p. 638-640.
  22. Černáková, L., et al., *Candida auris: A Quick Review on Identification, Current Treatments, and Challenges.* International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(9): p. 4470.
  23. Wattal, C., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017. **36**(5): p. 807-812.
  24. Lockhart, S.R., et al., *Candida auris for the clinical microbiology laboratory: Not your grandfather's Candida species.* Clin Microbiol Newsl, 2017. **39**(13): p. 99-103.
  25. Sexton, D.J., et al., *Direct Detection of Emergent Fungal Pathogen Candida auris in Clinical Skin Swabs by SYBR Green-Based Quantitative PCR Assay.* J Clin Microbiol, 2018. **56**(12).
  26. Walchak, R.C., et al., *Candida auris Direct Detection from Surveillance Swabs, Blood, and Urine Using a Laboratory-Developed PCR Method.* Journal of Fungi, 2020. **6**(4): p. 224.
  27. Lima, A., et al., *A TaqMan Probe-Based Real-Time PCR Assay for the Rapid Identification of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogen Candida auris on the BD Max System.* J Clin Microbiol, 2019. **57**(7).
  28. Ruiz-Gaitán, A.C., et al., *Molecular identification of Candida auris by PCR amplification of species-specific GPI protein-encoding genes.* Int J Med Microbiol, 2018. **308**(7): p. 812-818.
  29. Alvarado, M., et al., *Identification of Candida auris and related species by multiplex PCR based on unique GPI protein-encoding genes.* Mycoses, 2021. **64**(2): p. 194-202.
  30. Larkin, E., et al., *The Emerging Pathogen Candida auris: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017. **61**(5): p. 10.1128/aac.02396-16.
  31. Borman, A.M., A. Szekely, and E.M. Johnson, *Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen Candida auris and Other Key Pathogenic Candida Species.* mSphere, 2016. **1**(4).
  32. Brown, J.L., et al., *Candida auris Phenotypic Heterogeneity Determines Pathogenicity In Vitro.* mSphere, 2020. **5**(3).
  33. Ruiz, G.B., et al., *Pseudohyphal Growth of the Emerging Pathogen Candida auris Is Triggered by Genotoxic Stress through the S Phase Checkpoint.* mSphere, 2020. **5**(2): p. 10.1128/msphere.00151-20.

34. Yue, H., et al., *Filamentation in Candida auris, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch*. Emerging Microbes & Infections, 2018. **7**(1): p. 1-13.
35. Szekely, A., A.M. Borman, and E.M. Johnson, *Candida auris Isolates of the Southern Asian and South African Lineages Exhibit Different Phenotypic and Antifungal Susceptibility Profiles In Vitro*. J Clin Microbiol, 2019. **57**(5).
36. Horton, M.V. and J.E. Nett, *Candida auris infection and biofilm formation: going beyond the surface*. Curr Clin Microbiol Rep, 2020. **7**(3): p. 51-56.
37. Alvarez-Moreno, C.A., et al., *The Mortality Attributable to Candidemia in C. auris Is Higher than That in Other Candida Species: Myth or Reality?* Journal of Fungi, 2023. **9**(4): p. 430.
38. Garcia-Bustos, V., et al., *What Do We Know about Candida auris? State of the Art, Knowledge Gaps, and Future Directions*. Microorganisms, 2021. **9**(10): p. 2177.
39. Muñoz, J.F., et al., *Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in Candida auris and related emerging species*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 5346.
40. Ademe, M. and F. Girma, *Candida auris: From Multidrug Resistance to Pan-Resistant Strains*. Infect Drug Resist, 2020. **13**: p. 1287-1294.
41. Jacobs, S.E., et al., *Candida auris Pan-Drug-Resistant to Four Classes of Antifungal Agents*. Antimicrob Agents Chemother, 2022. **66**(7): p. e0005322.
42. Fohrer, C., et al., *Antifungal combination treatment: a future perspective*. Int J Antimicrob Agents, 2006. **27 Suppl 1**: p. 25-30.
43. Odds, F.C., *Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them*. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(1): p. 1.
44. Bidaud, A.L., et al., *In vitro antifungal combination of flucytosine with amphotericin B, voriconazole, or micafungin against Candida auris shows no antagonism*. Antimicrob Agents Chemother, 2019.
45. Fakhim, H., et al., *In Vitro Interactions of Echinocandins with Triazoles against Multidrug-Resistant Candida auris*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(11).
46. Balla, N., et al., *Synergistic Interaction of Caspofungin Combined with Posaconazole against FKS Wild-Type and Mutant Candida auris Planktonic Cells and Biofilms*. Antibiotics, 2022. **11**(11): p. 1601.
47. Pappas, P.G., et al., *Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America*. Clinical Infectious Diseases, 2015. **62**(4): p. e1-e50.
48. Mulet Bayona, J.V., et al., *Characteristics and Management of Candidaemia Episodes in an Established Candida auris Outbreak*. Antibiotics (Basel), 2020. **9**(9).
49. Farha, M.A. and E.D. Brown, *Drug repurposing for antimicrobial discovery*. Nat Microbiol, 2019. **4**(4): p. 565-577.
50. Parvathaneni, V., et al., *Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process*. Drug Discov Today, 2019. **24**(10): p. 2076-2085.
51. Tan, K.R., et al., *Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis*. Am J Trop Med Hyg, 2011. **84**(4): p. 517-31.
52. Krysan, D.J. and L. Didone, *A high-throughput screening assay for small molecules that disrupt yeast cell integrity*. J Biomol Screen, 2008. **13**(7): p. 657-64.
53. Zeng, X., et al., *Drug repurposing: Antimicrobial and antibiofilm effects of penfluridol against Enterococcus faecalis*. Microbiologyopen, 2021. **10**(1): p. e1148.

54. Kim, J.H. and A.R. Scialli, *Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease*. Toxicol Sci, 2011. **122**(1): p. 1-6.
55. Kupiec, K.E., et al., *Zidovudine as modern day salvage therapy for HIV infection*. AIDS Patient Care STDS, 2014. **28**(11): p. 570-4.
56. Krzyżek, P., et al., *In Vitro Activity of Sertraline, an Antidepressant, Against Antibiotic-Susceptible and Antibiotic-Resistant Helicobacter pylori Strains*. Pathogens, 2019. **8**(4): p. 228.
57. Lass-Flörl, C., et al., *Antifungal Activity against Candida Species of the Selective Serotonin-Reuptake Inhibitor, Sertraline*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **33**(12): p. e135-e136.
58. Zhai, B., et al., *The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(7): p. 3758-66.
59. Treviño-Rangel Rde, J., et al., *Activity of sertraline against Cryptococcus neoformans: in vitro and in vivo assays*. Med Mycol, 2016. **54**(3): p. 280-6.
60. Villanueva-Lozano, H., et al., *In vitro inhibitory activity of sertraline against clinical isolates of Sporothrix schenckii*. Rev Iberoam Micol, 2019. **36**(3): p. 139-141.
61. Heller, I., et al., *Serotonin (5-HT) enhances the activity of amphotericin B against Aspergillus fumigatus in vitro*. Int J Antimicrob Agents, 2004. **24**(4): p. 401-4.
62. Trevino-Rangel, R.J., et al., *In vivo evaluation of the antifungal activity of sertraline against Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother, 2019. **74**(3): p. 663-666.
63. Gowri, M., et al., *Sertraline as a promising antifungal agent: inhibition of growth and biofilm of Candida auris with special focus on the mechanism of action in vitro*. J Appl Microbiol, 2020. **128**(2): p. 426-437.
64. Borman, A.M., *The Use of Galleria mellonella Larvae to Study the Pathogenicity and Clonal Lineage-Specific Behaviors of the Emerging Fungal Pathogen Candida auris, in Candida auris: Methods and Protocols*, A. Lorenz, Editor. 2022, Springer US: New York, NY. p. 287-298.
65. Wurster, S., N.D. Albert, and D.P. Kontoyiannis, *Drosophila melanogaster as a Rapid and Reliable In Vivo Infection Model to Study the Emerging Yeast Pathogen Candida auris, in Candida auris: Methods and Protocols*, A. Lorenz, Editor. 2022, Springer US: New York, NY. p. 299-316.
66. Zuluaga, A.F., et al., *Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases*. BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 55.
67. Xin, H., et al., *Experimental Mouse Models of Disseminated Candida auris Infection*. mSphere, 2019. **4**(5).
68. Herrada, J., et al., *An Immunocompromised Mouse Model of Candida auris Systemic Infection, in Candida auris: Methods and Protocols*, A. Lorenz, Editor. 2022, Springer US: New York, NY. p. 317-328.
69. CLSI, *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4th edition*. 2017, Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA.
70. Mele, T.S., *Scoring Sepsis Severity in Mice*. Methods Mol Biol, 2021. **2321**: p. 155-159.
71. Alanís-Ríos, S.A., et al., *Evaluation of the synergistic antifungal activity of micafungin and voriconazole plus sertraline against Candida auris*. Braz J Microbiol, 2022. **53**(4): p. 2003-2008.
72. Rybak, J.M., et al., *Delineation of the Direct Contribution of Candida auris ERG11 Mutations to Clinical Triazole Resistance*. Microbiol Spectr, 2021. **9**(3): p. e0158521.

73. Li, J., et al., *Novel ERG11 and TAC1b mutations associated with azole resistance in Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2023. **65**(5).
74. CDC. *Antifungal Susceptibility testing and Interpretation | Candida auris | Fungal Diseases |*. 2020 [cited 2023 30 Jun].
75. CLSI, *Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters, 5th edition*. 2018, Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA.
76. Arendrup, M.C., et al., *Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for Candida auris and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(6).
77. Ohashi, Y., et al., *The first case of clade I Candida auris candidemia in a patient with COVID-19 in Japan*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2023. **29**(7): p. 713-717.
78. Heyn, K., et al., *Effect of voriconazole combined with micafungin against Candida, Aspergillus, and Scedosporium spp. and Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(12): p. 5157-9.
79. O'Brien, B., S. Chaturvedi, and V. Chaturvedi, *In Vitro Evaluation of Antifungal Drug Combinations against Multidrug-Resistant Candida auris Isolates from New York Outbreak*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020. **64**(4).
80. Vitale, R.G., *Role of Antifungal Combinations in Difficult to Treat Candida Infections*. *J Fungi (Basel)*, 2021. **7**(9).
81. Gamal, A., et al., *Efficacy of Voriconazole, Isavuconazole, Fluconazole, and Anidulafungin in the Treatment of Emerging Candida auris Using an Immunocompromised Murine Model of Disseminated Candidiasis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021. **65**(9): p. e0054921.
82. Eldesouky, H.E., et al., *Synergistic interactions of sulfamethoxazole and azole antifungal drugs against emerging multidrug-resistant Candida auris*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018. **52**(6): p. 754-761.
83. Hida, S., et al., *Anti-fungal activity of sulfamethoxazole toward Aspergillus species*. *Biol Pharm Bull*, 2005. **28**(5): p. 773-8.
84. Davis, H.R., D.S. Ashcraft, and G.A. Pankey, *In vitro interaction of fluconazole and trimethoprim-sulfamethoxazole against Candida auris using ETEST and checkerboard methods*. *J Investig Med*, 2021. **69**(1): p. 96-99.
85. Elgammal, Y., E.A. Salama, and M.N. Seleem, *Atazanavir Resensitizes Candida auris to Azoles*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2023. **67**(5): p. e0163122.