

## ***Galleria mellonella* insektua eta *Caenorhabditis elegans* nematodoa, infekzio eredu boteretsuak *Candida glabrata* eta erlazonatutako espezieen birulentzia ikertzeko**

(Experimental candidiasis models in the insect *Galleria mellonella* and the nematode *Caenorhabditis elegans* are useful to evaluate the virulence of *Candida glabrata* and related species)

Ainara Hernando-Ortiz, Estibaliz Mateo\*, Marcelo Ortega-Riveros, Iker De-la-Pinta, Guillermo Quindós, Elena Eraso

Mikologia Medikoko laborategia, UFI 11/25, Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, (UPV/EHU).

**LABURPENA:** Kandidiasia *Candida* generoko espezieek eragindako infekzio mikotikoa da. *Candida albicans* agente etiologiko nagusia da baina gero eta gehiagotan *Candida* generoko beste espezie batzuk agertzen ari dira kandidiasiarenean eragile bezala eta, hauen artean, *Candida glabrata* espeziea. Espezie honekin lotuta beste bi espezie daude, *Candida bracarensis* eta *Candida nivariensis*, teknika molekularrek ondo desberdindu ditzaketanak. Aldaketa etiologiko hauek ondorio larriak izan ditzakete kandidiasiarenean diagnostikoan, tratamenduan edota pronostikoan, besteak beste, bere patogenia edo antifungikoekiko sentikortasuna oso desberdina izan daitezkeelako. Ordezko eredu esperimentalek erabiliz mikroorganismoek eragindako gaixotasunen patogenia eta terapia ezagutzeko ezinbesteko aukera ematen dizkigute, eta hauen artean, *Caenorhabditis elegans* nematodoa eta *Galleria mellonella* lepidopteroa ditugu. Ikerketa lan honetan konbentzionalak ez diren bi animalia eredu hauen erabilgarritasuna ebaluatu nahi izan da *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* eta *Candida nivariensis* harreman filogenetiko estua duten hiru espezie hauen birulentzia in vivo aztertzeko.

**HITZ GAKOAK:** *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, *Candida nivariensis*, birulentzia, ordezko ereduak.

**ABSTRACT:** Candidiasis is a fungal infection caused by species of *Candida* genus. *Candida albicans* is the major aetiological agent, although other species of *Candida*, such as *Candida glabrata*, are considered emerging causes of this disease. The species, *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis*, are phylogenetically similar to *Candida glabrata* and can be correctly differentiated by molecular techniques. These changes in the aetiology have serious implications for diagnosis, treatment and prognosis; considering that yeast pathogenesis or susceptibilities to current antifungal drugs may be different. Invertebrate models, such as the nematode *Caenorhabditis elegans* and the lepidopteran *Galleria mellonella*, are attractive alternatives for the study of fungal pathogenesis and antifungal therapy. The aim of this research study was to evaluate the usefulness of these two non-conventional models to assess the in vivo virulence of the phylogenetically close-related species, *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis*.

**KEYWORDS:** *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, *Candida nivariensis*, virulence, non-conventional models.

\* **Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Estibaliz Mateo, Mikologia Medikoko laborategia, UFI 11/25, Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Posta-kutxa 699 (48080 Bilbo). – estibaliz.mateo@ehu.es – https://orcid.org/0000-0002-9619-2486.

**Nola aipatu / How to cite:** Hernando-Ortiz, Ainara; Mateo, Estibaliz; Ortega-Riveros, Marcelo; De-la-Pinta, Iker; Quindós, Guillermo; Eraso, Elena (2019). «*Galleria mellonella* insektua eta *Caenorhabditis elegans* nematodoa, infekzio eredu boteretsuak *Candida glabrata* eta erlazonatutako espezieen birulentzia ikertzeko»; *Ekaia*, 36, 2019, 175-190. (https://doi.org/10.1387/ekaia.20323).

Jasoa: 30 urria, 2018; Onartua: 10 uztaila, 2019.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2019 UPV/EHU



Obra hau Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

## 1. SARRERA

### 1.1. Kandidiasia eta *Candida glabrata*

Kandidiasia gizakiak jasaten duen mikosi oportunistak ohikoena da. Oro har, ahoko eta genitaletako mukosako, larruazalpeko eta azazkaleko gaixotasun arinak dira, tratamenduak oso gutxitan desagerrarazi ezin dituenak. Sistemikoak edo inbasoreak diren kandidiasiak, berriz, bakanetan gertatzen dira, baina gaixotasun larriak eta heriotza-tasa altuak eragiten dituzte. Halako infekzioak jasaten dituzten pertsonak azpiko gaixotasun larriak, neutropenia edo defentsa gutxiak izan ohi dituzte, eta sendatzea zailagoa izaten da. Azken hogeitun urteotan mikosi inbasoreek gorakada nabarmena izan dute, eta osasun arazo garrantzitsu bihurtu dira [1, 2].

Kandidiasia terminoak *Candida albicans* espezieak eta *Candida* generoren barruan dauden beste espezieek eragindako infekzioa definitzen du. *Candida* AEBko eta Europako infekzio nosokomialen laugarren kausa ohikoena da, eta kandidiasia inbasorearen 72,8 kasu gertatzen dira urtero milioi bat biztanleko. *Candida albicans* agente etiologiko nagusia da, baina gero eta gehiagotan *Candida* generoko beste espezie batzuk agertzen ari dira kandidiasiarenean eragile gisa; besteak beste, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* eta, berriki, *Candida auris*. *Candida glabrata*ren intzidentzia, espezie horien artean, nabarmen handitu da, eta AEBko eta erdialdeko zein iparraldeko Europako kandidemietan bigarren espezie isolatuena da [1]. Ohikoa da isolatzea jaioberriengan, adinako pazienteengan, sabeleko kirurgian, transplantean, eta kortikoide edo antibiotiko tratamenduak aldezturik jaso dituzten pazienteengan, baita bulbobaginitisa duten emakumeengan ere [3].

*Candida glabrata*ren taxonomiak, *Candida albicans* eta *Candida parapsilosis* espezieenak bezala, aldaketa garrantzitsuak izan ditu azken urteotan. Espezie horiek *Candida* generoko beste espezie berriekin harreman filogenetiko estua dute, eta espezie kriptiko deritze. Espezie kriptikoek ezaugarri morfologiko oso antzekoak dituzte, eta espezie nagusietatik bereizten zailak dira, baina taxonomikoki desberdinak dira, eta patogenia edo antifungikoekiko sentikortasuna ere oso desberdina izan daiteke [2, 4]. *Candida bracarensis*ek eta *Candida nivariensis*ek ezaugarri fenotipiko asko partekatzen dituzte *Candida glabrata*ekin. Beraz, oker identifika daitezke, teknika molekular zehatzak erabiltzen ez badira [5, 6, 7]. Hiru espezie horien datu zehatzak (intzidentziari, birulentziari edo antifungikoekiko sentikortasunari dagokienez) oraindik ezezagunak dira [8, 9].

### 1.2. Ereduekperimentalak

Ereduekperimentalek bakterioek eta onddoek eragindako gaixotasunen patogenia eta terapia ezagutzeko aukera ematen digute, gizakien erabilera

saihestuz. Animalia eta beraren ingurunea kontrola ditzakegunez, ostalari eta patogenoen arteko elkarrekintzen kausa-efektu harremanen azterketa zehatza egin daiteke.

Patogeniaren, farmakologiaren eta immunologiaren aurrerapenak, batez ere, ugaztun ereduetan egiaztatu dira, hala nola sagu, arratoi, untxi eta tximinoetan. Arratoiak, *Mus musculus*, baliatzea da infekzio fungikoak aztertzeko metodo ohikoena, besteak beste, anatomiako eta erantzun immunologikoko antzekotasunak direla medio. Hala ere, alderdi ekonomikoek, logistikoek eta etikoek animalia ornodunen erabilera murrizten dute, batez ere andui kopuru handia aztertzea beharrezkoa denean. Horregatik, ordezeko ereduak erabiltzen dira: eredu konputazionalak, landareak edota mikroorganismoak, baina baita animalia ornogabeak eta odol hotzeko animaliak ere. Ondooak aztertu dira dagoeneko *Arabidopsis thaliana* landarean, *Acanthamoeba castellanii* eta *Dictyostelium discoideum* amebetan, *Caenorhabditis elegans* nematodoan, *Bombyx mori* zeta-harrean, *Culex quinquefasciatus* eltxoan, *Drosophila melanogaster* fruitu-eulian, *Blattella germanica* labezomorro arrean, *Galleria mellonella* lepidopteroan eta *Danio rerio* arrainean [10, 11, 12, 13].

*Candida* aztertzeko eredu aproposenek zenbait ezaugarri bete behar dituzte, besteak beste: sarbidean kolonizazio eta inbasio prozesuak zehatz erreproduzitu behar ditu, eta infekzioarekin lotutako immunitate-sistema edo hormonen baldintzak berdindu behar ditu. Gainera, infekzio esperimentalak nahiko luzea izango da *Candidaren* birulentzia faktoreak pausoz pauso aktibatzeko eta ostalariaren defentsak abian jartzeko.

### 1.2.1. Caenorhabditis elegans

*Caenorhabditis elegans* nematodoa lurzoruan bizi den *Rhabditidae* familiako organismo hermafrodita da. Eredu egokia da eragile infekziosoen eraginak ezagutzeko, mikroorganismoak elikatzen baita eta ugaztun eta gizakiak kutsa ditzaketen bakterio eta onddo patogeno asko jasan baititzake [12]. Mutante ugari daude eskuragarri, eta, horien artean, *Caenorhabditis elegans* AU37 anduia. Horrek *glp-4* genean daukan mutazioak 25°C-an indibiduo antzuak ekoizten ditu. Horrela, kopuru finkoa mantentzen da esperimentuan zehar, eta *sek-1* genean daukan mutazioak berezko erantzun immunea eragiten du, eta infekzioarekiko sentikorrak dira [14, 15]. Lan batzuetan, eredu horrekin *Candidaren* zenbait espezieren birulentzia eta horien kontrako antifungikoen eragina ikertu dira [15, 16, 17].

### 1.2.2. *Galleria mellonella*

Lepidoptero hau *Pyralidae* familiaren barruan kokatzen da, eta argizari-sits handia esaten zaio. Haren larba egoera *Candidak* sortutako infekzioan gertatzen diren ostalari-patogeno elkarrekintzak ikertzeko eredu berri bat da.

*Galleria mellonellaren* larbak erraz eta ekonomikoki lortzen dira, eta espeziea eredu erakargarria da abantaila argiak dituelako onddoen infekzioak ikertzeko, erabiltzen diren beste ereduekin konparatuta. Esate baterako, erraz manipulatu dira, eta erraz ikusten da infekzioaren eragina larbak beltz eta mugimendurik gabe gelditzen direlako. Ugaztunak ez diren eredu asko ez bezala, gizakientzat *Candida* patogenoa den tenperaturan, 37°C-an alegia, mantendu daiteke, eta beraren erantzun immuneak antzekotasunak dauzka ugaztunen berezko erantzun immunearekin [12, 18].

Oraindik ere gutxi dira *Candidaren* ikerketan *Galleria mellonella* eredu erabili duten lanak. Alde batetik, *Candida albicansen* andui basati eta mutanteen arteko birulentzia konparatu da [18]; *Candida parapsilosis* eta harreman filogenetiko estua duten beste bi espezieen arteko birulentzia aztertu da [19]; *Candida auris* eta beste *Candida* espezieen birulentzia ikertu da [10], eta *Candida glabrata* andui baten birulentzia eredu honetan eta arratoiaren ereduaren ere konparatu da [4]. Bestalde, *Candidaren* zenbait espezieen kontrako tratamendu antifungikoaren eraginkortasuna egiaztatuta da [4, 15, 18, 20].

## 2. HELBURUA

Ikerketa honen helburua da *Galleria mellonella* eta *Caenorhabditis elegans* konbentzionalak ez diren animalia esperimentalen erabilgarritasuna aztertzea eta bi ordezeko eredu horiek erabiliz harreman filogenetiko estua duten *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* eta *Candida nivariensis* espezieen birulentzia aztertzea eta konparatzea.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. *Candida*: anduiak eta hazkuntza baldintzak

*Candida* generoko harreman filogenetiko estua duten hiru espezie hauek erabili ziren, kultura bilduma batetik baino gehiagotatik lortuta: NCPF (*National Collection of Pathogenic Fungi*) bildumatik, *Candida glabrata* NCPF 3203 anduia (Salisbury, Erresuma Batua); CECT (*Colección Española de Cultivos Tipo*) bildumatik, *Candida nivariensis* CECT 11998

andua (Valentzia, Espainia) eta NCYC (*National Collection of Yeast Cultures*) bildumatik, *Candida braccarensis* NCYC 3133 andua (Norwich, Erresuma Batua).

Hiru andui horiek Sabouraud dextrosa-agar hazkuntza-ingurunean (Difco, AEB) hazi ziren 37°C-an 24 orduz.

### 3.2. *Candidaren infekzio eredia Caenorhabditis elegans nematodoan*

*Candida* infekzioa aztertzeko *Caenorhabditis elegans* nematodoaren eredu esperimentalak erabiliz egin behar izan ziren pausoak 1. irudian ikus daitezke eskematikoki.

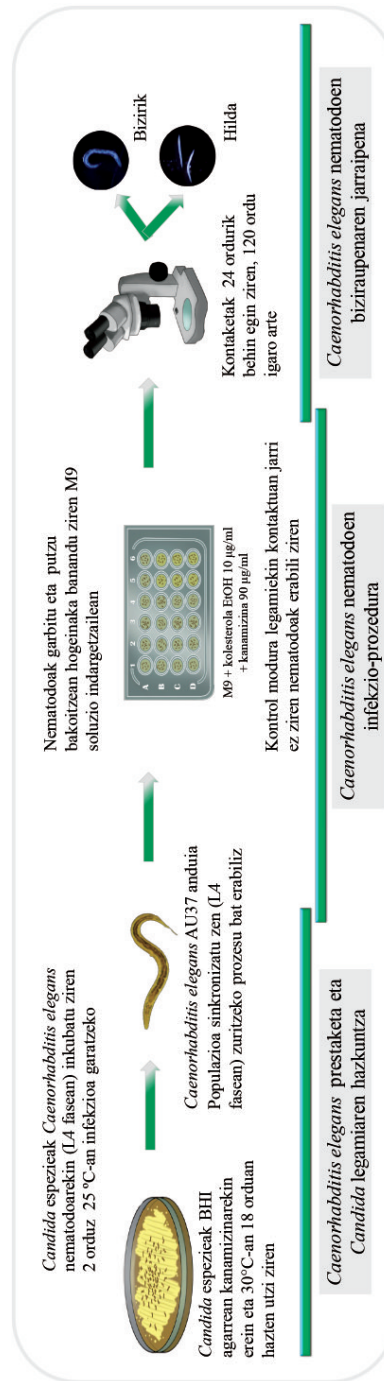
#### 3.2.1. *Andua eta hazkuntza baldintzak*

*Caenorhabditis elegans* nematodoaren mutazio bikoitza duen AU37 andua erabili zen. Horrela, esperimentu osoan zehar indibiduo kopuru berekin lan egitea eta infekzioa egoki garatzea ziurtatu zen.

Eredua beste ikertzaile batzuek azaldutakoaren arabera garatu zen [14, 16]. NGM (*Nematode Growth Media*) agar hazkuntza-ingurunean [21] nematodoa hedatu, eta *Escherichia coli* OP50 andua elikagaitzat erabili zen. Urazilorako auxotrofoa den bakterio andui hau NGM agarrean erein zen, eta, behin haziz gero, nematodoak hazkuntza-ingurune horretan sartu ziren inkubagailuan 15°C-an ugaltzeko.

#### 3.2.2. *Nematodoen L4 hazkuntza fasea*

Nematodo-populazioa sinkronizatua lortu zen, baldintza esteriletan zurrizteko prozesu bat erabiliz. Laburbilduz, NGM hazkuntza-ingurune Petri kutxetan zeuden nematodo guztiak, 3,5 ml ur distilatuz eta Pasteur pipeta batez baliatuz, 15 ml-ko saio-hodietan batu ziren. Laginak 1.200 rpm-an 2 minutuz zentrifugatu eta gero, alkohola hipokloritozko garbiketara soluzio batean utzi ziren, eta nematodoen gorputzak desegin ziren beren barruan zeuden arrautzak askatuz. Laginak 3.500 rpm-an 30 segundoz zentrifugatu ondoren gain-jalkina kendu eta M9 soluzio indargetzailera (3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> eta H<sub>2</sub>O-tik 1 L-ra) erabiliz arrautza multzo garbia berreskuratu eta NGM hazkuntza-ingurune Petri kutxetan banatu zen. Gau osoa 15 °C-an inkubatu eta gero, arrautzak eklosionatu eta L1 hazkuntza fasean zeuden nematodo berriak *E. coli* OP50 anduiaren kultura zeukan NGM hazkuntza-ingurune Petri kutxetara pasatu ziren. Nematodo guztiak L4 hazkuntza fase berean egotea lortu zen 25 °C-an 48 orduko inkubazioa igaro eta gero.



**1. irudia.** *Candida*ren infekzio eredua *Caenorhabditis elegans* nematodoan.

### 3.2.3. Nematodoen infekzio-prozedura eta biziraupena

Kandidiasi inbasorea garatu zen Breger eta beraren laguntzaileek [14] azaldu zuten bezala. Laburbilduz, L4 hazkuntza faseko nematodoak Petri kutxetatik 15 ml-ko saio-hodietara pasatu ziren 45 µg/ml kanamizina zuen M9 soluzio indargetzailea erabiliz, eta 1200 rpm-an 2 minutuz zentrifugatu ondoren nematodoak saio-hodiaren beheko partean geratu ziren. *Candida* anduiaren kultura zeukan BHI (*Brain Heart Infusion*) hazkuntza-inguruneko Petri kutxetan zabaldu ziren horiek 2 orduz 25°C-an, baldintza horietan nematodoek legamiak jan eta infekzioa gara zeza-ten. Denbora hori igarota, nematodoak berreskuratu eta garbitu ziren M9 soluzio indargetzailearekin, 45 µg/ml kanamizina gehiturik. Jarraian 1.200 rpm-ko zentrifugazioarekin lortutako nematodo-multzoa NGM hazkuntza-inguruneko Petri kutxetan utzi zen, nematodoen kutikulan egon zitezkeen legamiak marruskaduraz kentzeko. Azkenik, mikrotiter plaketan nematodoak hogeinaka banatu ziren, eta 25 °C-an inkubatu. 60 nematodo prestatu ziren *Candida* espezie bakoitzaren heriotza aztertzeko. Biziraupena 24 ordurik behin estereomikroskopio batez (Nikon SMZ-745, Japonia) baliatuz ikuskatu zen, 120 ordu igaro arte. Nematodoa hilda zegoela jotzen zen zurrun eta mugimendurik gabe geratzen zenean. Kontrol modura, legamiak jan ez zituzten nematodoak erabili ziren. Esperimentua hiru aldiz gutxienez errepikatu zen *Candida* espezie bakoitzarentzat denboraldi desberdinetan.

### 3.3. *Candidaren* infekzio eredia *Galleria mellonella* lepidopteroan

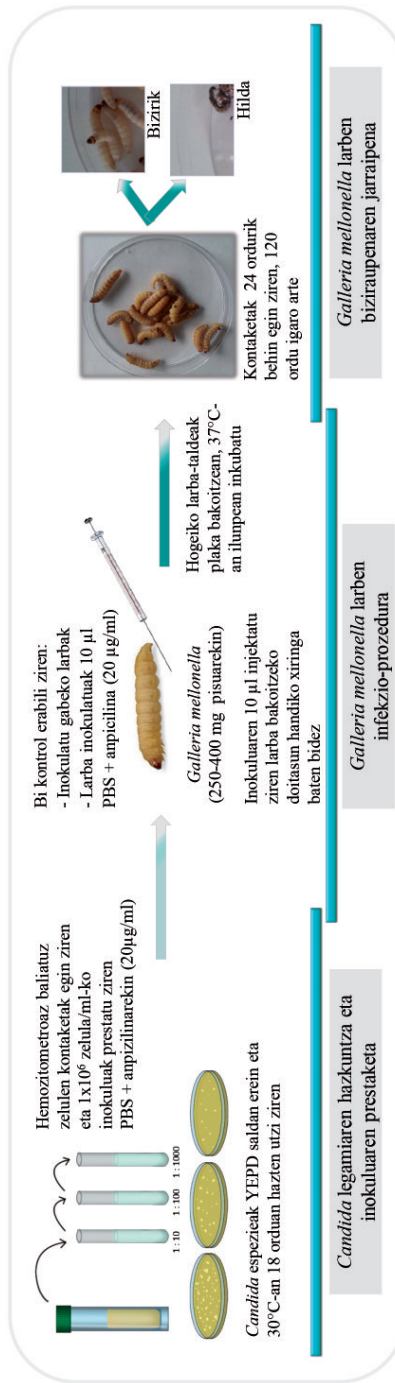
*Candida* infekzioa aztertzeko *Galleria mellonella* lepidopteroaren eredu esperimentalak erabiliz egin behar izan ziren pausoak 2. irudian ikus daitezke eskematikoki.

#### 3.3.1. *Candida* inokuluaren prestaketa

*Candidaren* anduiak YPD hazkuntza-inguruneko saldan (% 1 legamia estraktu, % 2 peptona bakteriologiko, % 2 D-glucosa) (Panreac, Espainia) hazi ziren 30°C-an eta agitazioarekin inkubatuz. Gau osoa igaro ondoren, legamiak bildu, eta bi aldiz garbitu ziren fosfato gatzeko disoluzio indargetzaile batekin (PBS, pH 7,2), 1.200 rpm-an 2 minutuz zentrifugatuz.

Hemozitometro batez baliatuz, legamia-zelulen kontaktak egin ziren. Ondoren,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  eta  $1 \times 10^5$  zelula mililitroko kontzentrazioak zituzten legamia suspentsioak prestatu ziren *Candida* andui bakoitzeko. Suspentsioak PBS 20 µg/ml anpizilina gehigarri erabiliz egin ziren, bakterioen kutsadura ekiditeko.





**2. irudia.** *Candida*ren infekzio eredia *Galleria mellonella* lepidopteroan.



### 3.3.2. Galleria mellonellaren infekzio-prozedura eta biziraupena

*Galleria mellonella* larbak hogeiko taldetan Petri kutxa hutsetan antolatatu ziren, eta inokuluak injektatu ziren beste ikertzaileek deskribatu zuten bezala [15, 19, 20]. Inokuluak aipatutako legamien kontzentrazio ezberdinekin prestatu ziren 10 µl-ko bolumen batean. Inokulu-bolumen hori doitasun handiko xiringa baten bidez larben ezker aldeko azken pro-hankan injektatu zen. Pro-hanka, alde aurretik, % 70eko etanol soluzio batekin garbitu zen. Infekzio-prozeduraren ondoren, larbak 37 °C-an eta ilunpean inkubatu ziren. Larben biziraupena 24 ordu aztertu zen 120 ordu igaro arte. Larbak bere kolorea marroi ilunera aldatzen zuenean eta mugimendurik gabe geratzen zenean hilda zegoela jotzen zen. Proba guztietan, bi kontrol erabili ziren; alde batetik, infektatu gabeko hogeiko larba-talde bat eta, bestetik, beste hogeiko larba-talde bat 10 µl PBS 20 µg/ml anpizilina gehigarritzako soluzio bat injektatuta. Esan bezala, legamia kontzentrazio bakoitzean hogeiko larba-talde bat erabili zen, eta esperimentera hiru aldiz gutxienez errepikatu zen denboraldi desberdinetan *Candida* espezie bakoitzarentzat.

### 3.4. Estatistika

Biziraupen-kurbak Kaplan-Meier estatistikoaren bitartez kalkulatu ziren. Log-rank *Candida* espeziearen arteko birulentzia desberdintasunak estimatzeko erabili zen. Estatistika-azterketak SPSS v21.0 (IBM, AEB) eta Stata v12.0 (StataCorp, AEB) programekin garatu ziren. Adierazpen maila 0,05 balioan ezarri zen.

## 4. EMAITZAK

### 4.1. Candidaren infekzio eredia Caenorhabditis elegans nematodoan

*Caenorhabditis elegans* nematodoak *Candida glabrata*, *Candida braccarensis* eta *Candida nivariensis* espezieekin infektatu ziren, eta kandidiasi inbasorea garatu zuten. Eredu egokia izan zen filogenetikoki oso antzekoak diren hiru espezie horien birulentzia aztertzeko. Nematodoek jandako legamia zelulen kopurua kontrolatu ezin izan arren, infekzio baldintza berdina erabilita nematodoek biziraupen desberdina aurkeztu zuten hiru *Candida* espezie hauen infekzioekin.

Guztira, 740 nematodo aztertu ziren, 560 infektatu eta 180 kontrol. Lehenengo 48 orduko biziraupen kontaketa nematodo guztiak mugitzen ziren mikrotiter plaketetan, baina, gero, zurrinak eta mugimendurik gabekoak agertzen hasi ziren. Infekzio gabeko nematodoen biziraupen-tasak aldaketarik gabe mantendu zen 120 orduko esperimenteraren amaierara arte, baina *Candida* espezieekin infektatutako nematodoen biziraupen-ta-

sak, berriz, behera egiten zuen 48 orduetik aurrera (3-a. irudia). Kontrol eta infektatuen emaitzak konparatuz, desberdintasunak estatistikoki adierazgarriak izan ziren % 95eko konfiantza-tarteaz ( $p = 0$ ).

Nahiz eta *Candida nivariensis* CECT 11998 anduiaren birulentzia lehenengo 48 orduetan ageri, birulentzia ertaina azaldu zuen azkenik; nematodoen biziraupen-tasa 120 ordu igarota % 73koa izan zen. Birulentzia handiena *Candida glabrata* NCPF 3203 anduiak erakutsi zuen: 72 ordu igaro eta gero agertu ziren lehenengo nematodoen hilotzak, eta biziraupen-tasa 120 orduren ondoren % 63koa izan zen. Birulentzia txikienekoa, berriz, *Candida bracarensis* NCYC 3133 anduiarena izan zen, nematodoen % 89ko biziraupenarekin. Hiru espezieekin infektatutako nematodoen biziraupenak konparatuz, soilik desberdintasun estatistikoki adierazgarriak aurkitu ziren *Candida bracarensis* NCYC 3133 anduiarekin, % 95eko konfiantza-tarteaz ( $p = 0$ ).

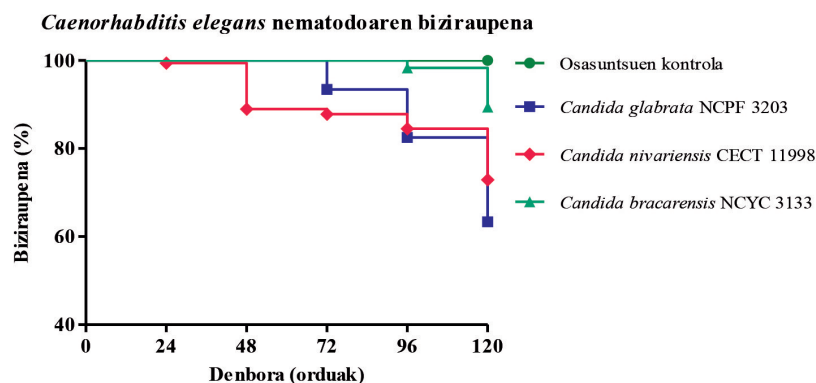
#### 4.2. *Candidaren* infekzio ereduia *Galleria mellonella* lepidopteroan

Hiru *Candida* espezieak, *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* eta *Candida nivariensis*, gai izan ziren *Galleria mellonella* infektatzeko eta kandidiasi inbasorea garatzeko. Beste ereduan bezala, hemen ere espezie hauen birulentzia aztertu ahal izan zen.

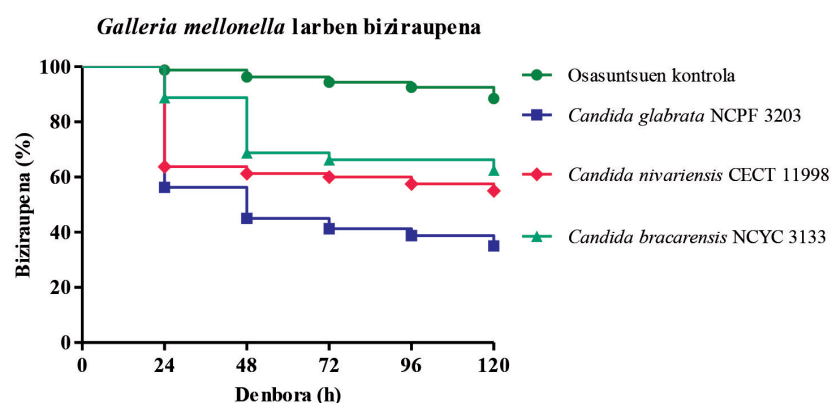
Gure ikerketa lan honetan, 660 larba aztertu ziren, 540 infektatu eta 120 kontrol. *Galleria mellonella* ereduan inokulu zehatza sartzea posible denez, infekzioa kontrolatuagoa da. Hiru legamia kontzentrazioen artean desberdintasunak ikusi ziren, baina  $1 \times 10^6$  zelula/ml izan zen kontzentrazio egokiena *Candida* espezieen birulentzia konparatzeko (3-b. irudia). Kontrol larben biziraupena 120 ordu igaro eta gero % 88koa izan zen. *Candida* espezieekin infektatutako larbak, berriz, 24 orduetik aurrera hasi ziren hiltzen, eta hiru espezieekin biziraupen-tasek joera berdina izan zuten denboran zehar. Kontroleko eta infektatutako taldeen emaitzak konparatuz, desberdintasunak estatistikoki adierazgarriak izan ziren % 95eko konfiantza-tarteaz ( $p = 0$ ).

Birulentzia altuena *Candida glabrata* NCPF 3203 anduiak adierazi zuen, 120 ordu igarota larben % 35eko biziraupenarekin. Birulentzia ertaina *Candida nivariensis* CECT 11998 anduiari zegokion (% 55eko biziraupena 120 ordu eta gero). Azkenik, *Candida bracarensis* NCYC 3133 anduiak birulentzia baxuena izan zuen, eta larben % 62,5ek bizirik jarraitzen zuen 120 ordu pasatu eta gero ere. Legamiekin infektaturiko larben biziraupenak alderatuz, soilik *Candida glabrata* NCPF 3203 anduiarekin infektatutako larben biziraupena beste bi anduiekin lortutako emaitzekin konparatuz topatu ziren estatistikoki adierazgarriak ziren desberdintasunak, % 95eko konfiantza-tarteaz ( $p \leq 0,014$ ).

a)



b)



**3. irudia.** *Candida glabrata* NCPF 3203, *Candida bracarensis* NCYC 3133 eta *Candida nivariensis* CECT 11998 anduekin infektatutako *Caenorhabditis elegans* nematodoen (a) eta *Galleria mellonella* lepidopteroen (b) biziraupen-kurbak. *Galleria mellonella* lepidopteroan agertzen diren biziraupen-kurbak *Candida* legamiaren  $1 \times 10^6$  zelula mililitroko kontzentrazioko inokuluarekin infektatutako larbenak dira.

## 5. EZTABAIDA

Kandidiasia mikosis ohikoena da, eta kandidiasi inbasore edo sistemikoak morbiditate eta heriotza-tasa handiak eragiten ditu, gaixotasun larriak edota defentsak gutxituak dituzten gaixoen artean batez ere [1]. Kandidiasiaren etiologia aldatuz doa, eta, nahiz eta *Candida albicans* espezieak nagusi izaten jarraitu, *Candida albicans* ez diren beste espezieen presentzia

gero eta nabarmenagoa da. Izan ere, espezie horiek 1970eko-1990eko hamarkadetan kandidiasi sistemikoen % 10-40 kasuetan isolatu ziren, eta azken hogeitertean proportzio hori % 35-65era igo da [2]. Gero eta gehiago hedatzen ari diren espezieen artean *Candida glabrata* daukagu, eta horri arreta jarri behar zaio ohiko antifungikoekiko sentikortasun murriztua duelako, besteak beste [8]. *Candida glabrata* espezieetik *Candida bracarensis* eta *Candida nivariensis* espezieak bereizteak berebiziko garrantzia du, azken espezie horiek antifungikoekiko duten sentikortasuna desberdina izan daitekeelako eta okerreko aukera eginez gero tratamenduak huts egin dezakeelako [2, 4, 7, 16].

Beraz, kandidasiaren etiologia ezagutzeak eta *Candida* espezieen karakterizazio edota patogenia ikertzeak tratamendu egokia aukeratzea ahalbidetuko du. Horretarako, *in vivo* eredu esperimentalak erabiltzea oso lagungarria da, eta *Candida* espezieek eragiten dituzten infekzioen ezaugarri aurrerapen garrantzitsuak lortzen ari dira [13]. Animalia ornogabeen artean, nematodoak eta intsektuak infekzio eredu esperimental gisa ditugu, eta haien erabiliera egokia da birulentzia, ostalariaren eta patogenoaren arteko elkarrekintzak edota mikrobioen aurkako efektua duten molekula berriak ikertzeko. Animalia mota hauek infekzio eredu gisa erabiltzeak hainbat onura eskaintzen ditu. Halakoen artean, esate baterako, hauek aipa ditzakegu: i) ornodunekin dauden arazo etikoak saihestea, ii) kostu baxua eta laborategian erraz mantentzea, edo iii) esperimentuak 37°C-an egitea [4, 13, 15, 16, 19, 20].

Ikerketa lan honetan bi ordeko eredu esperimental erabili dira, *Caenorhabditis elegans* nematodoa eta *Galleria mellonella* lepidopteroa, *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* eta *Candida nivariensis* espezieen birulentzia aztertzeko. Guk dakigula, *Candida bracarensis* eta *Candida nivariensis* espezieei buruz orain arte ez da *in vivo* ereduetan eginitako ikerketarik argitaratu, eta *Candida glabrata* eragindako infekzioak ordeko eredu esperimentalak erabiliz azaltzen dituzten ikerketak gutxi dira [4, 11, 16].

Gure ikerketan, hiru *Candida* espezieek bi eredu esperimentaletan antzeko birulentzia erakutsi zuten. Bai *Caenorhabditis elegans* nematodoan eta bai *Galleria mellonella* lepidopteroan, *Candida glabrata* izan zen espezie birulentoena; *Candida nivariensis* espezieak birulentzia ertaina erakutsi zuen, eta apalena, *Candida bracarensis*ek. Halere, lortutako biziraupenportzentajeak desberdinak izan ziren bi ereduetan. *Caenorhabditis elegans* nematodoan 120 orduren buruan bizirik irauten zuten banakoen kopurua altuagoa zela ikusi zen *Galleria mellonella* lepidopteroarekin konparatuz. Hori zenbait arrazoiengatik izan daiteke, besteak beste, ereduetan sartutako legamia kopuruarengatik. Hau da, *Galleria mellonella* larbetan sartu zen inokulua zehatza eta ezaguna izan zen, eredu horren tamainak doitasun handiko xiringa bitartez zelula kopuru jakina inokulatzeko aukera ematen

baitu [15], baina *Caenorhabditis elegans* nematodoaren kasuan, aldiz, beraren tamaina txikia dela eta, ezin da inokulatu eta legamia zelulak elikatze prozesuaren bitartez barneratzen ditu. Elikatze prozesuaren denborak berak eragin zuzena eduki dezake [16]. Berez, gure esperimenduetan elikatze prozesuaren denbora bi ordukoa izan zen, baina Scorzonik eta beraren laguntzaileek hiru ordu erabili zituzten, eta, beraz, haiek lortu zituzten biziraupen-portzentajeak gureak baino txikiagoak izan ziren [15].

Bi ereduetan lortutako biziraupen tasen arteko desberdintasuna inkubazio tenperaturan egon daiteke ere. *Caenorhabditis elegans* 25 °C-an inkubatzen da, eta *Galleria mellonella*, 37 °C-an. Kontuan badugu *Candida* legamiaren hazkuntza tenperatura egokiena 37 °C dela, tenperatura horretan azkarrago haziko da, eta, beraz, infekzioa birulentoagoa izango da eta, hortaz, biziraupena txikiagoa.

*Candida glabrata* espeziearekin infektatutako *Caenorhabditis elegans* nematodoan lortutako biziraupen-tasa beste autoreen emaitzekin alderaturik altuagoa da: % 63 Ortega-Riverosek eta beraren laguntzaileek aurkitutako <% 50en aldean [16]. Gauza bera gertatzen da *Galleria mellonella* ereduaren, larben biziraupena baxuagoa izan zen (% 35) beste ikertzaileek lortutako emaitzekin alderaturik (biziraupena: >% 60) [4]. Esperimenduak egiteko erabili ziren *Candida glabrata*ren anduiak desberdinak izateagatik gerta daitezke desberdintasun horiek.

Beste bi espezieei buruz, *Candida bracarensis* edota *Candida nivariensis* espezieei buruz, gutxi ezagutzen da, bai epidemiologiari bai birulentziari dagokionez. Izatez, Lockhartek eta beraren laguntzaileek egindako ikerketaren arabera, *Candida bracarensis* eta *Candida nivariensis* espezieek *Candida glabrata*ren isolamendu klinikoan % 0,2 soilik osatzen dute [22]. Aldiz, Argentinan egindako lan baten arabera, *Candida nivariensis* espeziea hasiera batean *Candida glabrata* gisa identifikatutako isolamenduen % 2,56ri zegokion [23]. Ikerketa berriak behar dira bi espezie horien ezagueran aurrera egiteko, tartean eredu esperimentalekin egindako ikerketak.

Gure lan honetan lortutako emaitzekin erakusten da bai *Galleria mellonella* bai *Caenorhabditis elegans* infekzio eredu boteretsuak direla *Candida* patogenoa ikertzeko. Biek emaitza onak eman zituzten *Candida glabrata*ren eta berarekin harreman filogenetiko estua duten beste bi espezieen birulentzia aztertzean eta konparatzean. Farmakoekiko sentikortasuna iker daiteke etorkizun handiko ordezkari eredu hauekin. Sentikortasun horretan *Candida* espezieek edo anduiek ekoiztutako birulentzia faktoreek duten efektua ere azter daiteke. Birulentzia faktore hoiaren artean biopelikulak eta entzima hidrolitikoak aipa daitezke. Biopelikulak antifungikoekiko erresistentzia eta ostalariaren immunitate sistemarekiko babespenarekin erlazionatuta daude; entzima hidrolitikoak, berriz, legamiaren atxikimen-

duarekin, ehunetan zehar sartzeko gaitasunarekin edota inbasio berarekin [16, 17]. Gainera, *Galleria mellonella* larben hemolinfa eskura daiteke, eta bertan dauden immunitate-sistemak ekoizten dituen berezko zelulak (hemozitoak, alegia) iker ditzakegu. Horrela, patogeno gisa joka dezaketen mikroorganismoen aurka larben immunitate-sistemak nola lan egiten duen iker dezakegu, hemozitoen ekoizpeneko aldaketak edota hemozitoek patogenoak fagozitatzeke gaitasuna aztertuz [15, 19, 20]. Bide zabala dago oraindik eredu esperimental hauekin egiteko, eta *Candida* espezie eta anduien birulentzia eta haiek eragindako gaixotasunen patogenia eta terapia ezagutzeko.

## 6. ESKER ONAK

Eskerrak eman nahi dizkiogu Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Unibertsitate eta Ikerketa Sailari lan hau finantzatzeagatik (GIC15/78 IT-990-16). Ainara Hernando-Ortizek UPV/EHUko ikertzaileak prestatzeko kontratazio laguntza dauka (PIF 16/39).

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] QUINDÓS G., MARCOS-ARIAS C., SAN-MILLÁN R., MATEO E. eta 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**, 107-119.
- [2] SADEGHI G., EBRAHIMI-RAD M., MOUSAVI S.F., SHAMS-GHAHFAROKHI M. eta RAZZAGHI-ABYANEH M. 2018. «Emergence of non-*Candida albicans* species: epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile». *Journal de Mycologie Medicale*, **28**, 51-58.
- [3] MENDLING W., BRASCH J., CORNELLY O.A., EFFENDY I., FRIESE K., GINTER-HANSELMAYER G., HOF H., MAYSE P., MYLONAS I., RUHNKE M., SCHALLER M. eta WEISSENBACHER E.R. 2015. «Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis)» *Mycoses*, **58**, Suppl 1:1-15.
- [4] AMES L., DUXBURY S., PAWLOWSKA B., HO H.L., HAYNES K. eta BATES S. 2017. «*Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy». *Virulence*, **8**, 1909-1917.
- [5] ALCOBA-FLÓREZ J., MÉNDEZ-ÁLVAREZ S., CANO J., GUARRO J., PÉREZ-ROTH E. eta DEL PILAR ARÉVALO M. 2005. «Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus». *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 4107-4111.
- [6] BISHOP J.A., CHASE N., LEE R., KURTZMAN C.P. eta MERZ W.G. 2008. «Production of white colonies on CHROMagar *Candida* medium by



- members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits». *Journal of Clinical Microbiology*, **46**, 3498-3500.
- [7] ROMEO O., SCORDINO F., PERNICE I., LO PASSO C. eta CRISEO G. 2009. «A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*». *Journal of Microbiological Methods*, **71**, 117-120.
- [8] AZNAR-MARIN P., GALAN-SANCHEZ F., MARIN-CASANOVA P., GARCÍA-MARTOS P. eta RODRÍGUEZ-IGLESIAS M. 2016. «*Candida nivariensis* as a new emergent agent of vulvovaginal candidiasis: description of cases and review of published studies». *Mycopathologia*, **181**, 445-449.
- [9] LÓPEZ-SORIA L.M., BERECIARTUA E., SANTAMARÍA M., SORIA L.M., HERNÁNDEZ-ALMARAZ J.L., MULARONI A., NIETO J. eta MONTEJO M. 2013. «Primer caso de fungemia asociada a catéter por *Candida nivariensis* en la Península Ibérica». *Revista Iberoamericana de Micrología*, **30**, 69-71.
- [10] BORMAN A.M., SZEKELY A. eta JOHNSON, E.M. 2016. «Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species». *Clinical Science and Epidemiology*, **1**, e00189-16.
- [11] COTTER G., DOYLE S. eta KAVANAGH K. 2000. «Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts». *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **27**, 163-169.
- [12] GLAVIS-BLOOM J., MUHAMMED M. eta MYLONAKIS E. 2012. «Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research». *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **710**, 11-17.
- [13] SEGAL E. eta FRENKEL M. J. 2018. «Experimental in vivo models of candidiasis». *Journal of Fungi*, **4**, 21.
- [14] BREGER J, FUCHS BB, APERIS G, MOY T.I., AUSUBEL F.M. eta MYLONAKIS E. 2007. «Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay». *PLoS Pathogen*, **3**, 0168-0178.
- [15] SCORZONI L., DE LUCAS M.P., MESA-ARANGO A.C., FUSCO-ALMEIDA A.M., LOZANO E., CUENCA-ESTRELLA M., MENDES-GIANNINI M.J. eta ZARAGOZA O. 2013. «Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile». *PLoS One*; **8**, e60047.
- [16] ORTEGA-RIVEROS M., DE-LA-PINTA I., MARCOS-ARIAS C., EZPELETA G., QUINDÓS G. eta ERASO E. 2017. «Usefulness of the non-conventional *Caenorhabditis elegans* model to assess *Candida* virulence». *Mycopathologia*, **182**, 785-795.
- [17] OLSON M. L., JAYARAMAN A. eta KAO K C. 2018. «Relative abundances of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in in vitro coculture biofilms impact biofilm structure and formation». *Applied and Environmental Microbiology*, **84**, e02769-17.



- [18] BORMAN A.M., SZEKELY A., LINTON C.J., PALMER M.D., BROWN, P. eta JOHNSON, E.M. 2013. «Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom». *Journal of Clinical Microbiology*, **51**, 967-972.
- [19] GAGO S., GARCIA-RODAS R., CUESTA I., MELLADO E. eta ALAS-TRUEY-IZQUIERDO A. 2014. «*Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*». *Virulence*, **5**, 278-285.
- [20] MESA-ARANGO A.C., FORASTIERO A., BERNAL-MARTINEZ L., CUENCA-ESTRELLA M., MELLADO E. eta ZARAGOZA O. 2013. «The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast». *Medical Mycology*, **51**, 461-472.
- [21] STIERNAGLE T. 2006. «Maintenance of *C. elegans*». *WormBook*, **11**, 1-11.
- [22] LOCKHART S.R., MESSER S.A., GHERNA M., BISHOP J.A., MERZ W.G., PFALLER M.A eta DIEKEMA D.J. 2009. «Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature». *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 1216-1227.
- [23] MORALES-LOPEZ S.E., TAVERNA C.G., BOSCO-BORGEAT M.E., MALDONADO I., VIVOT W., SZUSZ W., GARCIA-EFFRON G. eta CORDOBA S.B. 2016. «*Candida glabrata* species complex prevalence and antifungal susceptibility testing in a culture collection: first description of *Candida nivariensis* in Argentina». *Mycopathologia*, **181**, 871-878.