

***Candida aurisek* sortutako infekzioak
tratatzeko alternatiba terapeutiko berrien
ikerketa**

Egilea:
Borja Herrera Alonso
Zuzendaria:
Elena Sevillano Peña

© 2020, Borja Herrera Alonso, Elena Sevillano Peña

LABURPENA

Sarrera eta Helburua: Onddoek sortutako infekzioen intzidentziak gora egin dute etengabe 90eko hamarkadaren hasieratik, hauen artean *Candida* generoak sortutakoak garrantzitsuenak izanik. Azken urteotan, garrantzi berezia hartu du *Candida auris* espezie berriaren agerpen globalak. Espezie hori osasun-zentroetan sortutako agerraldiekin erlazionatu da, non kandidiasi inbaditzaileak sortzen dituen. Infekzio hauek zailak dira tratatzeko espezie honek hainbat farmako antifungikoekiko erresistentea delako, eta alternatiba terapeutiko berriak bilatzera garamatza, hala nola, farmako ezberdinen konbinaketak, efektu sinergikoa lortzeko nahian. Beraz, lan honen helburua, flukonazola eta isabukonazola, zitral eta farnesola olio esentzialekin konbinatu egin ziren, eragin sinergikoa azaltzen zuten aztertzeko.

Metodologia: *Candida auris* 17 isolamendu kliniko aztertu ziren, La Fe Hospitaleko Mikrobiologia Zerbitzuak (Balentzia) emanda. *Candida auris* anduien kontrako gutxieneko kontzentrazio inhibitzailea (MIC) kalkulatu zen, bai bakarka zein konbinatuta, xake taula metodoa erabiliz, EUSCAT E.Def 7.3.1. dokumentuan gomendatutako metodoa jarraituz.

Emaitzak: Flukonazol eta zitralaren arteko konbinazioak eragin sinergikoa eman zuen flukonazolari erresistentea den *Candida auris* 3 isolamenduetan, eta eragin gehigarria, 8 isolamenduetan. Gainera, flukonazolaren MIC baloreak 1-2 µg/mlra jaisteak lortu zen. Flukonazol eta farnesolaren arteko konbinazioa eragin gehigarria eman zuen 4 isolamenduetan, eta eragin ez esanguratsua, 10 isolamenduetan. Isabukonazol eta zitralaren arteko konbinazioak eragin sinergikoa eman zuen 3 isolamenduetan, eta eragin gehigarria 9 isolamenduetan.

Ondorioak: Isabukonazol eta zitralaren arteko konbinazioa erangikorrena zela azaldu zen, eta ondoren, flukonazola eta zitralaren artekoa. Nahiz eta *in vivo* ikerketak egin behar diren eraginkortasuna baieztatzeko, konbinazio hauekin lortutako emaitzak oso itxaropentsuak dira *Candida auris* andui multierresistenteek sortutako infekzio inbaditzaileak tratatu ahal izateko.

Hitz gakoak: *Candida auris*, kandidiasi inbaditzailea, antifungikoekiko erresistentziak, zitrala, farnesola, konbinazioak

AURKIBIDEA

1. SARRERA.....	1
1.1. <i>Candida</i> generoa.....	1
1.2. <i>Candida auris</i> espeziea.....	4
1.3. <i>Candida auris</i> sortutako infekzioen tratamendua.....	6
2. HELBURUAK.....	9
3. MATERIAL ETA METODOAK.....	9
3.1. Ikerketa anduiak.....	9
3.2. Kontrol anduiak.....	11
3.3. Farmakoak eta erabilitako beste substantziak.....	11
3.4. <i>In vitro</i> ikerketak. <i>In vitro</i> sentikortasunaren azterketa xake-taula metodoaren bidez.....	11
3.4.1. Loewe-ren gehigarritasun teoria.....	14
4. EMAITZAK.....	15
4.1. Flukonazola eta zitralaren konbinazioaren eragina.....	15
4.2. Isabukonazola eta zitralaren konbinazioaren eragina.....	17
4.3. Flukonazola eta farnesolaren konbinazioaren eragina.....	19
5. EZTABAIDA.....	21
6. ONDORIOAK.....	24
7. BIBLIOGRAFIA.....	24

1. SARRERA

1.1. *Candida* GENEROA

Candida generoa Fungi erreinuaren barnean aurkitzen da, Ascomycota azpierreinuan eta Sacharomycetales ordenean (Bonifaz, 2012; Laforet 2010). Egitura zelular eukariotoa duen onddo zelulabakarra da. Legamia bat izanik, orokorrean, forma biribila zein obalatu izaten du (5-6µm-ko egitura txikia), baina hodi germinalak eta tabikatutako hifak garatzen dituzten beste espezie batzuk ere ikus daitezke (Rosenthal K, Murray P, Pfaller M, 2016).

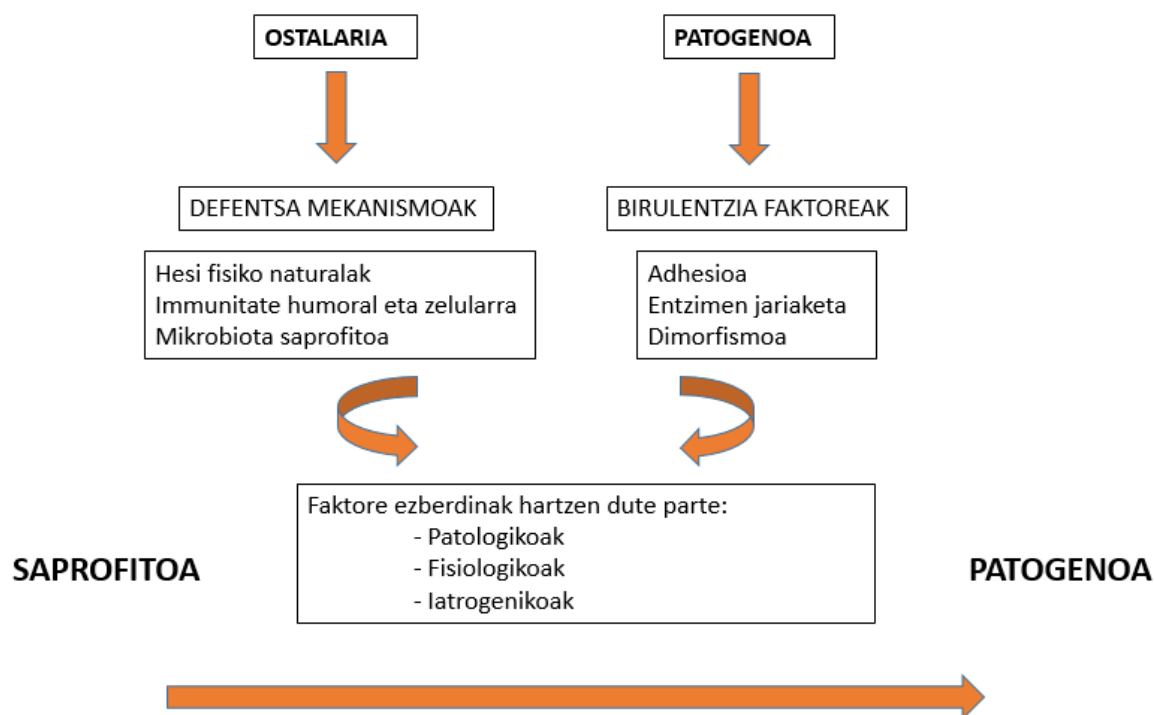
Oro har, *Candida* generoaren espeziak ohiko hazkuntza inguruetan hazteko gai dira, hala nola, Sabouraud agarra, non 37° C-tan, 24-72 ordutan, kolonia biribilak osatzen ditu, lauak zein zimurtsuak, eta usain bereizgarria sortuz. Ingurune kromogenoetan desberdintasunak ikus daitezke generoko espezieen artean, espezie bakoitza berezko tonalitatearekin hazten baita, beixetik urdin iluneraino aldatzen diren koloreekin (Quindós, 2015).

Candida generoaren barruan 150 espezie ezberdin baino gehiago isolatu eta aztertu dira. Gaur egun, onddo patogenoen barruan garrantzitsuenak dira; izan ere, espezie batzuk gizakietan mikosi oportunistak sortzen dituen etiologia ohikoena delako (Rosenthal K et al., 2016).

Candida onddo saprofitoa da eta gizakiarekin sinbiosian bizi da, azala eta mukosa ezberdinak kolonizatuz. Ohiko kokapena digestio aparatu osoan (ahotik uzkira) eta gernu-bidean bada ere, beste kokapen batzuk kolonizatu ditzake, esaterako, bagina, uretra, azala edo azazkalen azpiko espazioa, gizakienak zein beste homeotermo batzuenak, eta hauek bizi diren ingurune naturaletatik isolatu daiteke ere (Brown CC et al., 2007; Sampinato & Leonaldi, 2013; Rosenthal K et al., 2016; Quindós, 2015).

Nahiz eta gizakien mikrobiotaren parte izan, patogeno oportunista dela esan beharra dago; izan ere, egoera berezi batzuetan, hala nola, immunoeskasia egoeratan, alterazio endokrinoak daudenean edota tratamendu antibiotikoaren ostean mikosiak sor ditzake, larritasun-maila desberdinekoak izan daitezkeenak (Quindós G, 2015).

Mikroorganismoaren birulentzia faktoreak eta ostalariaren defentsa-mekanismoen alterazioa konbinatu behar dira mikosiak garatzeko (**1.irudia**).



1. irudia. Mikroorganismo saprofitoak patogeno bihurtzeko ostalariaren defentsa mekanismo eta birulentzia faktore taula (Quindós G et al., 2015 liburutik egokitua).

Kandidiasiak, orokorrean, bi taldetan sailkatzen dira. Alde batetik, azaleko infekzioak daude, ohikoenak ahoko muget-a eta faringeoak, eta bulbobaginitisa (emakumeetan) eta balanitisa (gizonetan) izanik. Infekzio horiek maiz geratzen diren arren, infekzio arinak izaten dira eta erraz tratatu daitezke.

Beste aldetik, sakoneko infekzioak ematen dira, batez ere, immunoeskasiaren egoeratan, organo desberdinetan kandidiasi inbaditzaileak sortuz. Odolera heltzen denean, kandidemia sortuko da eta mikroorganismoa errazago hedatuko da beste organoetara egoera larriagoak sortuz (**1.taula**). Azken hauek osasun arloan arazoak sortzen dituzte, hots, ospitalizazioa behar duten etiologia fungiko ohikoenak izaten baitira (Sarna & Upadhyay, 2017; Adreup MC & Patterson TF, 2017; Barbedo et al., 2017).

1. Taula. Kandidiasi mota ezberdinak.

AZALEKO INFEKZIOAK		SAKONEKO INFEKZIOAK	
Azalekoak	Intertrigoa	Lokalizatuak	Peritonitisa
	Folikulitisa		Esofagitisa
Mukosetakoak	Orofarigenoa	Sistemikoak	Endokarditisa
	Bulbobaginala		Hepatoesplenikoa
	Esofagitisa		Infekzio neonatala
	Gernu maskurikoa		Kandidemia
Azazkaletakoak	Onikomikosia		Sepsia
	Paronikia		
Beste batzuk	Kanpoko otitisa		
	Keratitisa		

Onddoek sortutako infekzioen intzidentziak gora egin dute etengabe 90eko hamarkadaren hasieratik, mundu mailan urtean 400.000 kasu identifikatzen direlarik (datu gehienak herrialde garatuetan jasotzen dira). Lehen aipatu den moduan, 150 espezie baino gehiago deskribatu badira ere, kandidiasi kasu gehienak (%90) bost espezie nagusik eragiten dituzte. *Candida albicans* lagin klinikoetan gehien isolatzen den espeziea da, eta haren atzetik, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* eta *Candida krusei* espezieak daude (Jeffrey-Smith, 2018; Sarna & Upadhyay, 2017; Cantón et al., 2011; Quindós, 2015).

Hala ere, kasu batzuetan beste espezie batzuk inplikaturik egon daitezke infekzioen sorkuntzan, eta horien identifikazioa egitea garrantzitsua da tratamendua hobeto bideratu ahal izateko. Azken urteotan, garrantzi berezia hartu du *Candida auris* espezie berriaren agerpen globalak. Espezie hori osasun-zentroetan sortutako agerraldiekin erlazionatu da, eta erresistentzia intrintsekoa izan dezake hainbat farmako antifungiko motaren aurrean. (Jeffrey-Smith, 2018; Lee et al., 2011).

1.2. *Candida auris* ESPEZIEA

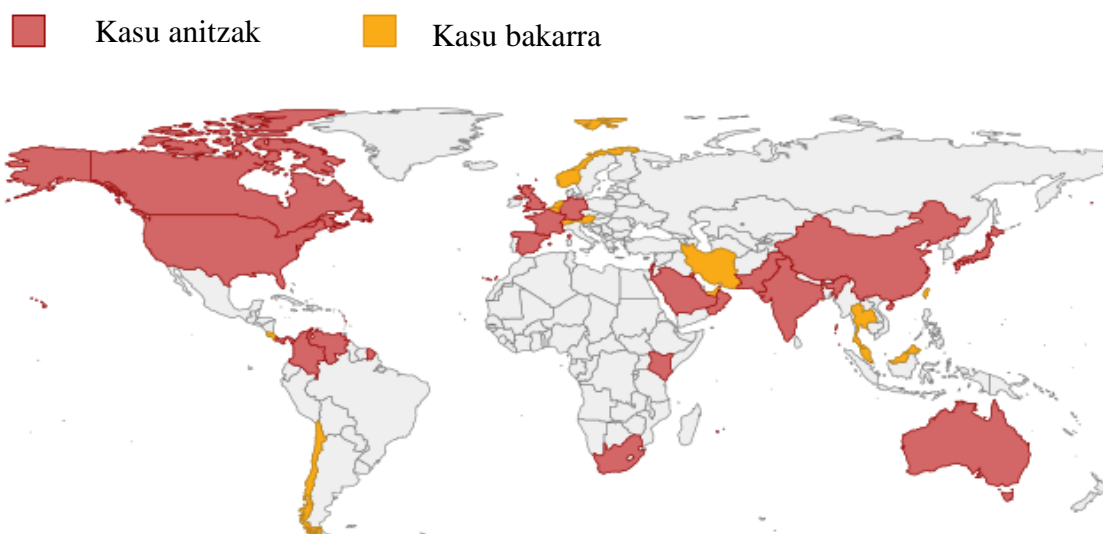
Candida auris espeziea Japonian identifikatu zen lehen aldiz, paziente baten belarri kanaletik hartutako lagin batetik eta hortik datorkio izena; izan ere, “auris” terminoak latinez belarria esan nahi du (Jeffrey-Smith, 2018; Lee et al., 2011; Satoh K et al., 2009; Lockhart SR et al., 2007; Sarna & Upadhyay, 2017).

Nahiz eta 2009. urtean lehenengo datu dokumentatuak aurkitu, 1996. urtean Korean isolatu zen lehen aldiz, paziente pediatriko baten odolean kirurgia bat egin baino lehen (Lockhart SR et al., 2007). Une hartan identifikaziorako erabiltzen ziren metodo fenotipiko eta biokimikoen zehaztasun faltagatik, ez zen modu zuzenean identifikatu (Lee et al., 2011). Gaur egun, teknika molekular (sekuentziazioa, PCR, polimorfismoen analisisa) edo MALDI-TOF masen espektrometriak bezalako teknikei esker espezie hau zuzen identifikatzea lortu da, eta, horri esker, haren hedapena munduan zehar aztertu ahal izan da (Sarna & Upadhyay, 2017; Jeffrey-Smith et al., 2018).

Hurrengo urteetan, hots, 2012an, Amerikan lehenengo kasu dokumentatua aurkitu zen Venezuelan, eta 2013. urtean Kolonbian hainbat infekzio eragiten zituela aztertu zen. Indian, Hego Afrikan edota Kuwait-en *Candida auris* infekzio kasuak agertzen hasi ziren handik denbora gutxira, mundu osoan kasuak agertuz (Lockhart SR et al., 2007; Sarna & Upadhyay, 2017; Andreup MC & Patterson TF, 2017).

2016. urtean Ameriketako Estatu Batuak (EEBB) eta Erresuma Batuak (EB) osasun alerta adierazi zuten *Candida auris* mikroorganismoaren aurrean (Sarna & Upadhyay, 2017). Gaur egun, EEBB-tan, odol infekzioen eragileen artean, *Candida auris* sortutako kandidemia 4. infekzio ohikoena suertatzen da (Ostrosky-Zeichner, 2003; Laforet, 2010). Hala ere, lehen aipatu den bezala identifikazioa zaila suertatzen denez, eta herrialde ez garatuetan froga egiteko aukerarik ez dagoenez, oraindik espezie honen diagnostiko okerra burutzen da eta zaila da bere benetako hedapena eta eragin globala ezagutzea (Bartie et al., 2001; Chang et al., 2001) (**2.irudia**).

Candida auris INFEKZIOEN KASU DOKUMENTATUAK (2019)



2. irudia. Mundu mailan *Candida auris*ek eragindako infekzioen kasuen mapa (BBC 2019).

Patogeno honek, orokorrean, arrazoi ezberdinengatik immunosupresio handia duten pazienteetan eragiten ditu kalteak; bereziki, ospitaleratuta dauden pertsonetan (Sarna & Upadhyay, 2017). Osasun eremuetan nahiko erraz hedatu daitekeen infekzioa da, hainbat aste ingresatuta egondako pazienteetan, kateter benoso zentrala jarrita eduki duten pertsonetan. Arrisku populazioa umeak eta adinekoak izaten dira, kalteak birika eta bihotzean sortuz batez ere, eta kasu larrietan, kandidemia larria eta sepsia eraginez (Cázares-Nuñez C. et al. 2017). Aipatu beharra dago, antineoplasiko eta immunosupresore indartsu eta toxikoen erabilera gero eta ohikoagoa dela osasun eremuan hainbat gaixotasun eta patologia ezberdin sendatzeko eta tratatzeko, eta honek, immunitate sistemaren jaitsiera eragiten duela onddoen infekzioak areagotuz (Lobaina T. et al., 2010).

Candida auris espezieak infekzio inbaditzaileak ematen ditu, mikroorganismoak dituen birulentzia faktore ezberdinak erabilia. Aipatu beharra dago, patogenizitate faktore garrantzitsuen artean fosfolipasak eta proteasak ekoizten dituela, eta hauen ondorioz, kalte larriak sortu. Era berean, legamia honek biofilmak sortzeko ahalmena du, hots, taldeetan antolatzen dira gainazal desberdinetara, hala nola kateterretara,

ospitaleratutako pazienteetan koadro larriak sortuz (Rosenthal et al., 2016; Quindós G, 2015).

Gainera, egiaztatu da ospitale-ingurunean denbora luzez irauteko gaitasuna duela, *Candida albicans* baino iraunkortasun tasa handiagoa izanik, eta infekzio-iturri etengabea izan daiteke agerraldi ezberdinak sortuz, batez ere, zainketa intentsiboetako unitateetan (Jeffrey-Smith, 2018; Ostrosky-Zeichner, 2003; Sarna & Upadhyay, 2017).

*Candida auris*en ezaugarri nagusia antifungikoei aurre egiteko gaitasuna da, onddo espezieak duen polimorfismoagatik eta dituen erresistentzia mekanismoengatik. Beste *Candida* espezieekin konparatuta eragin dituen infekzioen heriotza-tasa handia da, %30-60koa (Arendrup & Patterson, 2017), baina egia da heriotza ez dela beti infekzioari egotzi behar, pazienteek azpian beste gaixotasun larri batzuk izaten baitituzte (Pappas et al., 2003; Jeffrey-Smith, 2018). Osasun arloaz aparte, maila sozioekonomikoan ere arazo larriak sortzen ditu, hau da, pazienteen ospitalaratze denboraren luzapena, antibiotiko berri eta garestiagoen beharra, eta abar (Lokhart SR et al., 2007).

Farmakoekiko erresistentziak garatzeko *Candida auris* espezieak hainbat mekanismo aktibatzen ditu, bere iraunkortasuna bermatzeko: alde batetik, antifungikoaren kontzentrazio intrazelularra murrizteko mekanismoak jartzen ditu martxan; eta beste aldetik, farmakoarekiko duen afinitatea gutxitzen du, drogak duen ekintza farmakologikoa blokeatuz; eta azkenik, antifungikoak duen efektuaren aurka egiteko (Spampinato & Leonardi, 2013).

Beraz, aurreko guztiaren ondorio gisa, esan beharra dago, azkeneko urteotan *Candida auris* onddo patogeno emergente bezala katalogatuta izan dela, maila globalean osasun mehatxu larria suposatzen duena.

1.3. *Candida auris* SORTUTAKO INFEKZIOEN TRATAMENDUA

*Candida auris*ek agerraldi nosokomialak eragiten ditu, bereziki zainketa intentsiboetako unitateetako pazienteekin eta kateterren erabilerarekin lotutakoak, non kandidemia eta kandidiasi inbaditzaileekin erlazionatzen den, heriotza tasa altuak azaltzen dituztenak (Quindós et al., 2018).

Literaturan, infekzio fungikoak tratatzeko ekinokandinak dira lehen lerroko farmakoak, baina, askotan, praktika klinikoan azol eratorriak erabili izan dira, espezie honen identifikazioa berandu burutzen delako (Chowdhary A et al., 2018; Sarna & Upadhyay, 2017). Azolak onddoen horma-zelularreko ergosterolaren sintesia inhibitzen dute, mikroorganismoaren biziraupena mugatuz eta hau hilez. Eragin mikrobiologiko berdina sortzen duten beste farmakoen artean alilaminak eta morfolinak aurkitzen dira. Hiru talde hauek ekintza farmakologiko berdina erakutsi dute *Candida auris* infekzioari aurre egiteko (Gonzalez AM et al., 2019; Rosenthal K et al., 2016).

Horma zelularreko ergosterolaren sintesia inhibitzen duten farmakoez aparte, glukanoaren sintesia inhibitzen dutenak (kandinak, adibidez, ekinokandina, kaspofungina edota zilofungina), azido nukleikoaren sintesiaren inhibitzaileak (hala nola, fluzitosina), zatiketa zelularra inhibitzen dutenak (griseofulbina) eta mintz zelularrean eragin zuzena duten farmakoak (makrolido polienoak: nistatina eta anfoterizina B) aurkitzen dira (**2.taula**) (Sanjay G, 2017; Villacampa Castro T et al, 2019).

2.taula. Antifungiko sailkapena.

EKINTZA MEKANISMOAK		ANTIFUNGIKOAK
Ergosterolaren sintesiaren inhibitzaileak		- Azolen eratorriak - Alilaminak - Morfolinak
Glukanoaren sintesiaren inhibitzaileak		- Ekinokandinak
Azido nukleikoaren sintesiaren inhibitzaileak		- Fluzitosina
Mintz zelularrean eragin zuzena duten antifungikoak		- Makrolido polienoak (nistatina eta anfoterizina B)
Zatiketa zelularra inhibitu		- Griseofulbina

Gaur egun, ez dago guztiz eraginkorra den tratamendurik mikroorganismo honen aurka egiteko, beraz, erronka terapeutiko handia izaten da *Candida auris* espezieak sortutako infekzioen tratamendu egokia aukeratzea. Izan ere, Ameriketako Estatu Batuetako Gaixotasun Kontrol eta Prebentzio Zentroak (CDC) burututako analisi batetan antzeman zen *Candida auris* anduien %93a flukonazolekiko erresistenteak zirela. Era berean, anduien %50a borikonazolekiko erresistentzia azaldu zuten, %35a anfoterizina B-rekiko eta %7a ekinokandinekiko. Gainera, analisi honetan ziurtatu zen espeziearen %41a bi antifungiko ezberdinei erresistentea zela; eta %3a, hiru talde farmakologikoei, honek suposatzen dituen arazoak kontuan hartuta (Jeffrey-Smith, 2018; Lee et al., 2011; Chowdhary et al., 2017; Larkin et al., 2017; McCarthy & Walsh, 2017; Arendrup MC & Patterson TF, 2017).

Aurretik aipatutako guztiaren ondorio gisa, alternatiba terapeutiko berriak beharrezkoak direla ikusi da, patogeno oportunistaren kontra egiteko. Talde farmakologiko berriak ikertzen ari dira, hauetarako inbertsio ekonomiko handia behar delarik. Gainera, garatzen diren farmako berriak oso garestiak izaten dira eta ezin dira herrialde eta pertsona guztietan erabili. Honen adibide gisa, 3H8 antigorputz monoklonala, glikofosfatidilinositol fungikoaren sintesiaren inhibitzaileak (E1210 agentea), ekinokandina MIG0310 berria, ekinokandina CD101 berria, arilamidina T 2307 eta efumafungina SCY 078 aurki ditzakegu (Marcilla A et al., 1999; Cortes-Hidalgo P. et al., 2017).

Beste alternatiba bat, ekintza mekanismo desberdina duten antifungikoen arteko konbinaketa erabiltzea lirateke; izan ere, sinergiak eman daitezke erresistentziak gainditu ahal izateko. Esaterako, Fakhim eta bere taldeko ikerlariek egindako ikerketan aipatzen den moduan, eragin sinergikoa antzeman zen *Candida auris* multierresistentearen aurka mikafungina eta borikonazola konbinatzean (Fakhim et al., 2017).

Hala ere, ekinokandinek duten kostu ekonomikoa dela eta, ikerketa gehienak azol eratorriak konbinatzerazuzentzen dira, hauek ekonomikoagoak baitira. Estrategia itxaropentsuenetariko bat flukonazola beste farmako zein sustantzia naturalekin konbinatzea da, flukonazolaren eragin antifungikoa potentziatzeko eta sinergia emateko asmoarekin (Spampinato & Leonaldi, 2013; Oliveira et al., 2019; Wall et al., 2018).

Efektu hau, esaterako, flukonazola antiinflamatorio ez esteroideoekin, antibiotiko ezberdinekin, immunomodulatzailerekin edota talde antimikotikoetan sailkaturik ez dauden sustantziekin konbinatzerakoan ikertu da; izan ere, konbinaketa hauek *Candida albicans* eta beste espezie batzuen kontra eraginkortasuna azaldu baitute (Oliveira et al., 2019; Wall et al., 2018).

Candida espezie ezberdinen kontra eragin sinergikoa erakutsi duten konposatuen artean eta azol eratorriekin konbinaketan, zitrala eta farnesola bezalako olio esentzialak aurkitzen dira. Hori dela eta, lan honetan olio esentzial hauek flukonazol eta isabukonazolarekin konbinatu egin ziren *Candida aurisen* kontrako eragina ikertzeko.

2. HELBURUAK

Candida auris onddoak kandidemia eta infekzio inbaditzaile larriak sortzeko ahalmena duen mikroorganismoa da, antifungikoen erresistentzia maila handiak azaltzen duena. Hori del eta, emandako infekzio larri hauek zailak suertatzen dira tratatzeko eskura ditugun farmakoekin, eta alternatiba terapeutiko berriak bilatzera garamatza, hala nola, farmako ezberdinen konbinaketak, efektu sinergikoa lortzeko.

Lan honen helburua, beraz, onddoen infekzioetan erabiltzen diren antifungiko ohikoak, hala nola, azol eratorriak, eta beste sustantzia ezberdin batzuekin konbinazioak egitea izan zen, *Candida aurisen* kontra eraginkorrak diren edo ez aztertzeko. Helburu orokor hau aurrera eramateko hurrengo helburu partzialak planteatu ziren:

- Flukonazola eta zitralaren arteko konbinazioaren eraginkortasuna aztertu
- Flukonazola eta farnesolaren arteko konbinazioaren eraginkortasuna aztertu
- Isabukonazola eta zitralaren arteko konbinazioaren eraginkortasuna aztertu

3. MATERIAL ETA METODOAK

3.1. IKERKETA ANDUIAK

Ikerketa lan honetan, guztira, *Candida auris* 17 isolamendu kliniko aztertu ziren, hauek guztiak, La Fe Hospitaleko Mikrobiologia Zerbitzuak (Balentzia) emanda. Hurrengo taulan, andui hauen identifikazio zenbakia eta lagin klinikoaren jatorria azaltzen da (**3.taula**).

3.taula.Aztertuako *candida auris* isolamendu klinikoak eta laginaren jatorria.

UPV/EHU zenbakia	Espezia	Lagin klinikoa
17-213	<i>Candida auris</i>	Hemokultiboa
17-257	<i>Candida auris</i>	Hemokultiboa
17-259	<i>Candida auris</i>	Hemokultiboa
17-261	<i>Candida auris</i>	Hemokultiboa
17-263	<i>Candida auris</i>	Hemokultiboa
17-265	<i>Candida auris</i>	Hemokultiboa
17-269	<i>Candida auris</i>	Orofaringea
17-270	<i>Candida auris</i>	Orofaringea
17-272	<i>Candida auris</i>	Orofaringea
17-274	<i>Candida auris</i>	Orofaringea
17-278	<i>Candida auris</i>	Orofaringea
17-280	<i>Candida auris</i>	Gernua
17-283	<i>Candida auris</i>	Gernua
17-285	<i>Candida auris</i>	Gernua
17-287	<i>Candida auris</i>	Gernua
17-289	<i>Candida auris</i>	Gernua
17-291	<i>Candida auris</i>	Gernua

3.2. KONTROL ANDUIAK

Azterketa honetan, kontrol esperimenterako, “American Type Culture Collection” (ATCC) erakundearen 2 andui erabili ziren. Honako taula honetan adierazitakoa dira (4.taula):

4. Taula: Erabilitako kontrol anduiak

IDENTIFIKAZIO ZENBAKIA	ESPEZIEA
ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>

3.3. FARMAKOAK ETA ERABILITAKO BESTE SUBSTANTZIAK

In vitro frogetan erabilitako farmakoa antifungikoak flukonazola eta isabukonazola izan ziren, hauek farsenol eta zitrala olio esentzialekin konbinazioak eginez.

5.taula. Erabilitako farmako eta sustantzia ezberdinak.

Osagaia	Jatorria	Garbitas una	Disolbatz ailea	Kontserbazioa	Ikerketa kontzentrazioa
Flukonazola	Sigma-Aldrich	% 98	DMSO	Giro-tenperatura	64tik 1era
Isabukonazola	Sigma-Aldrich	% 98	DMSO	Giro-tenperatura	4tik 0.0625ra
Zitrala	Sigma-Aldrich	% 95	DMSO	Giro-tenperatura	128tik 0.25ra
Farnesola	Sigma-Aldrich	% 95	DMSO	Giro-tenperatura	128tik 0.25ra

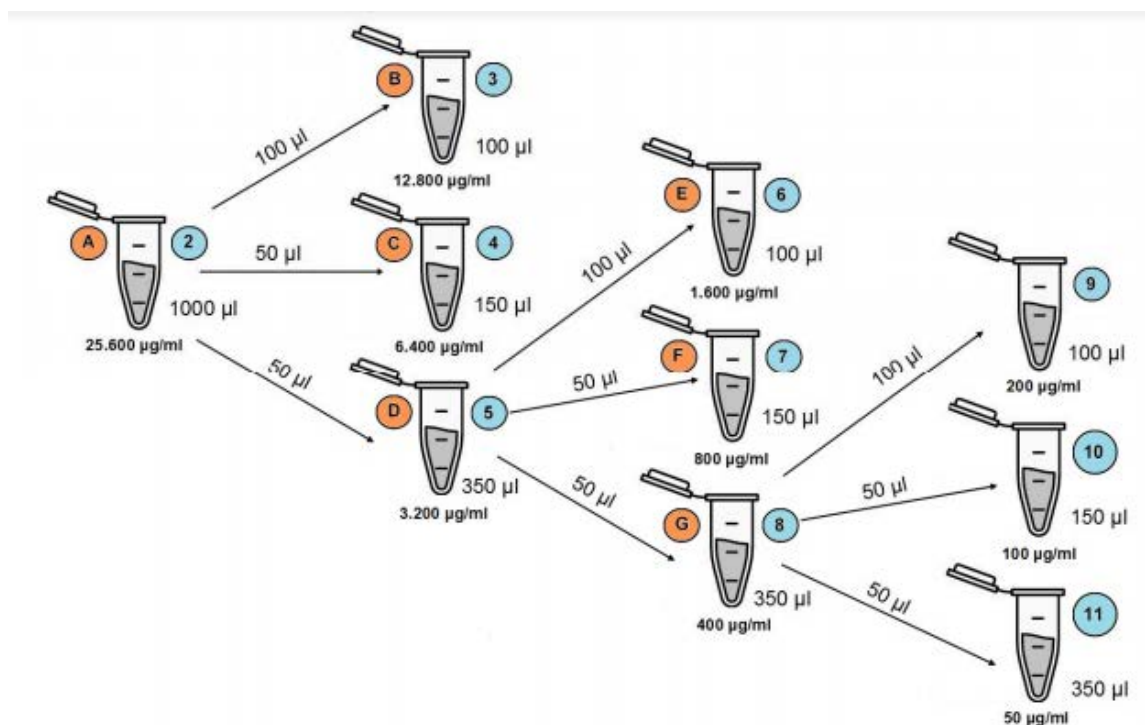
3.4. *In vitro* SENTIKORTASUNAREN AZTERKETA XAKE-TAULA METODOAREN BIDEZ.

Ikerketan erabilitako farmako antifungiko (flukonazola eta isabukonazola) eta olio esentzialen (zitrala eta farnesola) *Candida auris* anduien kontrako gutxieneko kontzentrazio inhibitzailea (MIC) kalkulatu zen, bai bakarka zein konbinatuta, xake

taula metodoa erabiliz. Horretarako, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUSCAT) delakoak E.Def 7.3.1. dokumentuan gomendatutako metodoa hartu zen erreferentziatzat (Arendrup et al., 2017).

Hau burutzeko, L-arginina eta %2 glukosa duen RPMI (Roswell Park Memorial Institute) prestatu zen eta morfolinopropanosulfoniko 0.165 M (MOPS) soluzioarekin homogeneousatu zen hazkuntza media lortzeko (pH-a 7.0 ± 0.1 egokituz). Honen ostean, hazkuntza media esterilizatu egin zen, filtrazioaz, eta 4°Ctan gorde zen erabili arte.

Farmako antifungiko eta olio esentzialen soluzioak prestatzeko, bakoitzetik, soluzio stock bat prestatu zen, DMSO (dimetil sulfoxidoa) soluzioarekin, entseguan erabiliko zen konposatuen kontzentrazioarekin konparatuta 400 aldiz handiagoa zena. Soluzio stock horretatik diluzio seriatuak egin ziren, irudian ikusten den eskema jarraituz, kontzentrazio gradiente ezberdinak lortzeko (**3.irudia**).

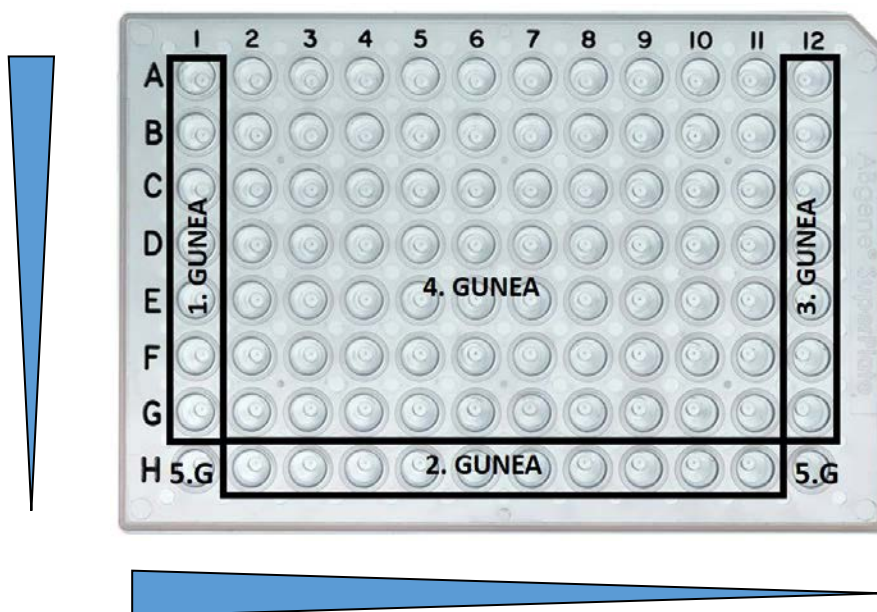


3. Irudia. Diluzio seriatuak egiteko eskema. Zenbakiak xake taulako plakaren zutabeei egiten die erreferentzia, eta hizkiak, berriz, plakako ilareei. Guztira mikroplakak 96 putzu dituelarik.

Ondoren, hodi bakoitzeko kontzentrazioa RPMIan diluitu egin zen 1:100 proportzioan. Geroago, kontzentrazio ezberdineko diluzioak 96 putzu dituen mikroplaka bateko ilara

eta zutabeetan gehitu ziren; izan ere, era horretan kontzentrazioen gradiente bikoitza lortzen zen (**4.irudia**). Flukonazolaren kasuan, 50 µl gehitu ziren G ilaratik (kontzentrazio txikiena) A ilarara (kontzentrazio handiena). Honen ostean, ikertutako beste sustantziaren 50 µl gehitu ziren 11. zutabetik (kontzentrazio txikiena) bigarren zutabera (kontzentrazio handiena) (5.irudiko 4.gunea).

A12-G12 putzuetan (5.irudiko 3.gunea) *Candida auris* anduiaren hazkuntza kontrolerako erabili ziren, eta bertan 100 µl gehitu zen, kontzentrazio bikoitzeko RPMI-a %2-ko glukosa osagarria eta %2ko DMSO gehituz (EUCAST-ek emandako argibideak jarraituz). Lehenengo zutabeko A-G ilaratan (5.irudiko 1.gunea) eta H ilarako 2-11 zutabetan (5.irudiko 2.gunea) 50 µl RPMI jarri ziren. Izan ere, H1 eta H12 putzuak (5.irudiko 5.gunea), esterilitate kontrolerako hazkuntza medio moduan erabili ziren.



4.irudia. Farmako eta produktu kontzentrazio ezberdineko banaketaren eskema. Lehenengo gunean farmako bakarra aurkitzen zen (lan honetan flukonazola edo isabukonazola. Bigarren gunean olio esentzial bat bakarrik (zitrala edo farnesola) gehitu zen, antifungikoarekin konbinatu nahi zena. Hirugarren gunean, hazkuntza medioaren kontrola zegoen; eta laugarren gunean (konbinaketa gunea) erabilitako farmako eta olioien nahasketa, kontzentrazio gradiente (urdinez) errespetatuz (G11-k kontzentrazio baxuena dauka eta A2-a, ordea, kontzentrazio altuena). Azkenengoz, bostgarren gunean, lehen aipatutako esterilitate kontrola aurkitzen zen.

Azkenik, plaka hau 37° Ctan inkubatu egin zen eta emaitzak 24 eta 48 ordotara irakurri ziren, espektrofotometro baten laguntzaz. Xake taula edo mikroplaka hauetatik lortutako emaitzak aztertzeko Loewe-ren gehigarritasunaren teoria erabili zen, formula berezi bat erabiliz (elkarreraginik gabeko eredu ez-parametrikoa).

3.4.1. Loewe-ren gehigarritasunaren teoria

Farmako eta sustantzia ezberdinen kontzentrazioen efektua aztertu ziren, bakarrik eta konbinazioan. Ez parametrikoa den teoria hau FICian oinarritzen da (Zatikaturako kontzentrazio inhibitzailearen indizea - Índice de concentración inhibitoria fraccionada), izan ere, eredu hau farmako eta sustantzia ezberdinek emandako MICa konbinaketan eta MICa bakarka erlazionatzen ditu.

Konbinazio hauek eginez eta ikertuz, patogenoak duen erresistentzia maila gainditzen den edo ez ikusten da, bi sustantzien arteko ekintza lau taldeetan sailkatuz: ekintza sinergikoa (0 eta 0.5 tartean, erresistentzia guztiz gainditzen dute), ekintza gehigarria (0.5 eta 1 tartean, erresistentzia nolabait gainditzen dute, baina ez guztiz), ekintza ez esanguratsua (1 eta 4 tartean, emaitzek ez dute ezer esaten) eta ekintza antagonikoa (>4 sustantzia biak elkartzean, duten ekintza farmakologiko indibiduala blokeatu egiten da, eraginik sortu gabe) (Orellana JJ et al, 2013).

$$FICI = \frac{\text{A-ren CMI konbinaketan}}{\text{A-ren CMI bakarrik}} + \frac{\text{B-ren CMI konbinaketan}}{\text{B-ren CMI bakarrik}}$$

4. EMAITZAK

4.1. FLUKONAZOLA ETA ZITRALAREN KONBINAKETAREN ERAGINA

Flukonazolaren eta zitralaren arteko konbinazioaren eragina *Candida auris* isolamenduen hazkuntzan 24 ordu inkubatu ondoren aztertu zen hurrengo taulan adierazita dauden MIC baloreak azalduz (**6. taula**).

Ikertutako *Candida auris* andui guztiek flukonazolekiko erresistentzia aurkeztu zuten monoterapiari, MIC balioak $> 64 \mu\text{g/ml}$ izanik. Zitralaren kasuan, nahiz eta andui baten MICa $64 \mu\text{g/ml}$ izan, gehienek (anduien % 53k) $128 \mu\text{g/ml}$ MICa azaldu zuten eta gainerakoak (% 47k) balore altuagoak (3 andui, $256 \mu\text{g/ml}$; 3 andui, $512 \mu\text{g/ml}$ eta andui bat, $> 1028 \mu\text{g/ml}$).

Bi substantzia hauen konbinazioa egitean, flukonazolaren MICak nabarmen jaitsi ziren, hots, MIC $> 64 \mu\text{g/ml}$ izatetik, $1 \mu\text{g/ml}$ izatera pasatu zen anduien % 88,2an eta $2 \mu\text{g/ml}$ izatera anduien % 11,8an. Zitralaren MICak ere kasu guztietan murriztu egin ziren, $8 \mu\text{g/ml}$, $16 \mu\text{g/ml}$ eta $32 \mu\text{g/ml}$ balioak lortuz anduien % 35,3an, % 47,1ean eta % 17,6an; hurrenez hurren.

Behin MIC datu guztiak lortuta, FICI baloreak kalkulatu zen Loewe-ren gehigarritasun teoriaren arabera emaitzak ondorioztatzeko: bi substantzien konbinazioak efektu sinergiko erakutsi zuen 3 isolamendutan (% 15,8an), efektu gehigarria 8 isolamendutan (% 41,2an), eta efektu ez esanguratsua 8 isolamendutan (% 41,2an).

6. taula. Flukonazola eta zitralaren konbinaketaren eragina.

MIC (µg/ml)						
Anduiak	Bakarrik		Konbinazioak		FICI	Interpretazioa
	FLZ	ZIT	FLZ	ZIT		
17-213	> 64	128	2	16	1.01	EES
17-257	> 64	512	1	16	0.257	SIN
17-259	> 64	256	1	32	1.01	EES
17-261	> 64	> 1028	1	8	0.01	SIN
17-263	> 64	512	1	32	0.51	GEHI
17-265	> 64	128	2	8	0.51	GEHI
17-269	> 64	128	1	16	1.01	EES
17-270	> 64	128	1	16	1.01	EES
17-272	> 64	128	1	16	1.01	EES
17-274	> 64	128	1	16	1.01	EES
17-278	> 64	128	1	16	1.01	EES
17-283	> 64	256	1	16	0.51	GEHI
17-283	> 64	512	1	32	0.51	GEHI
17-285	> 64	64	1	8	0.51	GEHI
17-287	64	256	1	8	0.26	SIN
17-289	> 64	128	1	8	0.51	GEHI
17-291	> 64	128	1	8	0.51	GEHI
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	16	> 1028	2	128	0.625	GEHI
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	> 64	128	1	128	1.01	EES

FLZ: Flukonazola, ZIT: Zitrala, SIN: Sinergia, GEHI: Gehigarria, EES: Ez esanguratsua

4.2. FLUKONAZOLA ETA FARNESOLAREN KONBINAKETAREN ERAGINA

Flukonazolaren eta farnesolaren arteko konbinazioaren eragina *Candida auris* isolamenduen hazkuntzan 24 ordu inkubatu ondoren aztertu zen hurrengo taulan adierazita dauden MIC baloreak azalduz (7. taula).

Ikertutako *Candida auris* andui guztiek flukonazolarekiko erresistentzia aurkeztu zuten monoterapiaren, MIC balioak $> 64 \mu\text{g/ml}$ izanik (hala ere, 4 anduik $32 \mu\text{g/ml}$ -ko MIC balorea azaldu zuten: % 23,5). Farnesolaren kasuan, nahiz eta andui gehienek (% 78,6) $> 128 \mu\text{g/ml}$ -ko MIC balorea azaldu, gainerakoen artean (%21,6) 2 andui $64 \mu\text{g/ml}$ azalu zuten (% 14,3) eta andui batek $32 \mu\text{g/ml}$ -ko balorea.

Bi sustantzia hauen arteko konbinaketa egitean, flukonazolaren MICak egonkor mantendu ziren, hau da, anduien % 42,8 $> 64 \mu\text{g/ml}$ -ko baloreak azaldu zituzten. Gainerako balioak jeitsi egin ziren, anduien % 14,3an $64 \mu\text{g/ml}$ izatea pasatu zen, % 14,3an $32 \mu\text{g/ml}$ izatera, % 21,4ean $16 \mu\text{g/ml}$ izatera eta % 7,1ean $8 \mu\text{g/ml}$ -ra. Farnesolaren kasuan, MIC balioak ez ziren hainbeste jaisti; izan ere, $> 128 \mu\text{g/ml}$, $128 \mu\text{g/ml}$ eta $0,25$ eko balioak lortuz anduien % 35,7an, % 57,1ean eta % 7,1ean, hurrenez hurren.

Behin MIC datu guztiak lortuta, FICI balorea kalkulatu zen Loewe-ren gehigarritasun teoriaren arabera emaitzak ondorioztatzeko. Bi substantzien konbinazioak efektu gehigarria erakutsi zuen 4 isolamendutan (% 23,5ean) eta efektu ez esanguratsua (% 76,5ean).

7.taula. Flukonazola eta farnesolaren konbinaketaren eragina.

MIC (µg/ml)						
Anduiak	Bakarrik		Konbinazioak		FICI	Interpretazioa
	FLZ	FAR	FLZ	FAR		
17-213	32	> 128	32	128	1.5	EES
17-257	> 64	32	64	0.25	0.51	GEHI
17-259	> 64	> 128	> 64	128	1.5	EES
17-261	> 64	> 128	> 64	128	1.5	EES
17-263	32	64	16	128	2.5	EES
17-265	32	64	16	128	2.5	EES
17-267	> 64	> 128	64	128	1	GEHI
17-269	> 64	> 128	8	128	0.5625	GEHI
17-283	> 64	> 128	> 64	> 128	2	EES
17-285	> 64	> 128	> 64	> 128	2	EES
17-287	> 64	> 128	> 64	> 128	2	EES
17-289	> 64	> 128	> 64	> 128	2	EES
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	32	> 128	16	128	1	GEHI
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	> 64	> 128	32	> 128	1.256	EES

FLZ: Flukonazola, FAR: farnesola, SIN: Sinergia, GEHI: Gehigarria, EES: Ez esanguratsua

4.3. ISABUKONAZOLA ETA ZITRALAREN KONBINAKETAREN ERAGINA

Isabukonazolaren eta zitralaren arteko konbinazioaren eragina *Candida auris* isolamenduen hazkuntzan 24 ordu inkubatu ondoren aztertu zen hurrengo taulan adierazita dauden MIC baloreak azalduz (**8. taula**).

Ikertutako *Candida auris* andui guztien MIC baloreak nahiko aldakorak izan ziren isabukonazolaren kasuan (0,0625 µg/mltik - >4 µg/mlra); izan ere, gehienek, anduien 7 isolamenduk (% 41,2) 0,25 µg/ml azaldu zuten. Gainerakoen artean, 3 andui (%17,6) > 4 µg/ml, andui bat (%5,9) 2 µg/ml, 3 andui (% 17,6) 0,5, 2 andui (% 11,8) 0,125 µg/ml eta andui bat (% 5,9) 0,0625 µg/ml. Zitralaren kasuan, 3 andui (% 17,6) 256 µg/ml azaldu zuten, 5 andui (% 29,4) 128 µg/ml, 4 andui (% 23,5) 64 µg/ml, 3 andui (% 17,6) 32 µg/ml eta andui bakarra (% 5,9) 4 eta 8 µg/ml-ko MICa aurkeztu zuten.

Bi substantzia hauen konbinazioa egitean, isabukonazolaren MIC-ak apur bat jaitsi ziren; izan ere, andui batek (% 5,9) 1, 0.125 eta 0.031 µg/ml-ko baloreak azaldu zituzten 2 andui (% 11,8) 0.5, 0.25 eta 0.0156 µg/ml eta 3 andui (%17,6) 0.0625. Zitralaren MICak ere kasu guztietan murriztu ziren, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml eta 1 µg/ml baloreak lortuz anduien % 17,6an, % 23,5ean, % 23,5ean, % 29,4an eta % 5,9an, hurrenez hurren,

Behin MIC datu guztiak lortuta, FICI balorea kalkulatu zen Loewe-ren gehigarritasun teoriaren arabera emaitzak ondorioztatzeko. Bi substantzien konbinazioak efektu sinergikoa erakutsi zuen 3 isolamendutan (% 17,6an), efektu gehigarria 9 isolamendutan (% 53an) eta efektu ez esanguratsua (% 29,4an).

8. taula. Isabukonazola eta zitralaren konbinaketaren eragina.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
Anduiak	Bakarrik		Konbinazioak			FICI	Interpretazioa
	ISB	ZIT	ISB	ZIT			
17-213	0.5	64	0.0625	4		0.625	GEHI
17-257	0.25	4	0.0625	1		1.25	EES
17-259	0.25	128	0.031	8		0.625	GEHI
17-261	0.125	256	0.008	8		0.314	SIN
17-263	0.5	32	0.008	4		1.01	EES
17-265	> 4	32	0.25	2		0.53	GEHI
17-269	0.125	128	0.0156	16		1.12	EES
17-270	0.25	128	0.008	8		0.53	GEHI
17-272	0.25	64	0.008	2		0.28	SIN
17-274	0.25	128	0.0156	8		0.56	GEHI
17-278	0.0625	256	0.0625	16		1.5	EES
17-283	0.25	32	0.008	2		0.53	GEHI
17-283	> 4	64	0.5	4		0.56	GEHI
17-285	2	128	1	4		0.75	GEHI
17-287	0.5	8	0.25	2		1.5	EES
17-289	0.25	256	0.125	16		1	GEHI
17-291	> 4	64	0.5	2		0.31	SIN

ISB: Isabukonazola, ZIT: zitrala, SIN: Sinergia, GEHI: Gehigarria, EES: Ez esanguratsua

5. EZTABAIDA

Gaur egun antibiotiko eta antifungikoen gehiegizko erabilerak, mikroorganismo ezberdinek erresistentziak garatzea edota handitzea eragiten du. Fenomeno hau osasun eremuan arazo ugari eta oso larriak eragin ditzake infekzioak tratatzeko momentuan; izan ere, iraganean eraginkorrak suertatzen ziren farmako zein sustantziak jada ez dira erabilgarriak (Jeffrey-Smith 2018).

Infekzio fungikoei dagokionez, gorakada nabarmena izan dute azken urteotan, *Candida* generoko mikroorganismosak honen erantzule nagusia izanik. *Candidak* eragindako infekzio sistemikoa da gaixotasun fungiko inbaditzaile ohikoena, eta *Candida albicans* espeziea kasuen % 45a baino gehiagotan isolatua da (Peman eta Salavert, 2013; Puig-Asensio et al., 2014). Hala ere, azken hamarkadetan, *Candida albicans* ez diren eta farmako antifungikoen aurrean erresistenteak diren espezieek eragindako kandidiasi inbaditzaileen gorakada nabaritzen ari da, terapia immunoezabatzaileen gehikuntzaren eta farmako antibiotiko eta antifungikoen erabilera bereizi gabearen ondorioz (Arendrup et al., 2013).

Espezie horien artean, *Candida auris* nabarmentzen da, % 60raino irits daitekeen heriotza-tasa duena, eta sentikortasun murriztua duena eskuragarri dauden farmako antifungikoekiko. (Bidaud et al., 2018) (Quindós et al., 2018). Hau dela eta, benetako erronka klinikoa da espezie honek eragindako kandidiasi inbaditzaileak tratatzea, eta estrategia terapeutiko berriak bilatzea eskatzen du. Azkenaldian, ikerketa ugari burutu izan dira *Candida* espeziearen inguruan agertutako erresistentziak gainditu ahal izateko asmotan, bai tratamendu berriekin entseguak eginez, denbora eta kostu-ekonomiko handia suposatzen dutenak, bai merkatuan dauden farmakoen arteko konbinazioak ikertuz.

Konbinazioei dagokionez, lan honetan ikertu nahi zena zen azol eratorriak (flukonazola eta isabukonazola) izan ziren, kandidiasiaren tratamendurako aukerako farmako antimikotiko merkeak (batez ere flukonazola), olio esentzialekin konbinatuta (zitrala eta farnesola), interakzio sinergikoak aurkitzeko; patogenoari aurre egiteko eta erabilitako dosiak murrizteko, horrela, erresistentzia horien sorrera atzeratzeko nahian (Lockhart eta beste batzuk, 2016).

Burututako ikerketan lan honetan, hasieran flukonazola zitral olio esentzialarekin konbinatu zen. Zitrala bi isomero geometrikoen elkarketa bat da, hau da, geranil (trans-zitral, zitral A) eta neral (cis-zitral, zitral B) batuta lortzen den konposatua. Zitrala bezalako olio esentzialak oso erabilak izan dira hainbat infekzioen tratamendurako, batez ere, azaleko infekzioetan (*Candida albicans* eta beste onddo patogenoen azaleko infekzioetan) (Ahmad Khan M.S., Malik A., Ahmad I., 2012).

Konposatu honek, flukonazolarekin konbinatuz, antimikotikoaren MICa $> 64 \mu\text{g/ml}$ tik $1 \mu\text{g/ml}$ ra murriztu zuen, *Candida aurisen* 17 isolamenduetako 8 anduetan efektu gehigarria lortuz eta beste 3 isolamenduetan efektu sinergikoa erakutsiz. Hau, Khanek eta taldekoek lortutako emaitzekin bat dator, efektu sinergikoa ikusi zutenak, zitrala flukonazolarekin konbinatzean, aztertu zituzten *Candida albicansen* lau isolatuekin.

Flukonazolaren eta zitralaren arteko konbinazio sinergikoa zitralak farmako antimikotikoaren eragina bultzatzea dezakeelako izan daiteke, batez ere, zelula-paretan, mintz plasmatikoa eta beste mintz fungiko batzuetan. Flukonazola, azol hidrofilo bat denez, ez da zelula-mintzean elkartzen, eta zelula barneko eragina ematen du, ergosterolaren biosintesia inhibituz. Zelula-pareta kaltetzen duten konposatuek zelulan sartzea erraztu dezakete, eta horrek ergosterolaren biosintesia inhibitzea eragin dezake, zelula-mintza aldatzea edo suntsitzea (Khan et al., 2012). Zore et al-ek burututako ikerketan zitralaren berezko ekintza antimikotikoa ikusi zuten, flukonazolarekiko sentikortasun maila desberdinak azaltzen zuten *Candida albicans* 48 isolamenduetatik 24an inhibizioa lortzen; gainera, flukonazolarekin konbinatzerakoan efektu sinergikoa ikusi zuten aztertutako isolamendu batean. Eragin sinergikoaren jatorria mintzaren jariatortasunean eta flukonazola zelula barruan barneratzea areagotzean dagoela uste da; izan ere, mintzeko seinale proteinetara atxikitu eta patogenoaren ziklo zelularra geldoitu dezake (Zore et al., 2011).

Lan horietan eragin sinergikoa duten isolamenduen ehunekoa handiagoa da, orokorrean, ikerketa honetan baino. Horren arrazoa izan daiteke, alde batetik, aztertutako isolamendu-kopurua, lan horietan txikiagoa izan zena, eta bestetik, aztertutako espeziea, lan horietan *Candida albicans* zena (Zore et al., 2011; Khan et al., 2012).

Gure ikerketa-taldeak burututako aurreko esperimentuetan, flukonazola olio esentzialekin edota antifungikoak ez dire beste substantzia batzuekin konbinatzearen

eragina aztertu zen. Hauetan, eragin handiagoa antzeman zen konbinazioak burutzean *Candida* generoko beste espezie batzuetan *Candida auris* espeziearekin konparauta (argitaratu gabeko datuak). Hori dela eta, ikerketa lan honetan lortutako datuak oso itxaropentsuak dira eta *Candida auris* isolamenduen aurka efektu sinergikoa eragin dezaketen konposatuak biatzera bultzatzen du.

Lan honen bigarren fasean flukonazola farnseola bezalako beste terpenoide batekin konbinatu zen, ekintza antifungikoa areagotzeko nahian. Izan ere, farnesolaren potentzial antimikrobianoa ikertu da, eta kandidiasiaren tratamendurako proposatu da, jarduera konplexuengatik, hala nola, legamia hifara aldatzeko blokeoa, biofilmen eraketa blokeatzea, espezieen arteko komunikazioa kaltetzea eta apoptosi zelularra eragitea (P450 entzima inhibitzeagatik (Wang FJ, 2019; Cortes Hidalgo P., Roa Dueñas O. et al., 2017)). Lan honetan konbinazio honek efektu gehigarria azaldu zuen 17 isolamenduetatik lautan (% 23,5). Kasu honetan, flukonazolaren MICak ez ziren zitralaren kasuan bezainbeste murriztu. Beste ikerlan batzuetan flukonazola eta farnesola konbinatzerakoan efektu sinergikoa ikusi zuten (Codeiro et al., 2016). Diferentzia hau, berriz ere, aztertutako espezieen ondorioz izan daiteke, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* eta *Candida tropicalis* espezieak ikertu baitzituzten aurrean aipatutako ikerketa lanean.

Azkenik, *Candida auris* espeziearen kontrako alternatiba terapeutiko bat bilateko erronkarekin jarraituz zitrala eta isabukonazolaren arteko konbinazioa ikertu egin zen. Isabukonazola espektro zabaleko triazol berri bat da, legamien, *Aspergillus*, mukoralen eta onddo dimorfikoen aurkako aktibitatea *in vitro* eta eredu aurreklinikoetan frogatu delarik (Ledoux MP et al., 2018). Gure ikerketan lortutako emaitzak, flukonazola eta zitralaren konbinazioarekin lortutakoak baino apur bat hobeak izan ziren, efektu sinergikoa isolamenduen % 17,6an detektatuz, eta efektu gehigarria isolamenduen %53an. Kasu guztietan isabukonazolaren MICak murriztu ziren konbinazioan. Ez daude isabukonazolekin konbinazioak ikertzen dituzten lan askorik. Izan ere, ikerketa batean aztertu zen *Candidaren* kontra, non beste farmako antifungikoekin konbinatzen zen. Ikerketa honetan isabukonazola eta mikafungina konbinazioak *Candidaren* espezieen aurka sinergikoak direla frogatu zuten, isabukonazola eta anfoterizina B konbinazioak ez esanguratsuak diren bitartean (Katragkou A et al., 2017).

Beraz, ikerketa honetan zitralarekin lortutako datuak oso itxaronpentsuak dira, eta interesgarria litzateke *Caenorhabditis elegans* edo *Galleria mellonella* bezalako mikroorganismoetan *in vivo* ikerketak egitea, *in vitro* lortutako datuak eta eraginak aztertzeko, bai flukonazola zein isabukonazola zitralarekin konbinatzean.

6. ONDORIOAK

- Flukonazol eta zitralaren arteko konbinazioak eragin sinergikoa eman zuen flukonazolari erresistentea den *Candida auris* 3 isolamenduetan, eta eragin gehigarria, 8 isolamenduetan. Gainera, flukonazolaren MIC baloreak 1-2 µg/mlra jaisteak lortu zen.
- Flukonazol eta farnesolaren arteko konbinazioa frogatutako konbinazioen artean eraginkortasun txikiena azaldu zuena izan zen. Izan ere, eragin gehigarria eman zuen flukonazolari erresistentea den *Candida auris* 4 isolamenduetan, eta eragin ez esanguratsua, aldiz, 10 isolamenduetan.
- Isabukonazol eta zitralaren arteko konbinazioak eragin sinergikoa eman zuen flukonazolari erresistentea den *Candida auris* 3 isolamenduetan, eta eragin gehigarria 9 isolamenduetan, konbinaziorik eraginkorra zela erakutsiz.
- Nahiz eta *in vivo* ikerketak egin behar diren eraginkortasuna baieztatzeko, flukonazola edo isabukonazola zitralarekin konbinatuz lortutako emaitzak oso itxaronpentsuak dira *Candida auris* andui multierresistenteek sortutako infekzio inbaditzaileak tratatu ahal izateko.

7. BIBLIOGRAFIA

Adams E, Quinn M, Tsay S, Poirot E, Chaturvedis et al. 2018. *Candida auris* in healthcare facilities. New York, USA, 2013-2017. New York State Department of Health.

Ahmad Khan MS & Ahmad I. 2012. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012; 67: 618-621.

Ahmad Khan MS, Malik A & Ahmad I. 2012. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2012; 50: 33-42.

Arendrup MC & Patterson TF. 2017. Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms and treatment. *The Journal of Infectious Diseases*. 216(53): 5445-5451.

Barbedo LS, Figueiredo-Carvalho MH, Muniz MM & Zancope-Oliveira RM. 2017. Comparison of four molecular approaches to identify *Candida parapsilosis* complex species. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 112 (3): 214-219.

Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts JC & Lewis AO. 2001. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidiasis and other oral conditions. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 4066-4075.

Bonifaz J. 2012. *Micología Médica Básica*. McGraw-Hill.

Brown CC, Baker DC, Barker IK. 2007. Mycotic diseases of the gastrointestinal tract. In: M.G. Maxie, Editor, *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Philadelphia: Elsevier. 229-232.

Cázares-Nuñez C, Araiza J, Arellano I & Bonifaz A. 2017. Alerta epidemiológica: infección por *Candida auris*. *Dermatol Rev Mex*. 2017; 61(6): 533-536.

Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E et al. 2011. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* isolated from the patients with candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55 (12): 5590-5596.

Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL & Chang TC. 2001. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 3466-3471.

Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S et al. 2018. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018; 73: 891-899.

Cortes-Hidalgo AP, Roa Dueñas OH, Mendez Fandiño YR, Alvarez-Moreno CA. 2019. Opciones terapéuticas frente a especies de *Candida* resistentes a equinocandinas. *Univ Med*. 2019; 59(2): 1-15.

Fakhim H, Chowdhary A, Prakash A, Vaezi A et al. 2017. *In vitro* interactions of echinocandins with triazoles against multidrug-resistant *Candida auris*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61 (11), e01056-17.

Gómez-Quintero. 2010. Resistencia a levaduras del género *Candida* al fluconazol. Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá. 2010: 40-62.

González AM, Bejar Luque V, Gutierrez Fernández JC, Llagostera Casas M & Quesada Arroquia E. 2019. *Microbiología Esencial*. Editorial Panamericana.

Jeffrey-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffrey K, Johnson EM, Borman A, *Candida auris* Incident Management Team, Manuel R, Brown CS. 2018. *Candida auris*: a review of the literature. *American Society of Microbiology. Clin Microbiol Rev* 31: e00029-17.

Katragkou A, McCarthy M et al. 2017. *In vitro* combination therapy with isavuconazole against *Candida* spp. *The International Society for Human and Animal Mycology*.

Laforet A. 2010. Estudio de PGA 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Universitat de Valencia.

Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK et al. 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.

Ledoux MP et al. 2018. Isavuconazole: A new broad-spectrum azole. Part 2: pharmacokinetics and clinical activity. *Med Mycol.* 55(8): 859-868.

Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH et al. 2011. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *Journal of Clinical Microbiology.* 49(9): 3139-3142.

Lobaina Rodriguez T, Zhurbenko R, Rodriguez Martinez C, Zayas Ruis Y & Rodriguez Rodriguez A. 2010. Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado. *Rev Cubana Med Trop.* 2010; 62(1): 48-57.

Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Faroqui J, Chowdhary A, Govender NP. 2017. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases.* 64(2): 134-140.

Lone SA & Ahmad A. 2019. *Candida auris* – the growing menace to global health. *Mycoses.* 1-18.

Marcilla A, Monteagudo C, Mormeneo S & Sentandreu R. 1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in diagnosis of candidiasis. *Microbiology.* 145: 695-701.

McCarthy MW & Walsh TJ. 2017. Drugs currently under investigation for the treatment of invasive candidiasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 260 (7): 825-831.

Oliveira HC, Monteiro MC, Rossi SA, Permán J, Ruiz-Gaitán A et al. 2019. Identification of off-patient compounds that present antifungal activity against the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology.* 9(83): 1-10.

Orellana JJ, Kaufman JS, Pino P. 2013. Interacción, sinergia y antagonismo en estudios prospectivos en epidemiología. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 30(4):687-690.

Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA et al. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2.000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 3149-3154.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA et al. 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy and influences on mortality on hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical Infectious Diseases*. 37 (5): 634-643.

Quindós G, Arias MC, 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.

Rosenthal K, Murray P, Pfaller M. 2016. Opportunistic mycoses. *Medical Microbiology*. Philadelphia: Elsevier. 646-652.

Sanjay G. 2017. Fármacos antimicóticos. Manual MSD. Wayne State University School of Medicine.

Sarna S & Upadhyay S. 2017. Current perspective on emergence, diagnosis and drug resistance in *Candida auris*. *Infection and Drug Resistance*. 10: 155-165.

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

Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A et al. 2016. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European Hospital. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 5(35): 1-7.

Spampinato C & Leonardi D. 2013. *Candida* infections, causes, targets and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International*.

Spampinato C & Leonardi D. 2013. Molecular fingerprints to identify *Candida* species. BioMed Research International.

Usach I, Margarucci E, Manca ML, Caddeo C, Afforu M, Petretto GL, Manconi M & Peris JE. 2020. Comparison between Citral and Pompia essential oil loaded in phospholipid vesicles for the treatment of skin and mucosal infections. Nanomaterials. 2020; 10: 286.

Villacampa Castro T et al. 2019. Manual curso intensivo MIR Asturias. España. Academia de estudios MIR.

Wall G, Chaturvedi AK, Wormley F, Wiederhold NP, Patterson TF et al. 2018. Screening a repurposing library for inhibitors of multidrug-resistant *Candida auris* identifies ebsele as a repositionable candidate for antifungal drug development. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 62(10): e01084-18.

Wang FJ & Liu ZH. 2019. Systematic analysis of protein expression in *Candida albicans* exposed to farnesol. Chin Med Journal. 132 (19): 2348-2353.

Zaragoza R & Pemán J. 2012. Opciones terapéuticas para el tratamiento antifúngico en el paciente crónico. Revista Iberoamericana de Micología. 2012; 29(2): 108-113.

Zore GB, Thakre AD et al. 2011. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest on cell cycle. Elsevier GmbH. 10 (1): 1162.

