



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana
Bioteknologia Gradua

***Candida auris*-en zelula-paretako geneen delezioa duten mutanteen karakterizazioa eta haien birulentziaren azterketa**

Egilea:
Iker Dominguez Basterretxea
Zuzendariak:
Elena Eraso Barrio
Katherine Miranda Cadena

© 2023, Iker Dominguez Basterretxea

1. LABURPENA.....	1
2. SARRERA	1
2.1. <i>Candida</i> ETA KANDIDIASIAK.....	1
2.2. <i>Candida auris</i>	2
2.2.1. <i>C. auris</i> birulentzia faktoreak	2
3. HIPOTESIA ETA HELBURUAK.....	3
3.1. HIPOTESIA.....	3
3.2. HELBURU NAGUSIA	3
3.3. BIGARREN MAILAKO HELBURUA	3
4. MATERIAL ETA METODOAK.....	3
4.1. MIKROORGANISMO ETA KULTIBO BALDINTZAK.....	3
4.2. BIOFILM EKOIZPEN AZTERKETA.....	5
4.2.1. Biofilmaren aktibitate metabolikoaren determinazioa.....	6
4.2.2. Biofilmaren biomasaren determinazioa	6
4.3. BIRULENTZIA AZTERKETA <i>IN VIVO</i> <i>G. mellonella</i> EREDUAN	7
4.4. BIRULENTZIA AZTERKETA <i>IN VIVO</i> <i>C. elegans</i> EREDUAN	7
4.5. ANALISI ESTADISTIKOA.....	8
5. EMAITZAK	8
5.1. BIOFILM EKOIZPEN AZTERKETA.....	8
5.2. BIRULENTZIA AZTERKETA <i>IN VIVO</i> <i>G. mellonella</i> EREDUAN	10
5.3. BIRULENTZIA AZTERKETA <i>IN VIVO</i> <i>C. elegans</i> EREDUAN	13
6. EZTABAIDA	15
7. ONDORIOAK.....	17
8. BIBLIOGRAFIA.....	17

1. LABURPENA

Candida auris farmako askorekiko erresistentzia garatzen ari den onddo patogenoa da. Espezie honen patogenezitateari buruzko hainbat ikerketen berri izan arren, *C. auris*-en birulentziari buruzko ezagutza mugatua da oraindik. Gradu amaierako lan honetan *C. auris*-en patogenezitatean eragina duen adhesio birulentzia faktorea aztertzea da helburu. Horretarako, *C. auris* andui mutante desberdinak baliatu ziren *in vivo* probak eta biofilm entseguak burutzeko. Emaitzarik esanguratsuenak mutazio-kontzentrazio handieneko anduiarekin lortu ziren (*iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ*), bai *in vivo* entseguetan *Galleria mellonella* intsektuan eta *Caenorhabditis elegans* nematodoan, bai biofilm ekoizpenean. Hortik ondoriozta daiteke, *C. auris*-en adhesioan parte hartzen duten zelula-paretako proteinak kodetzen dituzten gene-mutazioen metaketak jaitsi egin dezakeela mikroorganismoaren atxikitze gaitasuna, horren birulentzia murriztuz. Hala ere, ezin daiteke zehaztu proteina horietako bakoitzak adhesioan duen garrantzia, izan ere, mutazio konkrituak dituzten anduiek ez zuten emaitza adierazgarriarik aurkeztu.

2. SARRERA

2.1. *Candida* ETA KANDIDIASIAK

Kandidiasia gaixotasun ohikoa da, gaur egungo gizartean ere intzidentzia handia aurkezten duena (Miró et al., 2017). *Candida*-k munduko mikosi oportunisten eragile garrantzitsuen izaten jarraitzen du (Del Rocío Reyes Montes M., 2017; Pfaller MA, 2007). Gainera, onddo hau Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) osatutako lehentasunezko patogenoen zerrendan dago (Osasunaren Mundu Erakundea, 2022). Nahiz eta medikuntzaren garapenari esker aurrerapenak lortu eta kandidiasia gaixotasunak heriotza tasa oso altuak ez izan, immunoeskasiak edo azpiko gaixotasun larriak dituzten pazienteetan ondorio latzak izan ditzake. Kandidiasia inbaditzailea izan dezaketen pazienteen artean minbizia duten paziente neutropenikoak, prozesu kirurgikoen eraginpean dauden pazienteak, jaioberri goiztiarrak edo zainketa intentsiboetako unitatekoak (ZIU) aurki daitezke (Pfaller M.A., 2007).

Kasu gehienetan gaixotasun honetan *Candida* espezie bakarra dago inplikaturik: *Candida albicans* (Achkar J.M., 2010; Aguilar et al., 2020). Kultiboetatik isolatutako espezieen %85-%95a *C. albicans* espezieari dagokio. Gainontzeko isolaketak, genero berdineko beste espezie batzuei dagokie. Horien artean, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* eta

Candida glabrata (Aguilar et al., 2020; Fidel P., 2007). Infekzio fungiko inbaditzaileen adibide klinikorik ohikoena kandidemia da, hau da, *Candida*-k eragindako odolaren infekzioa (Quindos et al., 2018).

2.2. *Candida auris*

Candida auris mundu mailan inpaktu handia duen legamia emergentea da. 2009an aurkitu zuten lehen aldiz Japonian eta geroztik, hainbat kontinentetan eta 35 herrialde baino gehiagotan aurkitu da, Antartikan izan ezik (Sato et al., 2009; Shaukat et al., 2020). *C. auris* garrantzi handiko mikroorganismoa da; izan ere, espezie honen anduien %90ak tratamendu gehienetan erabiltzen den flukonazol farmakoarekiko erresistentzia aurkezten dute eta gainera, espezie honek beste antifungiko batzuekiko erresistentzia aurkez dezake (García et al., 2020). Espezie hau kandidemia bezalako infekzio inbaditzaileekin eta heriotza maila handiekin erlazionatu da. Gainera, ospitaletan mantentzeko gaitasun handia duela eta, geroz eta garrantzi handiagoa hartzen ari den mikroorganismoa da (García et al., 2020).

Herrialde desberdinetako *C. auris* isolatuen karakterizazio fenotipiko eta genotipikoek espezie honen aniztasun altua argitara eman dute, bost klatu filogenetiko identifikatuz (Chow et al. 2020).

C. auris-en ezaugarri patogeniko bat agregatuak sortzeko gaitasuna da. Nahiz eta *C. auris* mikroorganismoari buruzko informazioa ugaria izan, erlatiboki informazio gutxi dago fenotipo konkretu horren inguruan (Szekely et al., 2019). Bost klatu geografiko eta filogenetiko desberdin egoteak mugatu egin du patogeno honen agregatuak sortzeko mekanismoaren karakterizazioa biofilm formakuntzari, farmakoekiko erresistentziari eta ostalariarekin burututako interakzioei dagokienez (Chow et al. 2020).

2.2.1. *C. auris* birulentzia faktoreak

C. auris-ek birulentzia faktore asko partekatzen ditu *C. albicans*-ekin, hala nola proteinasak, lipasak, manosiltransferasak edo oligopeptidoen garraiatzaileak (Chatterjee S., 2015). Bestalde, biofilmen formakuntza, antifungikoekiko erresistentzia eta atxikidura ere *C. albicans* eta *C.auris*-ek partekatzen dituzten birulentzia faktoreak dira (Chybowska A., 2020).

Mikroorganismoak gainazal bati atxikitzen direnean eta ekoiztutako zelulaz kanpoko polimeroen bitartez, egiturazko matrize bat eraikitzen dutenean, garatzen dira biofilmak. Biofilm formakuntza garrantzi kliniko handiko birulentzia faktorea da; izan ere, terapia antifungikoekiko erresistentzia aurkezten du (Horton M., 2020). Biofilm egituren barnean

dauden zelula fungikoak sistema immunologikoko erantzunetatik eta agente antifungikoetatik babestuta daude (Nobile C., 2009).

In vivo ereduak, mikroorganismo mota desberdinen birulentzia eta patogenezitate maila neurtzeko aukera ematen du. Ornogabeen eta ugaztunen erantzun immunearen arteko antzekotasunaren ondorioz, *Galleria mellonella* eta *Caenorhabditis elegans* ereduak birulentzia mikrobianoaren alterazioak aztertzeko erabil daitezke (Hernando-Ortiz A., 2021). Hainbat ikerketetan ikusi den bezala emaitza interesgarriak lortu dira eredu horiek erabiliz (Muñoz JE., 2020).

3. HIPOTESIA ETA HELBURUAK

3.1. HIPOTESIA

Adhesioan parte hartzen duten proteinak kodetzen dituzten geneen delezioak birulentzia txikiagoko *C. auris*-en mutanteak sortuko ditu.

3.2. HELBURU NAGUSIA

C. auris mikroorganismoaren paretako adhesinek birulentzian duten garrantzia aztertzea, horiek kodifikatzen dituzten geneen delezio mutazioetan oinarrituta.

3.3. BIGARREN MAILAKO HELBURUA

C. auris mutante anduien, parental anduiaren eta fenotipo gehigarria duen anduiaren karakterizazioa hurrengo parametroetan oinarrituta: Biofilmak eratzeko gaitasuna eta *in vivo* birulentzia *Galleria mellonella* eta *Caenorhabditis elegans* ereduetan.

4. MATERIAL ETA METODOAK

4.1. MIKROORGANISMO ETA KULTIBO BALDINTZAK

CRISPR-Cas9 edizio genetiko teknikaren bitartez lortutako 13 andui mutante aztertu ziren. Teknika horren bitartez, paretako proteina desberdinak kodifikatzen dituzten geneen delezioa bideratu zen. Parental eta mutante andui bakoitzari kode zehatz bat ezarri zitzaion Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) anduien zerrendan oinarrituta. **1. taulan** andui bakoitzaren kodea eta horri lotutako mutazioak adierazten dira, eta **2. taulan** baliatutako erreferentzia eta kontrol anduiak. Andui mutanteak Gaztela-Mantxako Unibertsitateko talde laguntzaileak CRISPR-Cas9 edizio genetikoaren bidez lortu zituzten MINECOk (SAF2017-86188-

P) eta MCINek (PID2020-117983RB-I00) finantzaturako proiektuetan. Teknika horren bitartez, pareta zelularreko proteinak ekoizteaz arduratuko diren geneen delezioa burutu zen. Bestalde, lan esperimentalaren arrisku biologikoko 2. taldeko mikroorganismoekin egin zen, C2 segurtasun-maila ziurtatuta duten laborategietan. Gainera, ikerketa taldeak Agente Biologikoen eta GEOen Ikerketarako Etika Batzordearen (CEIAB UPV/EHU) onospena du; erreferentzia-zenbakia: M30_2022_377.

1. taula: Azterketarako baliaitutako *C. auris* andui desberdinak eta bakoitzari dagokion mutazioa.

UPV/EHU Kodea	Mutantea	Ezabatutako genea	Gene ezabatuaren ORF zenbakia	Proteina/ Genearen deskribapena
21-071	<i>iff6Δ</i>	<i>IFF6</i>	CVRJ01000109 .1_14	Adhesina
21-072	<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ</i>	<i>IFF6</i>		Adhesina
21-073	<i>rbr3Δ</i>	<i>RBR3</i>	CVRJ01000294 .1_7^CVRJ0100 0359.1_1	Adhesina
21-074	<i>iff4Δ/iff1Δ/rbr3Δ</i>	<i>RBR3</i>		Adhesina
21-075	<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ</i>	<i>RBR3</i>		Adhesina
22-108	<i>hyr3Δ</i>	<i>HYR3</i>	CVRJ01000399 .1_6^CVRJ0100 0439.1_4	Adhesina
22-110	<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ</i>	<i>HYR3</i>		Adhesina
22-134	<i>iff6Δ/rbr3Δ</i>	<i>RBR3</i>		Adhesina
22-136	<i>iff4Δ/rbr3Δ</i>	<i>RBR3</i>		Adhesina
22-138	<i>iff6.4Δ</i>	<i>IFF6.4</i>	CVRJ01000137 .1_1	Adhesina
22-140	<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ</i>	<i>IFF6.4</i>		Adhesina
19-115_ Parentala				Parentala

Ikerlan honetan erabilitako *C. auris* anduek delezioak zituzten adhesinak kodifikatzen zituzten geneetan, zehazki, *IFF* familiako geneetan, *RBR3* genean eta *HYR3* genean.

2. taula: Azterketan erabilitako beste andui batzuk.

Identifikazioa	Ezaugarriak
<i>C. auris</i> UPV/EHU 18-029	Agregatu ekoizlea
<i>C. albicans</i> SC5314	Biofilmen sorkuntzarako kontrola
<i>C. albicans</i> Ca2	Mizelio ez-sortzaile mutantea

Hala andui mutanteak nola erreferentzia anduiak glukosatutako agar Sabouraud-ean (Scharlab, Espainia) kultibatu ziren 24-48 h 37 °C-tara horien erabilerarako. Bestalde, horien kontserbazioa 4 °C eta/edo -70 °C-tan burutu zen.

4.2. BIOFILM EKOIZPEN AZTERKETA

Biofilm ekoizpen azterketa Ramage et al. (2004) eta Miranda-Cadena et al. (2021) azaldutako metodologia jarraituz burutu zen. Azterketan, *C. albicans* SC5314 kontrol positibo bezala eta *C. albicans* Ca2 kontrol negatibo bezala gehitu ziren.

Andui bakoitza glukosatutako agar Sabouraud-ean inkubatu zen, 37 °C-tara 24 orduz, eta denbora horren ondoren YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) medio likidora 3 mL transferitu zen, eta 30 °C-tan inkubatu zen berriro 24 orduz agitazio orbitalean. Behin 24 h igarota, hiru garbiketa bideratu ziren PBS (*Phosphate Buffer Saline*) baliatuz. Ondoren, ganbara kontaketa metodoaren bidez 1×10^6 zelula/ml dentsitateko inokulu zelularra prestatu zen RPMI 1640 medioan (Sigma-Aldrich, AEB). RPMI 1640 medioari L-glutamina eta MOPS (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*) (Sigma-Aldrich) tanpoia gehitu zitzaion.

Biofilmak 100 putzuko eta hondo lauko poliestirenozko mikroplaketan garatu ziren (Labsystems, Finlandia). Horretarako, anduiak lerro paralelo desberdinetan banatu ziren. Andui bakoitzerako bost putzuz osatutako lerroa eratu zen, aurretik prestatutako 100 µl inokulu

gehituz putzu bakoitzera. Hori bi mikroplaketan burutu zen: bat biofilmaren aktibitate metabolikoaren neurketarako eta bestea biofilmaren biomasaren determinaziorako. Ondoren, mikroplakak 37 °C-tara inkubatu ziren 24 eta 48 orduz. Denbora horren ostean, atxikitu ez ziren zelulak kendu ziren hiru garbiketa eginez PBSrekin (100 µl).

4.2.1. Biofilmaren aktibitate metabolikoaren determinazioa

Biofilmen aktibitate metabolikoaren determinazioa Ramage et al. (2004) zehaztutako protokoloa jarraituz burutu zen. Mikroplaken garbiketa hirukoitzaren ostean, 0,5 g/l kontzentrazioko *2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolio-5-carboxanilida* (XTT, Sigma-Aldrich) 100 µl gehitu ziren (1 µM menadiona 1,2 µl gehigarriarekin) putzu bakoitzera. Mikroplakak 37 °C-tara inkubatu ziren 2 orduz iluntasunean. 2 h igarotzean, XTT-ak formazanari eragindako erredukzioak (biofilmaren eskutik) bideratutako aldaketa kolorimetrikoa aztertu zen. Horretarako, mikroplakak Bioscreen C MBR bidez irakurri ziren 492 nm-ko uhin luzerara. Absorbantzia irakurketak 0,3 baino baxuagoa ematen bazuen, biofilmaren aktibitate metabolikoa baxu bezala deskribatu zen. Absorbantzia 0,3-0,5 tartekoa bazen, biofilmaren aktibitate metabolikoa moderatu bezala deskribatu zen eta 0,5 baino handiagoa bazen, aktibitate metaboliko handi bezala.

4.2.2. Biofilmaren biomasaren determinazioa

Biofilmen biomasaren determinazioa Peeters et al. (2008) zehaztutako protokoloa jarraituz burutu zen. PBS garbiketa ostean (atxikitu ez ziren zelulen garbiketarako), mikroplakak sikatzen utzi ziren ingurune tenperaturara 30 minutuz. Ondoren, putzu bakoitzera 100 µl %0,4 kristal bioleta ur destilatutan (CV) gehitu zen eta mikroplaka ingurune tenperaturan sikatzen utzi ziren 20 minutuz. Gero, 2 garbiketa burutu ziren 250 µl ur esterilekin eta gero, 150 µl %33 azido azetiko soluzio gehitu zen putzu bakoitzera. Biomasaren irakurketa 600 nm-ko uhin luzeran burutu zen.

Biofilmen eraketaren interpretazioa Miranda-Cadena et al. (2021) deskribatutako kriterioak jarraituz burutu zen. Absorbantzia irakurketak 0,3 baino baxuagoa ematen bazuen, biofilm eratzaille urri bezala deskribatu zen. Absorbantzia 0,3-0,5 tartekoa bazen, biofilm eratzaille moderatu bezala deskribatu zen eta absorbantzia 0,5 baino handiagoa bazen, biofilm eratzaille handi bezala.

4.3. BIRULENTZIA AZTERKETA *IN VIVO* *G. mellonella* EREDUAN

Azterketa honetan andui mutanteen, parentalaren, agregatu eratzaillearen eta *C. albican* SC5314 birulentzia ebaluatu zen 1×10^6 zelula/larba kontzentrazioan. Larbak DNTecosystems-tik (Espainia) lortu ziren.

Infekzio aurretik, *G. mellonella*-ren 20 larba aukeratu ziren entsegurako. Larbak 0,3 g eta 0,5 g artekoak izan ziren eta Petri plaketan inkubatu ziren 37 °C-tara 24 orduz, elikagai barik eta iluntasunean. Entseguren egunean, 37 °C-tan 24 orduz glukosatutako agarrean inkubatutako kultibo puruetatik abiatuta *Candida* suspentsio bana prestatu zen andui bakoitzerako anpizilina 20 µg/ml kontzentrazioa zueneko 5 ml PBS-tan. Bi garbiketa 10 min 2500rpm-tara, eta kontaketa zelularra (kontaketa ganbaran) burutu ostean, 1×10^8 *Candida*/ml PBS + anpizilina kontzentrazioko inokuluak lortu ziren.

Infekzioa 10 µl *Candida* suspentsioen injekzio bidez burutu zen, zehaztasun xiringa (Agilent, AEB) baten bitartez. Injekzioa larba bakoitzaren azkeneko ezker hankan burutu zen, 1×10^6 *Candida*/zizare amaierako kontzentrazioa lortuz. Kontrol talde bezala, manipulatu gabeko larbak gehitu ziren plaka batera eta anpizilnadun PBS tanpoiaz injektatutako larbak gehitu ziren beste plaka batera. Larba plaka guztiak iluntasunean inkubatu ziren 37 °C-tara. Larben heriotza begi bistaz burututako azterketen bidez neurtu zen mugimendu faltan eta melanizazioan oinarrituta. Azterketa infektatu eta 24 orduko burutu zen, 120 orduak igaro arte. Entsegu bakoitza hiru aldiz errepikatu zen esperimentu independenteetan (Hernando-Ortiz A., 2021).

4.4. BIRULENTZIA AZTERKETA *IN VIVO* *C. elegans* EREDUAN

Andui mutanteen, parentalaren eta agregatu eratzaillearen birulentzia analisisia Hernando-Ortiz et al. (2021) deskribatu bezala bideratu zen. Entsegurako *Caenorhabditis* Genetika Zentrotik (Universidad de Minnesota, AEB) lortutako AU37 *C. elegans* nematodoak erabili ziren, izan ere, nematodo hauek ezin dira 25°C-tan ugaltu eta infekzioarekiko sentikorrakoak dira.

Nematodoen mantenua nematodoen hazkuntzarako medioa (NGM, 3 g NaCl, 17 g agar, 2,5 g peptona, 1 ml 1 M CaCl₂, 1 ml 5 mg/ml kolesterol etanolean, 1 ml M MgSO₄, 25 ml 1 M KPO₄, 975 ml H₂O) eta *Escherichia coli* OP50 (elikagai bezala) zuteneko plaketan burutu zen, 15 °C-tan. Entseguak burutzeko L4 hazkuntza faseko nematodo sinkronizatuak erabili ziren. Nematodo horiek lisi bidez prestatu ziren sodio hipoklorito soluzio alkalino batekin (NaClO). Infekzioa egiteko, nematodoak kanamizina (90 µg/ml) osatutako BHI agar-plaketan (alde

aurretik andui bakoitzarekin ereindakoak eta 2 orduz 25 °C-tara inkubatutakoak) jarri ziren, nematodoak legamiarekin elikatzeke.

Ondoren, zelula hondarrak M9 tanpoi bidez ezabatu ziren. Jarraian, nematodoak mikrotitulazio plaketara (20 nematodo putzuko) transferitu ziren. Putzu bakoitzak M9 tanpoia (10 µg/ml kolesterol etanolean eta 90 µg/ml kanamizina kontzentrazioekin) zuen. Plaka horiek 25 °C-tara inkubatu ziren eta nematodoen biziraupena begiz determinatu zen Nikon SMZ-745 (Japonia) estereomikroskopia baliatuz. Behaketak infekzio momentutik 24 orduko burutu ziren 120 ordura arte. Nematodoak hilda bezala katalogatzen ziren bastoi itxura zutenean eta agatxo (platinozko alanbrea) batez eragindako estimulazioari erantzuten ez ziotenean. Esperimentu bakoitzeko, 60 nematodo erabili ziren minimo eta bi erreplika independente burutu ziren gutxienez. Infekzioan kontrol negatiboak ere ezarri ziren.

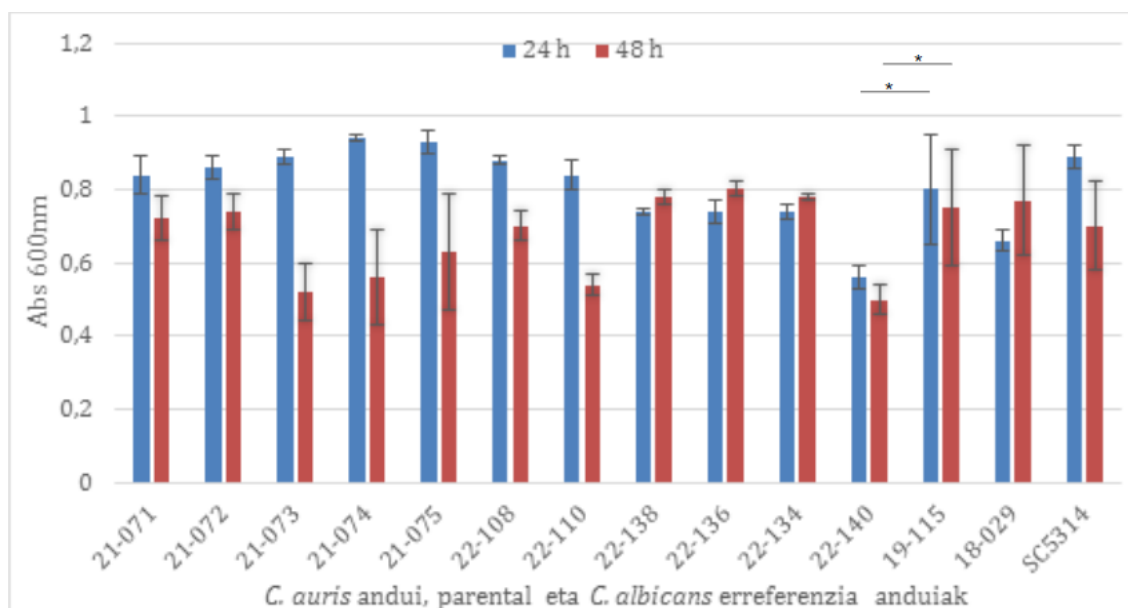
4.5. ANALISI ESTADISTIKOA

Emaitzen azterketa estatistikoa burutzeko metodo desberdinak baliatu ziren. Biofilmen kasuan, emaitzen adierazpenerako GraphPad Prism 8 (Software GraphPad, AEB) software-a erabili zen eta talde desberdinen diferentzia esanguratsuak adierazteko ANOVA test multifaktoriala baliatu zen. Bi ereduak entsegetan lortutako biziraupen datuak Kaplan-Meier biziraupen kurben bitartez aztertu ziren GraphPad Prism 8 software-a erabiliz. Bestalde, kurba horien arteko diferentzia esanguratsua Log-rank egoeraren bitartez aztertu zen SPSS v.24.0. (IBM, AEB) programa estatistikoa erabiliz. Kasu guztietan, $p < 0,05$ analisisien balioak estatistikoki adierazgarritzat jo ziren.

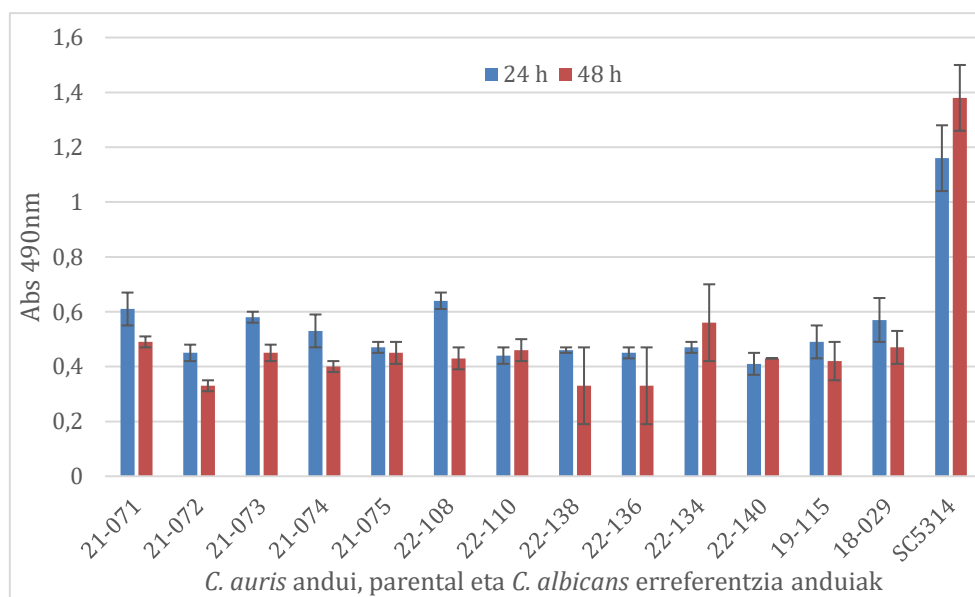
5. EMAITZAK

5.1. BIOFILM EKOIZPEN AZTERKETA

Biomasaren determinazioan, **1. irudian** ikus daitekeen bezala, 24 orduko eta 48 orduko entsegetan, sei mutazioko (*iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ*) anduiak (22-140) diferentzia ikusi zen: parentalarekin (19-115) alderatuz biomasa ekoizpena nabarmenki jaitsiz ($p=0,016$ eta $0,0308$). Biofilmen aktibitate metabolikoari dagokionez, **2. irudian** beha daitekeen bezala, 24 orduko eta 48 orduko entsegetan ez zen diferentzia nabarmenik ikusi andui mutante eta parentalaren artean.



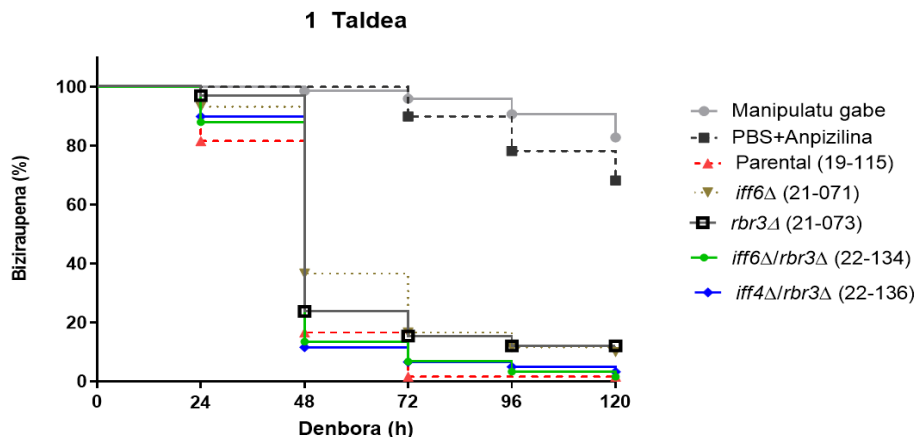
1. irudia: *C. auris* anduien eta erreferentzia anduien biofilm formakuntza. Andui mutanteek, parentalak eta agregatuek eratutako biofilmen biomasa 24 eta 48 ordura, absorbantzia bidez adierazita.



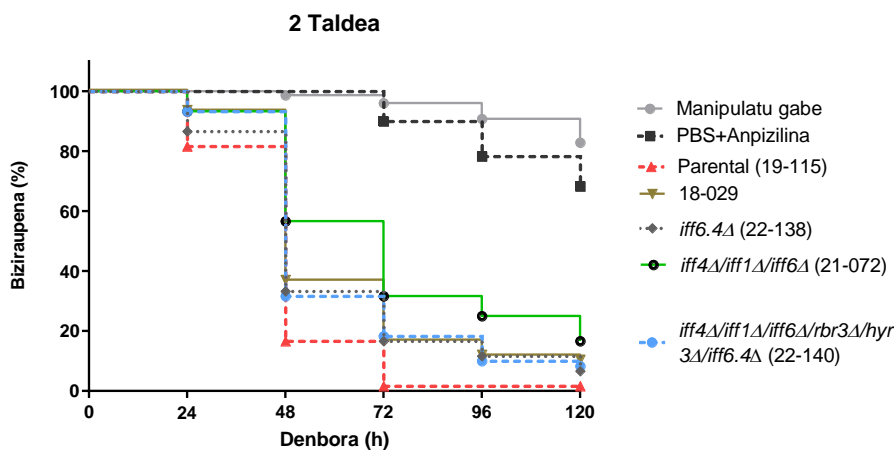
2. irudia: *C. auris* anduien eta erreferentzia anduien biofilmen aktibitate metabolikoa. Andui mutanteek, parentalak eta agregatuek eratutako biofilmen aktibitate metabolikoa 24 eta 48 ordura, absorbantzia bidez adierazita.

5.2. BIRULENTZIA AZTERKETA *IN VIVO* *G. mellonella* EREDUAN

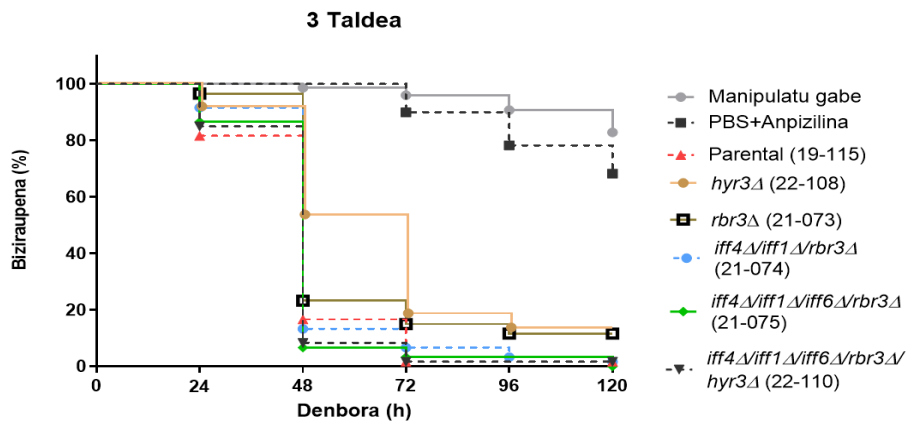
Azterketa honetan andui mutanteak hiru taldetan banatu ziren biziraupen grafikoan behaketa errazteko (3, 4 eta 5 irudiak). Bestalde, 3. taulan emaitzak bateratuta adierazita daude.



3. irudia: *C. auris* andui mutante desberdinez infektatutako larben biziraupen tasa *G. mellonella in vivo* eredu. *iff6*Δ, *rbr3*Δ, *iff6*Δ/*rbr3*Δ, *iff4*Δ/*rbr3*Δ anduiekin eta parentalarekin infektatutako *G. mellonella* larben biziraupen kurba. Larba osasuntsuen kontrola: manipulatu gabe. PBS anpizilina gehigarriarekin (PBS+anpizilina) inokulatutako larbak.



4. irudia: *C. auris* andui mutante desberdinez infektatutako larben biziraupen tasa *G. mellonella in vivo* eredu. 18-029 agregatu ekoizlearekin, *iff6.4*Δ, *iff4*Δ/*iff1*Δ/*iff6*Δ, *iff4*Δ/*iff1*Δ/*iff6*Δ/*rbr3*Δ/*hyr3*Δ/*iff6.4*Δ anduiekin eta parentalarekin infektatutako *G. mellonella* larben biziraupen kurba. Larba osasuntsuen kontrola: manipulatu gabe. PBS anpizilina gehigarriarekin (PBS+anpizilina) inokulatutako larbak.



5. irudia: *C. auris* andui mutante desberdinez infektatutako larben biziraupen tasa *G. mellonella* in vivo ereduari. *hyr3Δ*, *rbr3Δ*, *iff4Δ/iff1Δ/rbr3Δ*, *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ*, *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ* anduekin eta parentalarekin infektatutako *G. mellonella* larben biziraupen kurba. Zizare osasuntsuen kontrola: manipulatu gabe. PBS anpizilina gehigarriarekin (PBS+anpizilina) inokulatutako larbak.

Orokorrean, *iff6Δ* (21-071), *rbr3Δ* (21-073), *hyr3Δ* (22-108), *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ* (21-071) eta *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ* (22-140) andui mutanteek birulentzia txikiagoa aurkeztu zuten *G. mellonella* ereduari andui parentalarekin alderatuz.

3. irudian eta **3. taulan** ikus daitekeenez, andui mutante gehiengoz infektatutako larbek andui parentalarekin infektatutakoekin alderatuz, biziraupen tasa altuagoa (%1,7) aurkeztu zuten. Adhesina *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ* (21-072) andui mutantearekin infektatutako larbek biziraupen tasa altuena aurkeztu zuten (%16,7). Gainera, diferentzia hori esanguratsua izan zen andui parentalarekin infektatutakoekin alderatuz ($p < 0,000$). Era berean, *iff6Δ* (21-071) eta *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ* (22-140) andui mutanteekin infektatutako larbek biziraupen tasa altuagoak aurkeztu zituzten parentalarekin infektatutakoekin alderatuz: %10 eta %8,3 ($p = 0,002$ eta $p = 0,003$) portzentaiak zehazki. Bestalde, *iff6.4Δ* (22-138) andui mutantearekin infektatutako larbek ez zuten desberdintasun nabarmenik aurkeztu andui parentalarekin infektatutakoekin alderatuz ($p = 0,890$).

Horrez gain, **4. irudian** eta **3. taulan** ikus daitekeenez, 18-029 agregatu ekoizleak eta *iff6Δ* (21-073) andui mutanteekin infektatutakoekin birulentzia maila baxuagoa aurkeztu zuten parentalarekin infektatutakoekin alderatuz (%8,3 eta %11,7 biziraupena 120 ordura). Diferentzia hau esanguratsua izan zen andui parentalarekiko ($p < 0,005$). Kontrara, ez zen diferentzia nabarmenik aurkeztu *iff6Δ/rbr3Δ* (22-134) eta *iff4Δ/rbr3Δ* (22-136) andui

mutanteekin infektatutako larben biziraupen tasetan, berriz ere andui parentalarekin infektatutakoekin alderatuz.

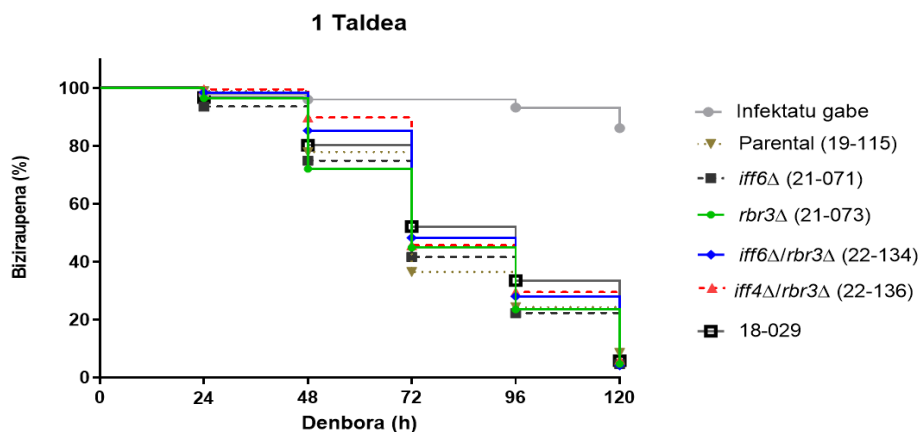
Bestalde, **5. irudian** eta **3. taulan** ikusten denez, *hyr3Δ* (22-108) anduiarekin infektatutako larbek 120 ordutan andui parentalarekin infektatutakoek baino biziraupen tasa altuagoa aurkeztu zuten (%13,3). Balio horretan oinarrituz, diferentzia estatistiko esanguratsua aztertu zen ($p < 0,005$). Aldiz, *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ* (22-110), *iff4Δ/iff1Δ/rbr3Δ* (21-074) eta *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ* (21-075) anduek ez zuten birulentzian diferentzia nabarmenik aurkeztu andui parentalarekin alderatuz ($p=0,390$, $p=0,831$ eta $p=0,063$ hurrenez hurren).

3. taula: *C. auris* andui mutante, parental eta agregatu eratzailiaz infektatutako *G. mellonella*-ren biziraupen portzentaiak.

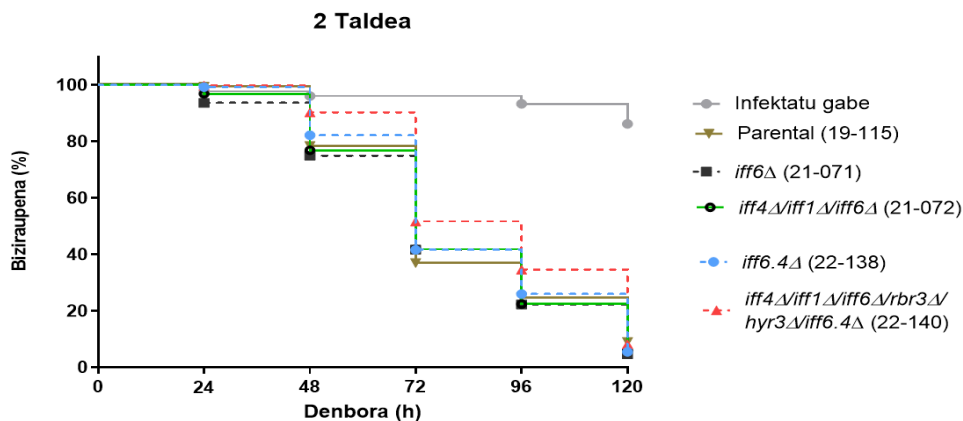
Infekzio baldintzak	Biziraupen portzentaia (%)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Infektatu gabe	100	100	98,7	96,1	90,8	82,9
PBS + anpizilina	100	100	100	90,0	78,3	68,3
<i>Iff6Δ</i> (21-071)	100	93,3	36,7	16,7	11,7	10,0
<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ</i> (21-072)	100	93,3	56,7	31,7	25,0	16,7
<i>rbr3Δ</i> (21-073)	100	96,7	23,3	15,0	11,7	11,7
<i>iff4Δ/iff1Δ/rbr3Δ</i> (21-074)	100	91,7	13,3	6,7	3,3	1,7
<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ</i> (21-075)	100	86,7	6,7	3,3	3,3	0,0
<i>hyr3Δ</i> (22-108)	100	91,7	53,3	18,3	13,3	13,3
<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ</i> (22-110)	100	85,0	8,3	1,7	1,7	1,7
<i>iff6.4 Δ</i> (22-138)	100	86,7	33,3	16,7	11,7	6,7
<i>Iff4Δ/rbr3Δ</i> (22-136)	100	90,0	11,7	6,7	5,0	3,3
<i>Iff6Δ/rbr3Δ</i> (22-134)	100	88,3	13,3	6,7	3,3	1,7
<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ</i> (22-140)	100	93,3	31,7	18,3	10,0	8,3
Parentala (19-115)	100	81,7	16,7	1,7	1,7	1,7
Agregatu ekoizlea (18-029)	100	85,0	31,7	10,0	8,3	8,3
<i>C. albicans</i> SC5314	100	88,3	25,0	16,7	13,3	13,3

5.3. BIRULENTZIA AZTERKETA *IN VIVO* *C. elegans* EREDUAN

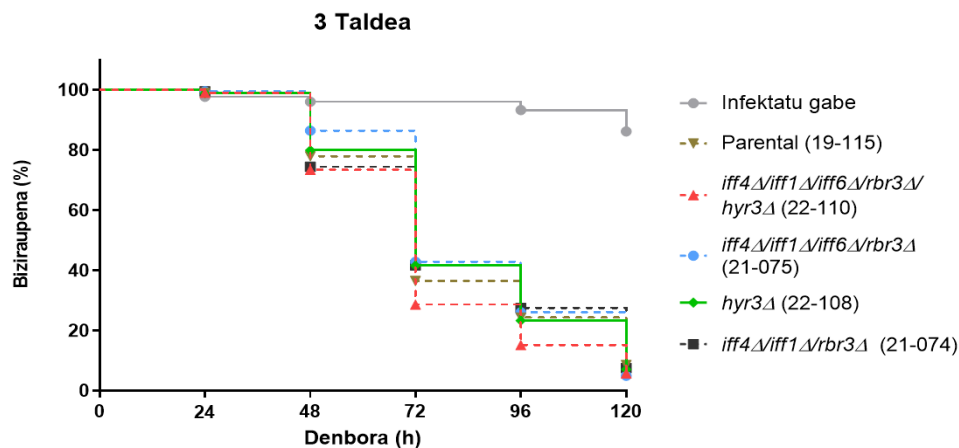
G. mellonella birulentzia emaitzetan bezala, *C. elegans* ereduaren emaitzen behaketarako andui mutanteak hiru taldetan banatu ziren (6, 7 eta 8 irudiak). Bestalde, 4. taulan emaitzak bateratuta adierazita daude.



6. irudia: *C. auris* andui mutante desberdinez infektatutako nematodoen biziraupen tasa *C. elegans in vivo* ereduari. *iff6*Δ, *rbr3*Δ, *iff6*Δ/*rbr3*Δ, *iff4*Δ/*rbr3*Δ anduekin, parentalarekin eta 18-029 agregatu ekoizlearekin infektatutako *C. elegans* biziraupen kurba. Kontrola: infektatu gabe.



7. irudia: *C. auris* andui mutante desberdinez infektatutako nematodoen biziraupen tasa *C. elegans in vivo* ereduari. *iff6*Δ, *iff4*Δ/*iff1*Δ/*iff6*Δ, *iff6.4*Δ, *iff4*Δ/*iff1*Δ/*iff6*Δ/*rbr3*Δ/*hyr3*Δ/*iff6.4*Δ anduekin eta parentalarekin infektatutako *C. elegans* biziraupen kurba. Kontrola: infektatu gabe.



8. irudia: *C. auris* andui mutante desberdinez infektatutako nematodoen biziraupen tasa *C. elegans in vivo* ereduari. *Iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ*, *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ*, *hyr3Δ*, *iff4Δ/iff1Δ/rbr3Δ* anduekin eta parentalarekin infektatutako *C. elegans* biziraupen kurba. Kontrola: infektatu gabe.

4. taula: *C. auris* andui mutante, parental eta agregatu eratzailaz infektatutako *C. elegans* nematodoen biziraupen portzentaiak.

Infekzio baldintzak	Biziraupen portzentaia (%)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Infektatu gabe	100	97,8	96,2	96,2	93,4	86,3
<i>Iff6Δ</i> (21-071)	100	93,7	75,1	41,7	22,3	4,7
<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ</i> (21-072)	100	96,9	77,0	41,7	22,5	6,2
<i>rbr3Δ</i> (21-073)	100	96,6	72,2	44,9	23,6	4,8
<i>iff4Δ/iff1Δ/rbr3Δ</i> (21-074)	100	99,7	74,5	41,7	27,6	7,6
<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ</i> (21-075)	100	99,7	86,6	43,0	26,2	5,0
<i>hyr3Δ</i> (22-108)	100	99,0	80,0	41,7	23,4	7,1
<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ</i> (22-110)	100	99,1	73,5	28,7	15,2	5,8
<i>iff6.4Δ</i> (22-138)	100	99,3	82,3	41,7	26,0	5,6
<i>Iff4Δ/rbr3Δ</i> (22-136)	100	99,7	89,9	45,8	29,5	6,2
<i>Iff6Δ/rbr3Δ</i> (22-134)	100	98,6	85,4	48,4	28,1	4,3
<i>iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ</i> (22-140)	100	99,8	90,4	51,7	34,6	8,3
Parentala (19-115)	100	99,0	78,0	36,5	24,3	8,6
Agregatu ekoizlea (18-029)	100	96,4	79,9	51,8	33,1	5,4

Eredu honetan, **6, 7 eta 8. irudietan** eta **4. taulan** ikus daitekeenez, andui mutanteekin eta parentalarekin infektatutako zizareen biziraupen tasak 120 ordura antzekoak izan ziren: %4,3 eta %8,6 artekoak. Aldiz, *iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ* (22-140) anduiak birulentzia txikiagoa aurkeztu zuen andui parentalarekin alderatuz. Birulentzia desberdintasun hori esanguratsua izan zen ($p < 0,005$). Diferentzia hori, argiago ikus daiteke **4. taulan** infekzio momentutik 120 ordura erregistratutako biziraupen tasetan.

6. EZTABAIDA

Candida generoko espezieek eragindako infekzioek nabarmen ugartu dira azken hamarkadetan. Infekzio-kasu horien eragile nagusia *C. albicans* espeziea izan arren, genero bereko beste espezie batzuek sortutako kandidiasi kasuak nabarmen hazi dira. Espezie horien adibide bat *C. auris* da. Onddo hori gaixotasun nosokomialeri lotutako patogeno emergentea da (Ruiz-Gaitán et al., 2017). Espezie honetan teknika fenotipiko eta molekularren bidezko identifikazioan dauden arazoak direla eta, kezka sortu dute patogeno horrek eragindako kasu kopuru erreala zehazterakoan (Jeffery-Smith et al., 2017). *C. auris*-ek antifungikoekiko duen erresistentziak ere kezkatzen du mikroorganismo horrek eragindako infekzioen arrisku-maila zehazterakoan (Chybowska A., 2020). Esan bezala, onddo hau Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) argitaratutako lehentasunezko patogenoen zerrendan dago (Osasunaren Mundu Erakundea, 2022).

Biofilmen formakuntza garrantzi kliniko handikoa da, izan ere, ikusi da terapia antifungikoekiko aurkeztutako erresistentziarekin erlazionatuta dagoela (Larkin et al. 2017). Emaitzetan ikus daitekeen bezala, *C. auris* mutanteek biofilmak sortzeko gaitasuna dutela aztertu zen. Antzera, Larkin et al. (2017) burututako ikerlanean *C. auris* anduiak biofilmak sortzeko gaitasuna dutela ikusi zen. Bestalde, emaitzetako **1. irudian** ikus daitekeen bezala, andui parentalarekin alderatuz, gainontzeko andui mutanteek ez zuten biofilm formakuntzan diferentzia nabarmenik aurkeztu, sei mutazioko anduiak izan ezik (*iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ*). Mutazio bakoitza zelula-paretako adhesina jakin baten gene kodifikatzailearen delezioari dagokiola jakinda, proteinen adierazpenaren inhibizioak biofilmen eraketan eragina izan dezakeela esan daiteke. Hau da, geroz eta adhesina gutxiago adierazi mikroorganismoak paretan, azalera batera adheritzeko izango duen gaitasuna urriagoa izango da. Nobile et al. (2006) bideratutako ikerlanean, *C. albicans* espeziean adhesinek biofilmen formakuntzan duten erlazioa aztertu zen. Hortik esan daiteke, *C. auris*-en kasuan ere adhesinak biofilmen formakuntzarekin erlazionatuta daudela. Hala ere, esan beharra dago ere,

gainontzeko mutanteetan ez zela parentalarekiko diferentzia nabarmenik ikusi. Beraz, biofilmen formakuntzan eragin nabarmen bat izateko, ez dela nahikoa adhesina konkretu bat kodifikatzen duen genearen delezioa eragitea. Eragina nabaritzeko, adhesina mota desberdinen adierazpenaren inhibizioa bideratu beharra dago, *C. auris*-ek biofilma eratzeko burutu behar duen adhesioa oztopatuz.

Horrez gain, jarduera metabolikoari dagokionez, Larkin et al. (2017) bezalako ikerketen antzera, *C. auris* mutanteek eratutako biofilmek ez zuten aktibitate metaboliko handirik aurkeztu.

In vivo G. mellonella ereduan burututako biziraupen entseguetan, emaitzetan adierazten den bezala, hainbat andui mutanteek aurkeztu zuten diferentzia nabarmena parentalarekin alderatuz. Hala ere, ezin daiteke guztiz zehaztu andui horiek ezabatuta dituzten geneak eredu honetan birulentziarekin zuzenki erlazionatuta dauden. Izan ere, ikusi zen gene berdina ezabatuta zuten andui desberdinez infektatutako intsektuek biziraupen tasan emaitza desberdinak adierazten zituztela. Adibidez, *RBR3* genea ezabatuta zuen 21-073 anduiak biziraupen tasa nabarmenki handiagoa adierazi zuen bitartean, gene horrez gain *IFF4* eta *IFF1* geneak ezabatuta zituen 21-074 anduiak ez zuten diferentzia nabarmenik aurkeztu parentalarekiko. Antzera beste hainbat anduiekin, adhesinekin erlazionatutako *IFF6* genea ezabatuta zuen 21-071 anduiak biziraupen tasa nabarmenki handiagoa adierazi zuen heinean, *IFF6* geneaz gain *IFF4*, *IFF1* eta *RBR3* geneak ezabatuta zituen 21-075 anduiak edo *IFF4*, *IFF1*, *RBR3* eta *HYR3* geneak ezabatuta zituen 22-110 anduiak ez zuten diferentzia nabarmenik aurkeztu parentalarekin alderatuz.

Gainera, *in vivo C. elegans* ereduan burututako biziraupen entseguetan, emaitzetan adierazten den bezala, sei mutazioko (*iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ*) anduiak (22-140) kenduta, gainontzeko andui mutanteek ez zuten nematodoen biziraupen tasan diferentzia nabarmenik eragin, parentalarekin alderatuz. Beraz, ezin dugu ziurtasunez esan, *G. mellonella in vivo* proban, andui batzuez infektatutako intsektuek aurkeztutako biziraupen tasa nabarmenki altuagoak andui horiek dituzten gene delezioen ondorio dela. Hau da, *C. auris*-en birulentzia maila ez dagoela adhesina gene horiekin zuzenki erlazionatuta. Kennedy et al. (1988) burutako ikerlanean islatzen den bezala, *Candida* generoko legamia baten adhesio mekanismoaren barruan zelula ostalariaren fenotipoa edo medio baldintzak bezalako hainbat faktorek eragin dezakete. Beraz, ikerketa horretan eta emaitzetan oinarritua, esan daiteke, ez dela nahikoa adhesina konkretu batzuk kodifikatzen dituzten geneen delezioa eragitea birulentzia mailan aldaketa nabari bat bideratzeko. Hala ere, aipatu beharra dago sei mutazioko (*iff4Δ/iff1Δ/iff6Δ/rbr3Δ/hyr3Δ/iff6.4Δ*) anduiekin (22-140) infektatutako ornogabeek

biziraupen tasa nabarmenki handiagoak aurkeztu zituztela bi *in vivo* ereduetan. Andui mutante honek ere, biofilm formakuntzan desberdintasuna aurkeztu zuen, nabarmenki andui parentalak baino biofilm biomasa gutxiago eratuz. Andui hau mutazio gehien dituen da. Beraz, esan daiteke, nahiz eta gene konkretuen delezioek *C. auris*-en birulentzia mailan aldaketa nabarmenik ez eragin, adhesina gene desberdinetan eragindako delezio multzoek birulentzia mailan eragin dezaketela.

7. ONDORIOAK

Emaitzetan oinarrituz, ondoriozta daiteke, *IFF4*, *IFF1*, *IFF6*, *RBR3*, *HYR3* eta *IFF6.4* geneek kodifikatzen dituzten adhesinak *C. auris*-en biofilm ekoizpenean inplikaturik daudela, ikusirik gene hauek ezabatuta dituen anduiak parentalarekin alderatuz biofilm formakuntza gaitasun nabarmenki txikiagoa aurkeztu zuela. Gainera, gene horietan burututako delezioek aldaketa adierazgarriak eragin ahal dituzte *C. auris*-en birulentzia mailan, andui horrekin infektatutako *G. mellonella* eta *C. elegans*-en biziraupena nabarmenki handiagoa izan baitzen. Hala ere, ezin da zehaztu gene konkretu bakoitzaren garrantzia biofilmaren formakuntzan edo birulentzia mailan; izan ere, gene konkretuen delezioak dituzten anduiek ez zuten emaitza adierazgarriak aurkeztu andui parentalaren aldean.

8. BIBLIOGRAFIA

- Achkar, J. M., & Fries, B. C. (2010). *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 253-273.
- Aguilar, G., Araujo, P. I., Lird, G., Insaurralde, S., Kawabata, A., Ayala, E., Irala, J., & Arguello, R. (2020). Identificación y perfil de sensibilidad de *Candida spp.* aisladas de hemocultivos en hospitales de Paraguay. *Revista Panamericana de Salud Pública (Impresa)*.
- Chatterjee, S., Alampalli, S. V., Nageshan, R. K., Chettiar, S. T., Joshi, S., & Tatu, U. S. (2015). Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics*, 16(1):16.
- Chow, N. A., Muñoz, J. F., Gade, L., Berkow, E. L., Li, X., Welsh, R. M., Forsberg, K., Lockhart, S. R., Adam, R., Alanio, A., Alastruey-Izquierdo, A., Althawadi, S., Araúz, A. B., Ben-Ami, R., Bharat, A., Calvo, B., Desnos-Ollivier, M., Escandón, P., Gardam, D., & Cuomo, C. A. (2020). Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. *MBio*, 11(2).

Chybowska, AD., Childers, DS., & Farrer, RA. (2020). Nine things genomics can tell us about *Candida auris*. *Frontiers in Genetics*, 11(4):1–18.

Del Rocío Reyes-Montes, M., Duarte-Escalante, E., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., & Colinas-León, M. T. (2017). Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(4), 203-210.

Fidel, P. L. (2007). History and Update on Host Defense Against Vaginal Candidiasis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 57(1), 2-12.

García, C. S., Palop, N. T., Bayona, J. I. Y., García, M. Ú., Rodríguez, D. P., Álvarez, M. D., Del Remedio Guna Serrano, M., & Cardona, C. G. (2020). *Candida auris*: descripción de un brote. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38, 39-44.

Hernando-Ortiz, A., Mateo, E., Perez-Rodriguez, A., W.J. de Groot, P., Quindós, G., Eraso, E. (2021) Virulence of *Candida auris* from different clinical origins in *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* host models. *Virulence*, 12(1), 1063-1075.

Horton, M., & Nett, J. E. (2020). *Candida auris* Infection and Biofilm Formation: Going Beyond the Surface. *Current Clinical Microbiology Reports*, 7(3), 51-56.

Jeffery-Smith, A., Taori, S. K., Schelenz, S., Jeffery, K., Johnson, E., Borman, A. M., Manuel, R., & Brown, C. S. (2017). *Candida auris*: A review of the literature. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), e00029-17.

Kennedy, M. A., Rogers, A. L., Hanselmen, L. R., Soll, D. R., & Yancey, R. J. (1988). Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia*. 102(3), 149-156.

Larkin, E., Hager, C., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Retuerto, M., Salem, I., Long, L., Isham, N., Kovanda, L., Borroto-Esoda, K., Wring, S., Angulo, D., & Ghannoum, M. (2017). The Emerging Pathogen *Candida auris*: growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(5), e02396-16.

Miranda-Cadena, K., Marcos-Arias, C., Mateo, E., Urizar, J. M. A., Quindós, G., & Eraso, E. (2021). In vitro activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112218.

- Miró, M. T. I., Rodríguez, E., Vigezzi, C., Icely, P. A., Vilegas, W., Riera, F. O., Vargas, L. B., Abiega, C., Caeiro, J. P., & Sotomayor, C. E. (2017). Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(2), 65-71.
- Muñoz, J. E., Ramirez, L., Dias, L. D. S., Rivas, L., Ramos, L. S., Santos, A. L. Q., Taborda, C. P., & Parra-Giraldo, C. M. (2020) Pathogenicity levels of Colombian strains of *Candida auris* and Brazilian strains of *Candida haemulonii* species complex in both murine and *Galleria mellonella* experimental models. *Journal Fungi (Basel)*, 6(3), 104.
- Nobile, C. J., Nett, J. E., Andes, D. R., & Mitchell, A. P. (2006). Function of *Candida albicans* Adhesin Hwp1 in Biofilm Formation. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1604-1610.
- Nobile, C. J., Nett, J. E., Hernday, A. D., Homann, O., Deneault, J., Nantel, A., Andes, D. R., Johnson, A. D., & Mitchell, A. P. (2009). Biofilm Matrix Regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLOS Biology*, 7(6), e1000133
- Osasunaren Mundu Erakundea. (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.
- Peeters. E., Nelis. H.J., & Coenye. T. (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 157-165.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (1), 133-163.
- Quindós, G., Marcos-Arias, C., San-Millán, R., Mateo, E., & Eraso, E. (2018). The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *International Microbiology*, 21(3), 107-119.
- Ramage, G., Tomsett. K., Wickes. B.L., Lopez-Ribot. J.L., Redding. S.W (2004). Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 98(1), 53-59.
- Ruíz Gaitán, A. C., Moret, A. Y., Hontangas, J. L. L., Molina, J. M., López, A. M., Cabezas, A., Maseres, J. M., Arcas, R. C., Ruiz, M. Á. M., Chiveli, M. Á., Cantón, E., & Pemán, J. (2017). Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 23-27.

Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2009). *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*, 53(1), 41-44.

Shaukat, A., Ansari, N. A., Wali, W. A., Karic, E., Madhoun, I. E., Mitwally, H., Hamed, M. A., & Alutra-Visan, F. (2021). Experience of treating *Candida auris* cases at a general hospital in the state of Qatar. *IDCases*, 23, e01007.

Szekely, A., Borman, A. M., & Johnson, E. (2019). *Candida auris* isolates of the southern Asian and South African lineages exhibit different phenotypic and antifungal susceptibility profiles *in vitro*. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(5), e02055-18.