Ekaia, 2023, 43, 41-58
https://doi.org/10.1387/ekaia.23368

ekaia
ZIENTZIA eta TEKNOLOGIA ALDIZKARIA

ISSN 0214-9001 – eISSN 2444-3255

Fumagilina mikotoxinak aspergilosi inbaditzailearen garapenean duen rola aztertzeko SPE-UHPLC-DAD metodo analitikoa

(A SPE-UHPLC-DAD method to study the role of fumagillin in the propagation of invasive aspergillosis)

Ane Yaldebere[1], *Oskar González-Mendia*[2]*, *Xabier Guruceaga*[3], *Andoni Ramirez-García*[3], *Aitor Rementeria*[3], *Rosa Alonso*[1]

[1] Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea (UPV/EHU)
[2] Pintura Saila, Arte Ederren Fakultatea (UPV/EHU)
[3] Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea (UPV/EHU)

LABURPENA: *Aspergillus fumigatus* onddoak sortutako aspergilosi inbaditzailea mehatxua da immunoeskasia duten gaixoentzat. Azkeneko ikerketa batzuen arabera, fumagilinak, onddoak sortutako mikotoxinak, gaixotasunaren hedapenarekin zerikusia duela ikusi da. Hori dela eta, konposatu honen determinazioa lagungarria izan daiteke bai gaixotasunaren mekanismoak hobeto ulertzeko eta baita aspergilosi inbaditzailearen biomarkatzaile gisa erabili ahal izateko ere. Ikerketa mikrobiologikoetan fumagilinaren analisiak garrantzia izan arren, oraindik ez da haren determinaziorako metodo kuantitatiborik garatu zelula-hazkuntzako inguruneetan. Beraz, lan honetan fumagilinaren determinazio kuantitatiborako lehenengo metodo analitikoa balidatu da RPMI-1640 zelula-hazkuntzako ingurunean. Laginaren tratamendua fase solidoko erauzketarekin egin da, anioi trukatzaile sendoak diren modu mistoko kartutxoak erabiliz. Horrela, egon daitezkeen interferentziak modu eraginkorrean ezabatu dira, eta % 83 ± 7ko berreskurapena lortu da. Analisia fotodiodo detektagailuari akoplaturiko bereizmen oso altuko likido kromatografia erabiliz egin da 336 nm-ko uhin-luzeran. Horrela, metodoak EMA (Europako Medikamentuen Agentzia) eta FDA (Elikagai eta Sendagaien Administrazioa) agentziek balidazio bioanalitikoetarako zehazten dituzten parametro guztien onartze-irizpideak betetzen dituela egiaztatu da. Gero, metodoa *A. fumigatus*-en lau andui analizatzeko aplikatu da, eta bakoitzak mikotoxinaren kantitate desberdina ekoizteko gaitasuna daukala ikusi da.

HITZ GAKOAK: fumagilina; *A. fumigatus;* SPE; UHPLC; RPMI-1640.

ABSTRACT: *Invasive aspergillosis caused by* Aspergillus fumigatus *is a threat for immunocompromised patients. According to recent studies, fumagillin, a mycotoxin produced by this fungus, has been associated with the propagation of the disease. Therefore, this molecule might help to understand the mechanisms of this disease and to study the use of fumagillin as a potential biomarker of invasive aspergillosis. In spite of the relevance of fumagillin analysis in microbiological research, no quantitative method has been developed so far for its determination in cell culture media. Here, we present the first validated method for the quantitative analysis of fumagillin in RPMI-1640. The sample treatment consists of a mixed-mode anion exchange Solid Phase Extraction that effectively removes potential interferences and offered a recovery of 83 ± 7%. The analysis was carried out by Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detection at 336 nm. The method fulfilled all the validation criteria established by EMA (European Medicine Agency) and FDA (Food and Drug Administration) guidelines for bioanalysis. Finally, the method was satisfactorily applied to the quantification of the fumagillin produced by different strains of* Aspergillus fumigatus *and it was observed that they had a different micotoxin production capacity.*

KEYWORDS: fumagillin, A. fumigatus, *SPE, UHPLC, RPMI-1640.*

**** Harremanetan jartzeko / Corresponding author:*** Oskar González-Mendia. Pintura Saila, Arte Ederren Fakultatea (UPV/EHU). – oskar.gonzalezm@ehu.eus – https://orcid.org/0000-0001-6495-1815

Nola aipatu / How to cite: Yaldebere, Ane; González-Mendia, Oskar; Guruceaga, Xabier; Ramirez-García, Andoni; Rementeria, Aitor; Alonso, Rosa (2023). «Fumagilina mikotoxinak aspergilosi inbaditzailearen garapenean duen rola aztertzeko SPE-UHPLC-DAD metodo analitikoa». *Ekaia*, 43, 2023, 41-58. (https://doi.org/10.1387/ekaia.23368).

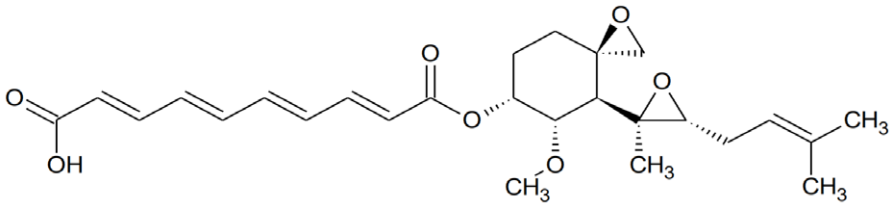
Jasotze-data: 2022, urtarrilak 17; Onartze-data: 2022, martxoak 3.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2023 UPV/EHU

Lan hau *Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-LanEratorririkGabe 4.0 Nazioartekoa* lizentzia baten mende dago

1. **SARRERA**

Fumagilina mikotoxina *Aspergillus fumigatus* onddoak sortzen duen biomolekula konplexua da (1. irudia). 1949an isolatu zen lehenengoz onddotik [1], eta lehenengoz aurkitu zenetik aurrera, agente antimikrobiar gisa erabili da hainbat aplikaziotan; hala nola, erle arruntak (*Apis mellifera*) babesteko *Nosema apis* onddo mikrosporidioak eragindako infekzioetatik [2], agente amebizida moduan erabiltzeko *Entamoeba histolytica*ren kontra [3] eta parasitoekin erlazionaturiko gaixotasunak sendatzeko arrainetan [4]. Gainera, duen aktibitate anti-angiogenikoa dela eta, fumagilinak potentzial farmazeutiko handia dauka minbiziaren tratamenduan. Hala ere, duen aktibitate toxikoaren ondorioz, debekatuta dago medikuntzan erabiltzea; baina fumagilina ordezteko hain toxikoak ez diren deribatuak garatu dira, TNP-470 eta CKD-732, kasu [5,6].



1. irudia. Fumagilinaren egitura molekularra.

Azkeneko ikerketa batzuen arabera, uste da mikotoxina honek eginkizun erabakigarriak izan ditzakeela aspergilosi inbaditzailearen garapenean [7-9]. Hori dela eta, indarra hartzen ari da fumagilina *A. fumigatus* onddoak eragindako gaixotasun hau biomarkatzaile moduan erabiltzearen ideia. Izan ere, *A. fumigatus* onddo patogeno oportunista garrantzitsuenetako bat da, eta eragiten duen aspergilosi inbaditzailearen heriotza-tasa % 40-90 ingurukoa denez gero [10], lehentasun handiko erronka da gaixotasuna garaiz detektatzea. Horretarako, hobeto ezagutu behar da onddoak sortutako fumagilinaren ekoizpena, bai eta mikotoxinak organismo bizidunen itu-zelulekin dituen elkarrekintzak ere. Ondorioz, beharrezkoa da biomolekula honen kuantifikazio fidagarria bermatzen duten metodo analitikoak garatzea hazkuntza-ingurunean, biofluido edo organoetan. Edonola ere, dakigunez, oraindik ez da fumagilinaren analisi kuantitatiborako metodorik garatu matrize hauetan. Hazkuntza-ingurunean biomolekula honen determinaziorako garatutako metodoak kualitatiboak izan dira [7, 9, 11].

Fumagilinaren erabilera antimikrobiarra dela eta, haren analisirako garatu diren metodo analitiko gehienak eztian [2, 12-18] edo arrain-ehunetan [3, 19, 20] egin dira mikotoxinaren kontzentrazioa neurtzeko. Horiez

gain, beste matrize batzuetan ere egin da determinazioa; hala nola, ur gainazalean [21] edo esnekietan [22]. Metodo hauek, gehienbat, alderantzizko likido-kromatografian oinarritzen dira, fotodiodo (PDA) [3, 13, 18-20, 23] edo masa espektrometria (MS) [13, 14, 16, 17, 21, 22] detektagailuei akoplaturik. MS bidezko detekzioak sentikortasun handiagoa badu ere, merkeagoa eta erabilerrazagoa den PDA detekzioak kuantifikazio-muga egokiak eskaintzen ditu, fumagilinaren absortzio handiaren ondorioz (335 eta 350 nm-ko uhin-luzeretan) [5]. Aurretratamenduari dagokionez, normalean, laginaren diluzio bat egiten da urarekin, edo erauzketa, disolbatzaile organikoak erabiliz. Horren ostean, gehienetan fase solidoko erauzketa (SPE) egiten da, alderantzizko kartutxo polimerikoak erabiliz. Horrela, elkarrekintza hidrofobikoen eraginez, fumagilina kartutxoan erretenitutaloturik geratzen da. Hala ere, Kanda eta lankideek [15] frogatu zuten bezala, garbiketa hobea lor daiteke modu mistoko kartutxoak erabiliz.

Edonola dela, esan beharra dago fumagilinaren egonkortasun falta oztopo izan daitekeela beraren kuantifikazioa egiteko. Izan ere, mikotoxina honen aurkikuntzaz geroztik, hainbat ikerketa egin ziren duen egonkortasuna aztertzeko [24-26]. Ikerkuntza horietan fumagilina argiaren aurrean degradatzen dela frogatu zen, karbono-katearen ziklazio bat dela eta. Ordudanik, sakon aztertu izan da degradazio-prozesu hau. Esaterako, Assil eta laguntzaileek [18] ezti lagin bat egun batez argipean utzi ondoren, molekularen bi heren degradatu zirela ikusi zuten. Bracket eta laguntzaileek [23], berriz, azetonitrilotan prestatutako fumagilina disoluzioa 6 orduz argipean utziz, mikotoxinaren % 40 degradatu zela ikusi zuten. Gainera, autore hauek ikusi zuten fumagilina ezegonkorra dela 366 nm-ko ultramore (UV) argipean dagoenean, baina 254 nm-ko UV argipean, ordea, molekula ez dela degradatzen. Bestalde, Garrett eta Eble-k ikusi zuten 400 nm-tik gorako argipean oso urria dela degradazio fotolitikoa [24].

Fumagilinak aspergilosi inbaditzailearen garapenean eragina izan dezakeela ikusirik, beraren analisia erabilgarria izan daiteke infekzioaren hedapen-mekanismoak ulertzeko eta, hain zuzen ere, mikotoxinaren efektua aztertzeko eta infekzio-markatzaile moduan duen erabilgarritasuna ikasteko. Hori dela eta, lan honen helburua fumagilinaren determinaziorako metodo analitiko baten balidazioa egitea izan da RPMI-1640 zelula-hazkuntzako ingurunean. Izan ere, metodoa *A. fumigatus* onddoaren anduien analisia egiteko aplikatuko da, onddoak sortutako fumagilinaren ekoizpena aztertzeko. Laginaren tratamendua SPE bidez burutu da eta, analisirako, fotodiodo detektagailuari akoplaturiko bereizmen oso altuko likido kromatografia (SPE-UHPLC-PDA) erabili da.

2. FUMAGILINAREN ANALISIA RPMI-1640 ZELULA-HAZKUNTZAKO INGURUNEAN

2.1. Materiala eta erreaktiboak

Fumagilina (≥ % 90), diklofenako sodioa eta RPMI-1640, Dubelco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Ham's F12 (HAMS) eta Basal Medium Eagle (BME) zelula-hazkuntzako inguruneak Sigma-Aldrich (Saint Louis, AEB) etxe komertzialak hornitu ditu. Ingurune hauek guztiak % 10 behi-serum fetala (FBS), 200 mM L-glutamina, 60 mg/L penizilina G, 100 mg/L estreptomizina eta 250 μg/L anfoterizina B gehituz prestatu dira (Sigma-Aldrich). Bestalde, salda lisogenikoa (LB) (Panreac [Bartzelona, Espainia] etxe komertzialak hornitua), glukosa gutxiko salda ingurunea (GMM) (hainbat gatz eta nutrienteren nahasketa, Shimizu eta lankideen [27] prozedura jarraituz prestatua) eta legamia-glukosa salda (YG) (5 g/L legamia-erauzkin eta 10 g/L glukosarekin) ere erabili dira. Estandarrak eta UHPLCaren fase mugikorrak prestatzeko, supergradiente HPLC kalitateko metanola (MeOH) eta azetonitriloa (AZN) (Scharlau [Bartzelona, Espainia]) erabili dira. Bestalde, pH ezberdineko tanpoi disoluzioak prestatzeko, azido formikoa (LC-MS kalitatekoa, Fluka [Burch, Suitza]), amonio formiatoa (≥ % 99, Fluka), trisodio fosfatoa (Pro Analysi, Merck) eta potasio dihidrogeno fosfatoa (Pro Analysi, Merck) erabili dira. Tween-20 Sigma-Aldrich etxetik eskuratu da. Erabilitako ur ultrapurua Milli-Q Element A10 sistematik (Millipore, Milford, AEB) lortutakoa izan da. Azkenik, SPE egiteko erabili diren kartutxo mistoak Waters (Milford, AEB) etxeko Oasis MAX (1 cc, 30 mg) kartutxoak izan dira.

2.2. Instrumentazioa

Fumagilinaren analisia egiteko, PDAri akoplatutako Waters etxeko Acquity UPLC sistema kromatografikoa erabili da. Zutabe kromatografikoa Waters etxekoa izan da, Acquity BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 μm) hain zuzen ere. Bestalde, Empower 2 software-a erabili da sistema kromatografikoaren kontrola eta datuen prozesatzea egiteko.

SPE egiteko, Millipore huts-ponpari akoplatutako 12 portuko Supelco Visiprep (Sigma-Aldrich) huts-sistema erabili da. Disoluzioen pH-a neurtzeko erabilitako pH-metroa Crison pH Meter GLP 22 markakoa izan da, 5209 modeloko beirazko elektrodo konbinatuarekin. Pisaketak egiteko, Sartorius etxeko CP224-s (±0,0001 g) balantza analitikoa erabili da, eta laginak irabiatzeko, VWR Mixer Dig Vortex 230V EU VWR International (Pensilvania, AEB) irabiagailua.

2.3. **Disoluzio estandarrak eta lanerako disoluzioak**

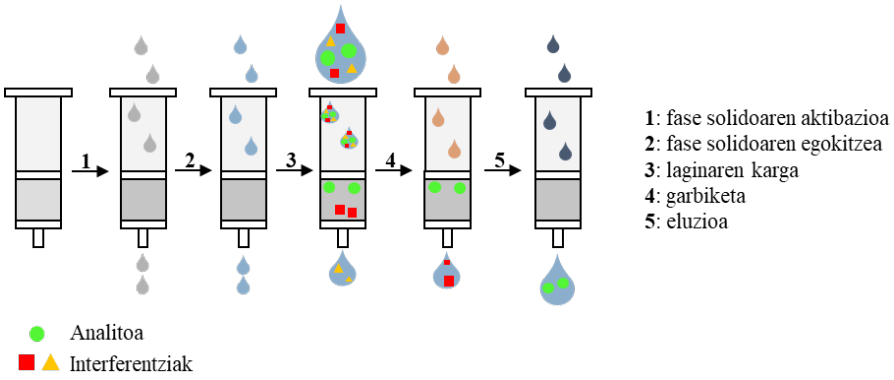
Fumagilinaren 1.000 mg/L-ko stock disoluzioa etanoletan prestatu da, eta –20 ºC-an gorde da anbar koloreko bialean. Bertatik abiatuz, 20 mg/L-ko lanerako disoluzioa prestatu da azetonitrilotan eta –20 ºC-an gorde. Gainerako laneko disoluzioak bertatik abiatuz prestatu dira, analisiaren egunean bertan. Barne estandarra (BE) den diklofenakoaren 1.000 mg/L-ko disoluzioa azetonitrilotan prestatu da, eta –20 ºC-an gorde. Disoluzio horretatik abiatuz, 20 mg/L-ko laneko disoluzioa prestatu da azetonitrilotan eta tenperatura berean gorde.

Bestalde, fumagilinaren degradazio fotolitikoa dela eta, estandar guztiak anbar koloreko bialetan prestatzeaz gain, molekularen degradazioa gutxitzeko, laginen tratamendua argi gorripean egin da, lanparetan iragazki gorriak jarriz.

2.4. **RPMI-1640 inguruneko laginen tratamendua SPE bidez**

RPMI-1640 ingurune konplexua izanik, beharrezkoa da laginen tratamendua egitea sistema kromatografikoan injektatu aurretik. Horretarako, ikerketa taldeak RPMI-1640 laginentzat aurretik optimizatutako SPE prozedura jarraitu da. Laburbilduz, SPEko kartutxo desberdinak probatu ziren: alderantzizko fasekoak (Oasis HLB, Waters; Strata-X, Phenomenex) eta modu mistoko kartutxoak (BondElute NH2, Agilent; Oasis MAX, Waters). Bertan Oasis MAX kartutxoak eraginkorrenak direla ikusi zen; izan ere, modu mistoan fumagilinaren erretentzioa elkarrekintza ionikoen eta apolarren bidez gertatzen da, eta beraz, erauzketa selektiboagoa lortu daiteke, baldintzen arabera analitoaren erretentzioa alda baitaiteke. Azkenik, SPE prozedura esperimentuen diseinuaren bidez optimizatu zen.

Beraz, laginaren tratamendurako prozedura hurrengo baldintzak jarraituz egin da: 500 μL RPMI-1640 lagina BEarekin dopatu da 750 μg/L-ko kontzentrazioan, 1 mL-ra diluitu da fosfato tanpoiarekin (100 mM, pH 12) eta irabiatu da. Ondoren, SPEko kartutxoak kargarako prestatu dira. 1 mL MeOH-arekin aktibatu eta 1 mL fosfato tanpoirekin (100 mM, pH 12) egokitu dira. Gero, laginak kartutxoetatik zehar pasarazi dira, eta 1 mL fosfato tanpoi (100 mM, pH 12) MeOH (55:45) disoluzioarekin garbitu. Kartutxoak 5 minutuz utzi dira hutsean lehortzen, eta horren ostean, 1 mL MeOH:HCOOH (96,5:3,5) disoluzioa erabili da eluzioa egiteko. Azkenik, lagina kromatografiarako baldintzetara egokitzeko, 500 μL eluatori beste 500 μL fase mugikor urtsu gehitu zaizkio (ikusi 2.5 azpiatala), zentrifugatu da (10.000 bira/min, 5 minutu) eta UHPLC sisteman injektatu (2. irudia) da.



2. irudia. SPEaren urratsak. Lehenengo urratsa fase solidoaren aktibazioari dagokio eta, bigarrena, egokitzeari. Hirugarren urratsean laginaren karga egiten da, eta horren ondoren garbiketa (4. urratsa). Amaitzeko, analitoaren eluzioa egiten da.

2.5. **Laginen analisia UHPLC-PDA bidez**

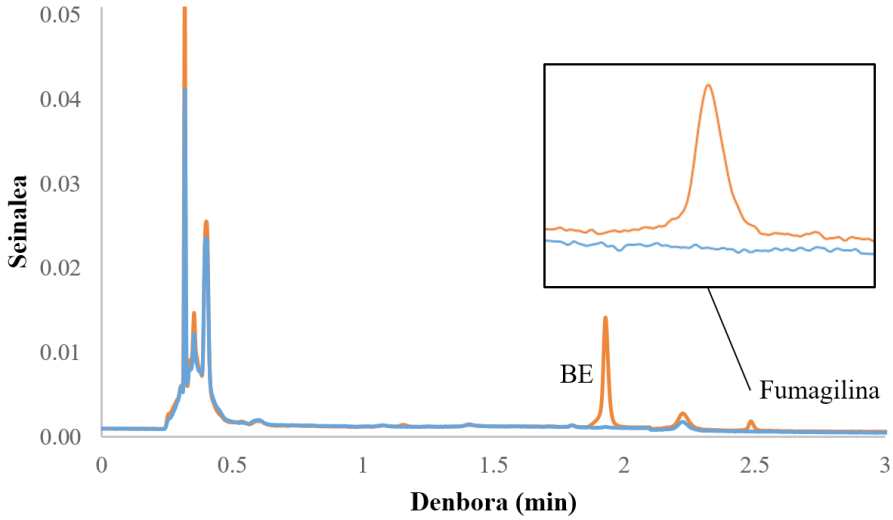
Zelula-hazkuntzako inguruneko laginen banaketa kromatografikorako, bi fase mugikor erabili dira, fase urtsua (A) eta fase organikoa (B). A fasea amonio/amoniako (50 mM, pH 10) tanpoia izan da, eta B, berriz, AZN purua. Gradientea % 20 B-rekin hasi da 0,5 minutura arte konstante mantenduz. Gero, B-ren konposizioa linealki igotzen hasi da 5,5. minutuan % 95 izan arte, eta bertan konstante mantendu da minutu batez. 7. minutuan hasierako baldintzetara bueltatu da, eta bertan mantendu da hiru minutuz. 0,4 mL/min-ko fluxua erabili da, zutabe kromatografikoa 35 ºC-an mantendu da eta laginak, berriz, 4 ºC-an. Lagin bakoitzeko injektatutako bolumena 5 μL-koa izan da. 336 eta 280 nm-ko uhin-luzerak erabili dira fumagilina eta diklofenakoa detektatzeko, hurrenez hurren. Konposatu hau BE moduan aukeratu da, erretentzio kromatografiko egokia baitu (ez da fumagilinaren gailurrarekin gainjartzen) eta fumagilinaren antzeko joera baitauka aurretratamenduan zehar .

2.6. **Metodo analitikoaren balidazioa**

Metodoaren balidazioa Europako Medikamentuen Agentziak (EMAk) [28] eta Elikagai eta Medikamentuen Administrazioak (FDAk) [29] bioanalisietarako finkatutako irizpideak jarraituz egin da. Hori dela eta, metodoaren selektibitatea, kalibrazio-kurba, zehaztasuna, doitasuna, diluzioaren integritatea eta fumagilinaren egonkortasuna aztertu dira hainbat baldintzatan RPMI-1640 zelula-hazkuntzako ingurunean.

2.6.1. *Selektibitatea*

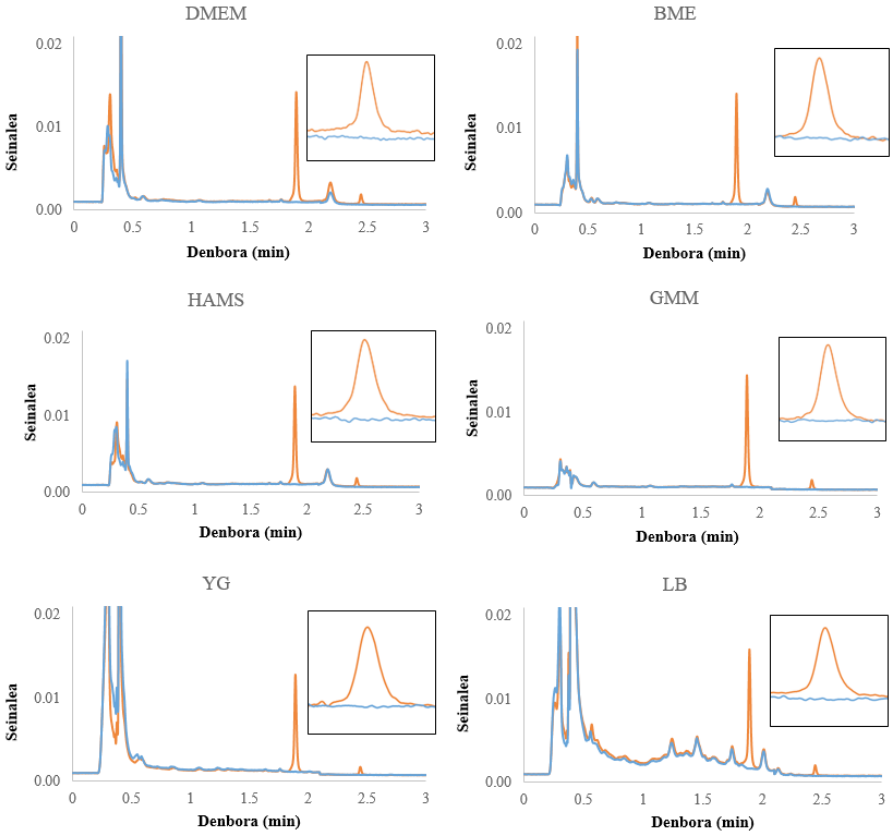
Metodo bat selektiboa izateak esan nahi du gaitasuna duela intereseko analitoa BE lagineko gainerako konposatuetatik bereizteko. Horretarako, lagin zurietan (alegia, fumagilinarik ez duen RPMI-1640) fumagilina eta BEaren erretentzio-denboretan agertzen den seinalea konparatu behar da fumagilinarekin eta BEarekin dopatutako laginekin. Gidalerroen arabera, dopaketa hau fumagilinaren beheko kuantifikazio-mugan (LLOQ muga), hots, 25 μg/L-ko kontzentrazioan, egin behar da. Lagin zurietan lortutako seinaleak LLOQan lortutako seinalearen % 20 baino txikiagoa izan behar du fumagilinarentzat, eta BEaren kasuan, berriz, % 5 baino txikiagoa. Beheko kromatograman ikus daitekeen bezala, ez da interferentziarik ageri fumagilinaren ez eta BEaren erretentzio-denboran (1,9. eta 2,5. minutuak, hurrenez hurren), eta agentziek araututako irizpideak bete dira (3. irudia).



3. irudia. 25 μg/L-an fumagilinarekin dopatutako RPMI-1640 lagina (laranja) eta RPMI-1640 lagin zuria (urdina)

Bestalde, odola edo gernua bezalako laginetan balidazioa egitean, aldakortasun handiko matrizeak direnez gero, agentzien arauen arabera selektibitatea matrizearen sei iturri desberdinetan aztertu behar da. Kasu honetan, ordea, RPMI-1640 matrizearen iturri desberdinak aztertu beharrean, sei hazkuntza-ingurune desberdinetara aplikatu da metodo analitikoa. Horietako hiru zelula-hazkuntzako ohiko inguruneak izan dira; DMEM, HAMS eta BME, hain zuzen ere. Gainerako hirurak, berriz, hazkuntza-ingurune mikrobiologikoko likido (salda) estandarrak izan dira: LB, GMM eta YG. SPEari, banaketa kromatografikoari eta detekziorako uhin-luzera egokiari

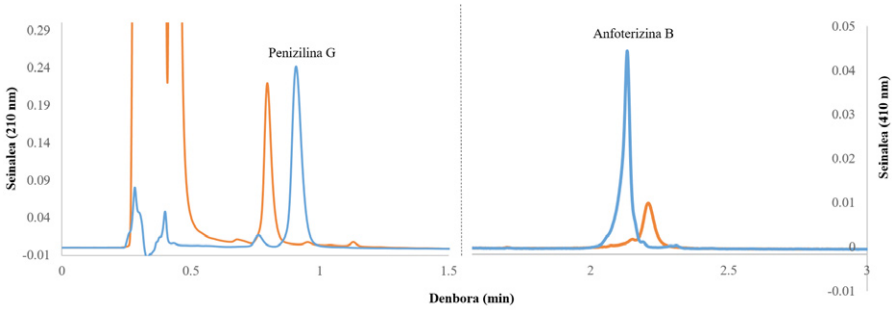
esker, ingurune batean ere ez da agertu interferentzia esanguratsurik fumagilinaren eta BEaren erretentzio-denboran (4. irudia). Hori dela eta, esan daiteke metodo analitikoa selektiboa dela matrize hauetarako.



4. irudia. 25 μg/L-an fumagilinarekin dopatutako laginak (kromatograma laranjak) eta lagin zuriak (kromatograma urdinak)

Selektibitatearekikoak amaitzeko, RPMI-1640 zelula-hazkuntzako ingurunean askotan gehitzen diren eta interferentzia izan daitezkeen antimikrobiarren disoluzio estandarrak (15 mg/L penizilina G, 25 mg/L estreptomizina eta 72,5 μg/L anfoterizina B) kromatografikoki analizatu dira MeOH:fase mugikor urtsuan (1:1). Espero zitekeen bezala, estreptomizina ez da analisi kromatografikoan detektatu. Izan ere, konposatu honek ez du ultramore-tartean argirik xurgatzen [30]. Penizilinari dagokionez, haren gailur kromatografikoa 0,9. minutuan agertu da, eta anfoterizina B-arena, berriz, 2,1. minutuan (5. irudia). Erretentzio-denbora hauek fumagilinaren

eta BEaren erretentzio-denboren desberdinak direnez, ez da egongo hauek interferentzia izateko arriskurik.



5. irudia. Antimikrobiarrak dituen RPMI-1640 lagin zuriaren kromatograma SPE egin ondoren (laranja), eta penizilina G eta anfoterizina B disoluzio estandarren kromatogramak (urdina). Prozesatzeko erabilitako uhin-luzera konposatu bakoitzaren absortzio maximoaren arabera ezarri da: 210 nm penizilina G-arentzat (0-1,5 min) eta 410 anfoterizina B-arentzat (1,5-3,0 min)

Antimikrobiarren erretentzio-denborak fumagilinaren eta BEaren denborekin bat etorri ez arren, konposatuak SPEan eliminatzen ote diren ziurtatu nahi izan da, SPE selektiboa den ikusteko. Hori dela eta, antimikrobiarrak dituen RPMI-1640 lagin zuri bat antimikrobiarren kromatogramarekin konparatu da. 5. irudian ikus daitekeen moduan, RPMI-1640 lagin zurian gailur batzuk ageri dira antimikrobiarren erretentzio-denboratik gertu. Gailur horiek antimikrobiarrei dagozkien ikusteko, haien ultramore-ikuskor espektroak konparatu egin dira penizilinaren eta anfoterizina B-aren espektroekin. Espektroak bat ez datozela ikusi ostean, antimikrobiarrak aurretratamenduan zehar guztiz ezabatzen direla ondorioztatu ahal izan da. Gainera, konposatu hauek SPEan guztiz garbitzea lortuko ez balitz, garatutako metodo kromatografikoa gai izango litzateke BEtik eta fumagilinatik banantzeko, erretentzio-denbora desberdina baitaukate.

2.6.2. *Kalibrazio kurba*

Kalibrazio-kurbak eraikitzeko, RPMI-1640 lagin zuriaz eta zero puntuaz gain (fumagilinarik ez duen RPMI-1640 baina BE baduena), fumagilinarekin dopatutako zazpi puntu prestatu dira 25 μg/L-1.500 μg/L-ko tartean. Izan ere, kontzentrazio-tarte horretan *A. fumigatus* onddoak ekoitzitako fumagilinaren kontzentrazioa barne hartzea espero da. Aipatutako kalibrazio-puntu horiek 25 μg/L, 75 μg/L, 200 μg/L, 500 μg/L, 750 μg/L, 1.000 μg/L eta 1500 μg/L izan dira, RPMI-1640 ingurunean prestatuak. Kurba eraikitzeko, BEarekin zuzendutako fumagilinaren seinalea kontzen-

trazio nominalaren aurrean irudikatu da. Gutxienez sei kalibrazio-estandarren errore erlatiboa (% RE) % 15 baino txikiagoa izan denez (±% 20 LLOQaren kasuan), esan daiteke kalibrazio-kurba egokia dela. Gainera, lorturiko korrelazio-koefizienteen balioak 0,994-0,998 tartean egon dira, kalibrazio-kurben linealtasuna handia dela adierazten duen datua, izan ere.

2.6.3. *Zehaztasuna eta doitasuna*

Bestalde, zehaztasuna eta doitasuna ere aztertu dira. Horretarako, kalibrazio-tarte osoa barne hartzen duten fumagilinaren kalitate-kontroleko (QC) laginak prestatu dira lau kontzentrazio mailatan RPMI-1640 ingurunean (beheko kuantifikazio-mugan, kontzentrazio baxuan, erdiko kontzentrazioan eta kontzentrazio altuan): 25 μg/L (LLOQ), 50 μg/L (LQC), 750 μg/L (MQC) eta 1200 μg/L (HQC). Maila bakoitzetik bost erreplika prestatu dira; horrela, egun barneko zehaztasuna eta doitasuna kalkulatu da. Gainera, esperimentua hiru egun desberdinetan eginez, egunen arteko zehaztasuna eta doitasuna ere aztertu da. Zehaztasuna errore erlatibo (% RE) moduan eman da, eta doitasuna, berriz, desbideratze estandar erlatibo (% RSD) moduan. QC laginen kontzentrazio maila guztien egun barneko (3 egunetan) eta egunen arteko % RE eta % RSD balioak % 15 baino txikiagoak izan direnez, eta LLOQaren kasuan, berriz, % 20 baino txikiagoak, esan daiteke metodoa zehatza eta doia dela (1. taula):

1. taula. Egun barneko eta egunen arteko lau kontzentrazio mailen zehaztasuna (% RE) eta doitasuna (% RSD). Egun barneko saiakuntzen kasurako, hiru egunen batez bestekoaz gain, lortutako balio minimoak (min) eta maximoak (max) ere ageri dira

	Egun barnekoa		Egunen artekoa	
Kontzentrazioa (μg/L)	**Zehaztasuna (% RE)** Batez bestekoa (min-max)	**Doitasuna (% RSD)** Batez bestekoa (min-max)	Zehaztasuna (% RE)	Doitasuna (% RSD)
25 (LLOQ)	11,0 (1,5-17,3)	10,9 (7,2-15,3)	0,5	16,8
50 (LQC)	4,1 (0,1-7,2)	11,5 (7,5-14,8)	4,0	11,6
750 (MQC)	8,2 (7,3-9,6)	9,1 (4,0-11,8)	8,1	9,3
1200 (HQC)	5,4 (0,9-10,1)	4,0 (1,7-5,6)	5,7	5,3

2.6.4. *Diluzioaren integritatea*

Lehen esan bezala, ikerketa osoan zehar analizatuko diren laginak aukeratutako kalibrazio-tarte barruan sartzea espero da. Hala ere, gerta daiteke laginen batek kalibratuaren goiko kuantifikazio-muga (1.500 μg/L) baino kontzentrazio altuagoa izatea. Kasu horretan, beharrezkoa izango da diluzioa egitea eta, beraz, diluzioaren integritatea deritzona aztertu behar da laginak diluituz SPE tratamenduaren aurretik. Diluzio urratsak azkeneko emaitzaren kuantifikazio fidagarria bermatzen duela ziurtatzeko, fumagilinarekin 5.000 μg/L-an dopatutako RPMI-1640 lagina hamar aldiz diluitu da bost erreplikatan, eta aurretratamenduaren ondoren kromatografikoki analizatu. Kasu honetan ere, % RE eta % RSD balioek ezin dute ±% 15 balioa gainditu, eta % 13,0 eta % 14,3 izan dira, hurrenez hurren. Beraz, garatutako metodoarekin posible da 5.000 μg/L-rainoko laginak analizatzea amaierako emaitzaren zehaztasun eta doitasunean eraginik eduki gabe.

2.6.5. *Egonkortasuna*

Fumagilinaren egonkortasuna hainbat baldintzatan aztertzeko, kontzentrazio maila baxuan (50 μg/L) eta altuan (1200 μg/L) dopatutako RPMI-1640 laginak erabili dira, eta saiakuntza bakoitzeko hiru erreplika prestatu dira. Horietako batzuk lagina prestatu bezain laster analizatu dira, bertan lortzen den kontzentrazioa gainerako saiakuntzetan lortzen denarekin konparatzeko. Horrela, hurrengoak izan dira egonkortasuna aztertzeko egindako saiakuntzak:

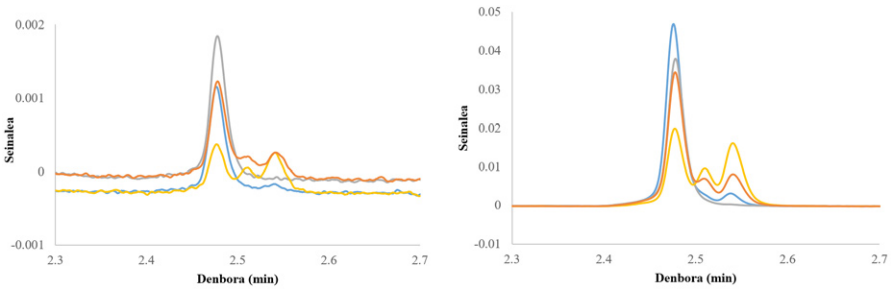
— Izoztu/desizoztu saiakuntza: hiru ziklo egin dira. Ziklo bakoitzean, laginak izoztuta eduki dira –20 ºC-an 24 orduz; desizoztu arte itxaron zaie, eta berriro izoztu.
— Prozesatutako laginen egonkortasuna: laginak injektore automatikoan utzi dira 4 ºC-an 24 orduz eta, gero, berriro injektatu.
— Epe luzeko egonkortasuna: laginak bi hilabetez utzi dira izozkailuan –20 ºC-an, eta gero analizatu.
— Tratamendu etaparen egonkortasuna: aurretratamenduan zehar fumagilinaren egonkortasuna aztertzeko, bi baldintza ebaluatu dira: lagin batzuk argi gorripean utzi dira lau orduz, eta besteak, berriz, laborategiko argipean lau orduz. Gainera, matrizeak analitoaren aurrean daukan eragina hobeto ulertzeko, esperimentu berdina egin da beste behin, baina fumagilina-laginak uretan prestatuz.

Analitoa egonkorra dela esateko, maila bakoitzaren kontzentrazioaren batez bestekoek kontzentrazio nominalaren ±% 15en barruan egon behar dute. Hots, errore erlatiboak % 15 baino txikiagoa izan behar du. 2. taulan ageri da saiakuntza bakoitzean kontzentrazio maila baxuko (50 μg/L) eta altuko (1.200 μg/L) laginentzat lorturiko kontzentrazioaren aldaketaren ehunekoa.

2. taula. Egonkortasuna aztertzeko egin diren saiakuntzetan lortu diren kontzentrazioen aldakuntzen ehunekoa, egunean prestatutako laginarekin konparatuz

	50 μg/L (LQC)	1.200 μG/L (HQC)
Injektore automatikoko egonkortasuna	+7,3	–0,6
Izoztu/desizoztu egonkortasuna	–6,7	+2,9
Epe luzeko egonkortasuna	–11,6	–6,3
Laborategiko argipeko egonkortasuna	–41,2	–31,0
Argi gorripeko egonkortasuna	–3,3	–0,5

Fumagilina egonkorra da aztertutako baldintza guztietan laborategiko argipean izan ezik. Goiko taulan ikus daitekeen bezala, kasu horretan kontzentrazioaren aldakuntza % 15 baino handiagoa da; hain zuzen ere, RPMI-1640 laginak laborategiko argipean 4 orduz egon ostean, galdu egiten da fumagilinaren % 41,2 (LQC) eta % 31,0 (HQC). Galera hau analitoaren degradazioari dagokio. Izan ere, baldintza horietan lorturiko kromatogrametan ikus daitekeen bezala (6. irudia), fumagilinaren bi degradazio produktu agertzen dira. Produktu hauek fumagilina baino ez-polarragoak dira, eta haien ultramore-ikuskor espektroak fumagilinarenaren antzekoak dira. Degradazio fotolitiko honen eraginez, fumagilinaren kromoforoa beste kromoforo batzuetara (neofumagilina(k)) eraldatzen da; hain zuzen ere, fotodegradazioaren ondorioz sortutako konposatu hauek jada beste ikertzaile batzuek ikusitakoak dira [13, 17, 24].



6. irudia. Ezkerrean, 50 μg/L-an dopatutako laginen kromatograma, eta eskuinean, berriz, 1.200 μg/L-an dopatutakoarena. Kolore griseko kromatogramak 4 orduz argi gorripean egondako RPMI-1640 laginei dagozkie; urdin kolorekoak, argi gorripeko ur laginei; laranja kolorekoak, laborategiko argipean egondako RPMI-1640 laginei; eta hori kolorekoak, berriz, laborategiko argipean egondako ur laginei

Aipatzekoa da uretan dopatutako laginen kontzentrazio-aldaketa handiagoa izan dela: % 68,7 (LQC) eta % 56,6 (HQC). Beste autore batzuen ikerlanen datuekin konparatuz, Brackett eta lankideek [23] azetonitrilotan

prestatutako 20 mg/L-ko fumagilina disoluzioa 6 orduz argipean utziz, fumagilinaren % 40 degradatu zela ikusi zuten. Kochansky eta Nasr-ek [31], berriz, % 50 etanoletan prestatutako 42 mg/L-ko fumagilina disoluzioa argipean 5,5 orduz egon ondoren, % 62ko degradazioa ikusi zuten. Bestalde, Dmitrovic eta Durden-ek [17], azetonitrilotan prestatutako 10 mg/L-ko fumagilina disoluzioa 3 orduz argipean utziz, fumagilina % 3 degradatu zela ikusi zuten; eta disoluzioa eguzkipean utzita, ordea, fumagilinaren berehalako degradazio osoa gertatu zen. Desberdintasun hau laborategiko argiztapen desberdinek azal lezakete. Dena dela, uretan prestatutako disoluzioak zelula-hazkuntzako ingurunean prestatutakoekin konparatuta, fumagilinaren degradazioa handiagoa da uretan, eta beraz, badirudi RPMI-1640 matrizeak apur bat gutxitzen duela fumagilinaren degradazioa.

2.7. **Metodoaren aplikazioa onddo anduien ekoizpena aztertzeko**

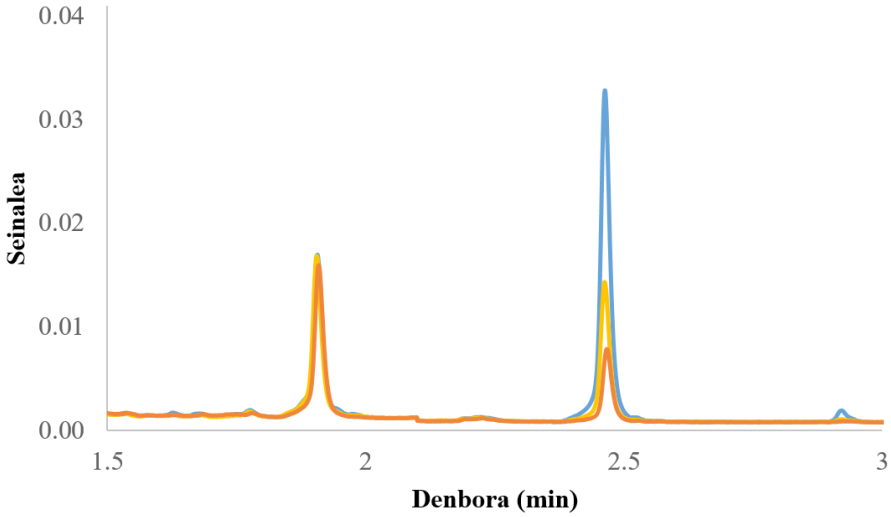
RPMI-1640 zelula-hazkuntzako ingurunean metodoaren balidazioa egin ostean, *A. fumigatus*en lau andui erabili dira fumagilinaren ekoizpena kuantifikatzeko: CEA10, Af293, *ΔakuB*^{KU80} eta PB2021. Lagin hauek UPV/EHUko *Onddo eta Bakterioen Biomika* ikerkuntza taldeak hornitu ditu. Laginak prestatzeko, Fortwendel eta lankideen [32] prozedura jarraituz, onddoa GMM ingurunean eduki da zazpi egunez 37 ºC-an. Anduien konidioak bi aldiz bildu eta garbitu dira gatz-Tween-20 (SS-T) disoluzioarekin (% 0,9 NaCl eta % 0,02 Tween-20). Gero, andui bakoitzetik $5 \cdot 10^6$ konidio inokulatu dira 2 mL RPMI-1640tan, 6 putzutako plaketan. Plakak 37 ºC-an inkubatu dira, % 5 CO_2 eta % 95eko hezetasuna duen atmosferan, 24 eta 48 orduz. Denbora igaro ondoren, kultiboen 1 mL zentrifugatu (14.000 rpm, 5 minutu), eta bertako gainjalkina bildu da laginaren tratamendua eta analisia egiteko balidatutako metodoaren bidez.

Esan beharra dago 24 orduz inkubatuta egondako laginetan kuantifikazio-mugaren (25 μg/L) azpitik egon dela konposatuaren kontzentrazioa. Hurrengo taulan 48 orduz inkubatuta egondako anduien fumagilinaren kontzentrazioa adierazten da, desbiderapen estandarrarekin batera (3. taula):

3. taula. 48 orduz inkubatzen egondako A. fumigatus andui desberdinen fumagilinaren kontzentrazioa

Anduia	Fumagilina kontzentrazioa (μg/L)
CEA10	150 ± 13
Af293	<LLOQ
ΔakuB^{KU80}	604 ± 42
PB2021	221 ± 18

Ikus daitekeen moduan, laginetan lortutako kontzentrazioak ondo egokitzen dira 25 μg/L-1.500 μg/L tarte linealean eraikitako kalibratura, Af293 laginean izan ezik. Andui honetan kalkulatu den fumagilinaren kontzentrazioa metodo analitikoaren kuantifikazio-mugaren azpitik agertu da, eta beraz, ezin izan da kuantifikatu. Bestalde, aipatzekoa da andui batetik bestera dagoen mikotoxinaren kontzentrazioaren aldakortasuna, eta *ΔakuB*^{KU80} anduian lortu den fumagilinaren kontzentrazio altua. Gainerako hiru anduietan lorturiko kromatogramak hurrengo irudian ageri dira (7. irudia).



7. irudia. Ezkerrean, 50 μg/L-an dopatutako laginen kromatograma, eta eskuinean, berriz, 1.200 μg/L-an dopatutakoarena. Kolore griseko kromatogramak 4 orduz argi gorripean egondako RPMI-1640 laginei dagozkie; urdin kolorekoak, argi gorripeko ur laginei; laranja kolorekoak, laborategiko argipean egondako RPMI-1640 laginei; eta hori kolorekoak, berriz, laborategiko argipean egondako ur laginei

3. ONDORIOAK

Gero eta argiago dago fumagilinak aspergilosi inbaditzailean eragin garrantzitsua izan dezakeela. Beraz, indarra hartzen ari da mikotoxina hau biomarkatzaile moduan erabiltzearen ideia. Hori dela eta, beharrezkoa da lan honetan proposatutako metodo kuantitatiboak garatzea; izan ere, horrela toxinen askapena ikertu eta onddo-diagnostikoari buruzko azterlanak egin ahal izango dira. Eztian edo arrainetan fumagilina determinatzeko metodoak garatu badira ere, hemengo hau izan da, guk dakigunez, balidatutako zelula-hazkuntzako lehenengo metodo kuantitatiboa. Modu mistoko SPE kartutxoak erabiliz ma-

trizeko interferentziak behar bezala garbitzea lortu da, eta UHPLC bidezko banaketari eta PDA detekzioari esker, metodo fidagarri bat lortu da. Horrela, frogaturik utzi da metodoak bete egiten dituela agentziek araututako parametroen (selektibitatea, kalibrazio-kurba, zehaztasuna, doitasuna, diluzioaren integritatea eta egonkortasuna) onartze-irizpideak. Aipatzekoa da metodoa selektiboa izan dela ikertutako hazkuntza-ingurune desberdinetarako. Hortaz, ikerketa honetan garatutako metodo analitikoa beste testuinguruetan aplikatu daiteke. Gainera, egiaztatu egin da —fumagilinaren fotodegradazioa gorabehera— laginaren tratamendurako argi gorria erabiltzea aukera egokia dela.

Amaitzeko, proposatutako metodoak lagundu egin dezake fumagilinaren ikerketa mikrobiologikoak aurrera eramaten, eta baita molekula honek aspergilosi inbaditzailean duen eginkizuna hobeto ulertzen ere. Aipatzekoa da metodoa zelula-hazkuntzako ingurunerako optimizatu bada ere, erraz aplikatu daitekeela beste matrize batzuetara; hala nola, plasmara, gernura edo ehunetara. Matrizez aldatuz gero, ordea, kontuan izan behar da beharrezkoa izan daitekeela aurretratamenduan zehar aldaketaren bat egitea.

ESKER ONA

Egileek eskerrak eman nahi dizkiete Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) (GIU19/068 proiektua eta COLAB20/11 proiektua) eta Eusko Jaurlaritzari (IT1362-19 zenbakiko diru-laguntza), emandako laguntza ekonomikoagatik. XGk eskerrak eman dizkio Eusko Jaurlaritzari doktoretza aurreko bekagatik.

BIBLIOGRAFIA

[1] Hanson, F. R., Eble, T. E. 1949. «An antiphage agent isolated from Aspergillus Sp». *Journal of Bacteriology*, **58**, 527-529.

[2] Van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Curtis, J. M., Pernal, S. F. 2015. «Stability of dicyclohexylamine and fumagillin in honey». *Food Chemistry*, **179**, 152-158.

[3] Fekete, J., Romvári, Z., Gebefügi, I., Kettrup, A. 1998. «Comparative study on determination of fumagillin in fish by normal and reversed phase chromatography». *Chromatographia*, **48**, 48-52.

[4] Molnár, K., Ferenc, B., Székely, C. 1987. «Fumagillin, an efficacious drug against renal sphaerosporosis of the common carp Cyprinus carpio». *Diseases of Aquatic Organisms*, **2**, 187-190.

[5] Guruceaga, X., Perez-Cuesta, U., Abad-Diaz De Cerio, A., Gonzalez, O., Alonso, R. M., Hernando, F. L., Ramirez-Garcia, A., Rementeria, A. 2020. «Fumagillin, a Mycotoxin of Aspergillus fumigatus: Biosynthesis, Biological Activities, Detection, and Applications». *Toxins*, **12**, 7.

[6] Lee, H. S., Choi, W. K., Son, H. J., Lee, S. S., Kim, J. K., Ahn, S. K., Hong, C. I., Min, H.-K., Kim, M., Myung, S.-W. 2004. «Absorption, distribution, metabolism, and excretion of CKD-732, a novel antiangiogenic fumagillin derivative, in rats, mice, and dogs». *Archives of Pharmacal Research*, **27**, 265-272.

[7] Guruceaga, X., Ezpeleta, G., Mayayo, E., Sueiro-Olivares, M., Abad-Diaz-De-Cerio, A., Aguirre Urízar, J. M., Liu, H. G., Wiemann, P., Bok, J. W., Filler, S. G., Keller, N. P., Hernando, F. L., Ramirez-Garcia, A., Rementeria, A. 2018. «A possible role for fumagillin in cellular damage during host infection by Aspergillus fumigatus». *Virulence*, **9**, 1548-1561.

[8] Gayathri, L., Akbarsha, M. A., Ruckmani, K. 2020. «In vitro study on aspects of molecular mechanisms underlying invasive aspergillosis caused by gliotoxin and fumagillin, alone and in combination». *Scientific Reports*, **10**, 14473.

[9] Filho, A. P. Da C., Brancini, G. T. P., De Castro, P. A., Valero, C., Ferreira Filho, J. A., Silva, L. P., Rocha, M. C., Malavazi, I., Pontes, J. G. de M., Fill, T., Silva, R. N., Almeida, F., Steenwyk, J. L., Rokas, A., Dos Reis, T. F., Ries, L. N. A., Goldman, G. H. 2020. «Aspergillus fumigatus G-Protein Coupled Receptors GprM and GprJ Are Important for the Regulation of the Cell Wall Integrity Pathway, Secondary Metabolite Production, and Virulence». *mBio*, **11**, e02458-20.

[10] Gauthier, G. M., Keller, N. P. 2013. «Crossover fungal pathogens: The biology and pathogenesis of fungi capable of crossing kingdoms to infect plants and humans». *Fungal Genetics and Biology*, **61**, 146-157.

[11] Wiemann, P., Guo, C.-J., Palmer, J. M., Sekonyela, R., Wang, C. C. C., Keller, N. P. 2013. «Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 17065-17070.

[12] Higes, M., Nozal, M. J., Alvaro, A., Barrios, L., Meana, A., Martín-Hernández, R., Bernal, J. L., Bernal, J. 2011. «The stability and effectiveness of fumagillin in controlling Nosema ceranae (Microsporidia) infection in honey bees (Apis mellifera) under laboratory and field conditions». *Apidologie*, **42**, 364-377.

[13] Nozal, M. J., Bernal, J. L., Martín, M. T., Bernal, J., Álvaro, A., Martín, R., Higes, M. 2008. «Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array–electrospray ionization mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, **1190**, 224-231.

[14] Van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Curtis, J. M., Pernal, S. F. 2015. «Determination of Dicyclohexylamine and Fumagillin in Honey by LC-MS/MS». *Food Analytical Methods*, **8**, 767-777.

[15] Kanda, M., Sasamoto, T., Takeba, K., Hayashi, H., Kusano, T., Matsushima, Y., Nakajima, T., Kanai, S., Takano, I. 2011. «Rapid determination of fumagillin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the QuEChERS method». *Journal of AOAC International*, **94**, 878-885.

[16] Lopez, M. I., Pettis, J. S., Smith, I. B., Chu, P.-S. 2008. «Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1553-1559.

[17] Dmitrovic, J., Durden, D. A. 2013. «Analysis of Fumagillin in Honey by LC-MS/MS». *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, **96**, 687-695.

[18] Assil, H. I., Sporns, P. 1991. «ELISA and HPLC methods for analysis of fumagillin and its decomposition products in honey». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 2206-2213.

[19] Fekete, J., Romvári, Z., Szepesi, I., Morovján, G. 1995. «Liquid chromatographic determination of the antibiotic fumagillin in fish meat samples». *Journal of Chromatography A*, **712**, 378-381.

[20] Guyonnet, J., Richard, M., Hellings, PH. 1995. «Determination of fumagillin in muscle tissue of rainbow trout using automated ion-pairing liquid chromatography». *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **666**, 354-359.

[21] Ivešić, M., Krivohlavek, A., Žuntar, I., Tolić, S., Šikić, S., Musić, V., Pavlić, I., Bursik, A., Galić, N. 2017. «Monitoring of selected pharmaceuticals in surface waters of Croatia». *Environmental Science and Pollution Research International*, **24**, 23389-23400.

[22] Jia, W., Chu, X., Ling, Y., Huang, J., Chang, J. 2014. «Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, **1345**, 107-114.

[23] Brackett, J. M., Arguello, M. D., Schaar, J. C. 1988. «Determination of fumagillin by high performance liquid chromatography». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 762-764.

[24] Garrett, E. R., Eble, T. E. 1954. «Studies on the Stability of Fumagillin. I. Photolytic Degradation in Alcohol Solution». *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, **43**, 385-390.

[25] Eble, T. E., Garrett, E. R. 1954. «Studies on the stability of fumagillin. II. Photolytic degradation of crystalline fumagillin». *Journal of the American Pharmaceutical Association*, **43**, 536-538.

[26] Garrett, E. R. 1954. «Studies on the Stability of Furnagillin. III. Thermal Degradation in the Presence and Absence of Air». *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, **43**, 539-543.

[27] Shimizu, K., Keller, N. P. 2001. «Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in Aspergillus nidulans». *Genetics*, **157**, 591-600.

[28] European Medicines Agency. 2011. Guideline on bioanalytical method validation. *Committee for Medicinal Products for Human Use (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009)*.

[29] Fda, U. 2018. Bioanalytical method validation guidance for industry, US Department of Health and Human Services. *Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Biopharmaceutics*, 1-44.

[30] Van Bruijnsvoort, M., Ottink, S. J. M., Jonker, K. M., De Boer, E. 2004. «Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, **1058**, 137-142.

[31] Kochansky, J., Nasr, M. 2004. «Laboratory studies on the photostability of fumagillin, the active ingredient of Fumidil B1». *Apidologie*, **35**, 301-310.

[32] Fortwendel, J. R., Juvvadi, P. R., Pinchai, N., Perfect, B. Z., Alspaugh, J. A., Perfect, J. R., Steinbach, W. J. 2009. «Differential effects of inhibiting chitin and 1,3-{beta}-D-glucan synthesis in ras and calcineurin mutants of Aspergillus fumigatus». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 476-482.