

Gradu Amaierako Lana
Biologia Gradua

**Giza listuek ezagututako
Lomentospora/Scedosporium generoko
onddo patogenoen antigenoen
karakterizazioa**

Egilea:
Lirain Rodriguez Oiartzun
Zuzendariak:
Andoni Ramirez-Garcia
Fernando Hernando Echevarría

AURKIBIDEA

Laburpena/Abstract	2
1. Sarrera	4
1.1. Taxonomia eta taldearen ezaugarriak	4
1.2. Ezaugarri morfologikoak	5
1.3. Banaketa geografikoa	7
1.4. <i>Lomentospora prolificans</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i> eta <i>Scedosporium aurantiacum</i> onddoek eragindako gaixotasunak	8
1.5. Arnasbideetako erantzun immunea <i>Lomentospora prolificans</i> espeziearen aurka	9
1.6. Teknika proteomiko eta immunomikoen bidezko antigenoen ezagumendua	10
2. Helburuak	11
3. Materiala eta metodoak	12
3.1. Ereintzak eta konidioen bilketa	12
3.2. Proteinen erauzketa	12
3.3. Bi dimentsioko elektroforesia (2-DE)	13
3.4. Giza listuaren Immunoglobulina A-k ezagututako antigenoen detekzioa	13
3.5. ELISA	14
4. Emaitzak	15
4.1. Giza listuko Immunoglobulina A-k ezagututako antigenoen detekzioa	15
4.1.1. <i>Lomentospora prolificans</i> -en antigenoen detekzioa	15
4.1.2. <i>Scedosporium apiospermum</i> -en antigenoen detekzioa	16
4.1.3. <i>Scedosporium aurantiacum</i> -en antigenoen detekzioa	17
4.2. Proteina immunogenikoen ereduaren analisi konparatiboa	17
4.2.1. Proteomen arteko konparaketa	17
4.2.2. Immunomen arteko konparaketa	18
4.2.3. Antigenoekin elkartutako Immunoglobulina A kontzentrazioaren kuantifikazioa	19
5. Eztatbaida	20
6. Bibliografia	23

LABURPENA

Azken urteetan onddo patogenoek eragindako gaixotasun infekziosoen kasuak ugartu egin dira, askotan larriak direnak eta heriotza eragitera irits daitezkeenak. Hauen artean *Lomentospora prolificans* onddo haritsu, emergente eta oportunistak dago. Espezie honek erlazio handia du *Scedosporium* generokoekin, non espezie erakusgarrienak *Scedosporium apiospermum* eta *Scedosporium aurantiacum* diren. Hiru onddo patogeno hauek gizakiarekin erlazionatutako ekosistemetan hedatuta daude eta beraz, gizakia eguneroko kontaktuan dago eurekin. Gorputzera barneratzeko sarrera-bide nagusia arnasbideak direnez, bertako defentsa mekanismoak ezinbestekoak izan daitezke. Arnas traktuko mukosetan immunitate-mekanismo ugari daude, garrantzitsuenetarikoa listura jariatzen den A immunoglobulina (IgA) delarik. Hortaz, lan honetan giza listuaren aurrean *Lomentospora/Scedosporium* generoko onddo nagusiek dituzten antigenoak karakterizatu dira.

L. prolificans, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum*-en proteoma aztertu zen, bi dimentsioko elektroforesi bidez gelak lortu eta mintzetara elektrotransferituz. Ondoren, pertsona immunokonpetenteen listuko IgA-k ezagututako antigenoak detektatu ziren Western Blot-ak eginez eta kimioluminiszentzia irudiak lortutakoan, ImageMaster softwarea erabiliz, proteina immunogenikoak aztertu ziren. *L. prolificans*-en mintzan 102 *spot* identifikatu ziren, eta haietatik intentsitate erlatibo altuena eman zuten hamarrak hautatu ziren. Hauen artean, 40S proteina s6 erribosomala, enolasa eta ziklofilina zeuden. *S. apiospermum*-en mintzetan 119 *spot* detektatu ziren eta *S. aurantiacum*-en kasuan, berriz, 74. Euren artean analisi konparatibo bat egitean ikusi zen, *Scedosporium* generoko onddoen proteomak antzekoagoak zirela elkarren artean eta *L. prolificans*-enarekiko desberdinagoak. Hala ere, aurretik identifikatutako bi proteina bi espezie horietan ere errepikatu ziren: enolasa eta ziklofilinak. Beraz, proteina hauek hiru onddo espezieen antigeno moduan jokatzen dute.

ABSTRACT

In the last years, infectious diseases caused by pathogenic fungi have increased significantly, which often are serious and can even cause death. Among them, is the filamentous, emerging and opportunistic fungus *Lomentospora prolificans*. This species is closely related with the genus *Scedosporium*, in which the most significant are *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium aurantiacum*. These three pathogenic fungi are distributed in humanized ecosystems, so the human being is in constant contact with them. The main portal of entry to enter inside the human body is the airways, therefore, the defence mechanisms of the mucosa can be crucial. One of the most important respiratory tract immunity mechanisms is immunoglobulin A (IgA) which is secreted to saliva. Accordingly, in this study they have been characterised antigens of main fungi of the genus *Lomentospora/Scedosporium* recognized by human saliva.

The proteome of *L. prolificans*, *S. apiospermum* and *S. aurantiacum* were analysed by two-dimensional electrophoresis. Gels obtained were electroblotted to membranes and antigens recognized by salivary IgA from immunocompetent people were detected by Western Blot. Finally, immunogenic proteins from the chemiluminescence images were analysed by the ImageMaster software. In the membrane of *L. prolificans* 102 spots have been identified, of which ten were selected because of their higher relative intensity. Among them, there are the proteins 40S ribosomal s6, enolase and cyclophilins. In the membrane of *S. apiospermum* 119 spots were detected and in the case of *S. aurantiacum*, 74. Doing a comparative analysis between them, it was found that the proteomes of the fungi from *Scedosporium* are more similar to each other and both have more differences with *L. prolificans*. Nevertheless, in these two species from the genus *Scedosporium* they were repeated two proteins identified above: enolase and cyclophilins. Therefore, these proteins have the role of antigen in the three species.

1. SARRERA

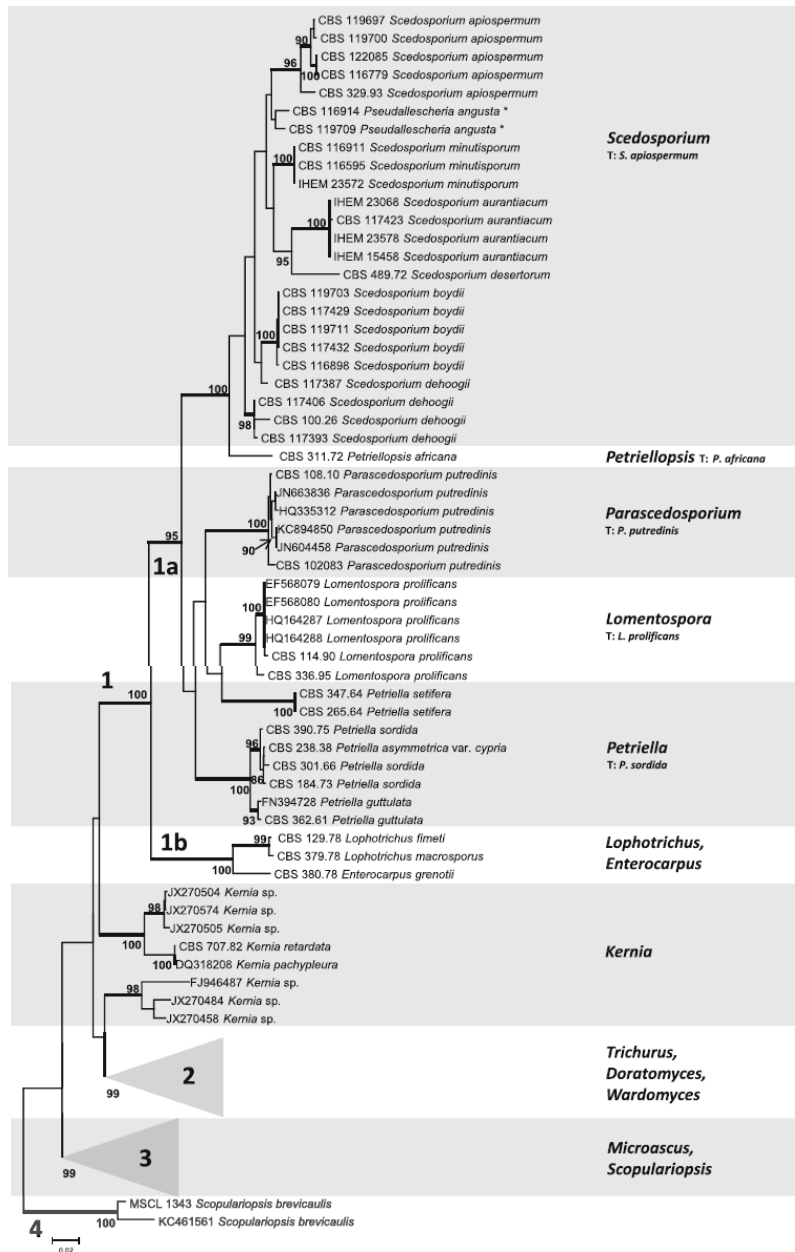
Onddo patogenoek eragindako gaixotasun infekziosoen kopurua asko handitu da azken urteetan. Honen arrazoi nagusia arriskuan dagoen populazioa hazi egin dela da, bizi-itxaropenaren emendioaren zein gaixo kritiko edo immunoeskasi larria dutenen tratamenduen hobekuntzaren ondorioz. Honek guztiak infekzio fungikoen inguruko interesa handitzea eragin du eta baita euren inguruko ikerketa gehiago aurrera eramatea ere (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013).

Azken aldian asko aztertu den espezie patogenoetako bat *Lomentospora prolificans* onddo haritsua da. Onddo oportunistak hau Iberiar penintsula, Australia eta Estatu Batuetan isolatzen da gehienbat, non emergentzat hartzen den (Cortez *et al.*, 2008). Gaixotasun desberdinak eragin ditzake, maiz tratamendu zailekoak. Pertsona immunokonpetenteetan larruazaleko zein larruazalpeko infekzioak sortzen ditu eta immunoeskasi larriak pairatzen dituzten gaixoetan infekzio barreiatuak eragitera irits daiteke (Cortez *et al.*, 2008).

1.1. Taxonomia eta taldearen ezaugarriak

L. prolificans Ascomycota phylumean, Euascomycetes klasean, Microascales ordenean eta Microascaceae familian sailkaturiko onddoa da. Familia honen barnean *Lomentospora* generoko espezieez gain, lan honetan aztertutako *Scedosporium* generoa ere sailkatzen da, *Lophotrichus*, *Parascedosporium*, *Petriella* eta *Petriellopsis* generoekin batera.

2011. urtera arte, onddo espezie berak izen desberdina jaso zezakeen fase sexuala edo asexuala deskribatzeko garaian. Baina arau hau aldatu egin da: onddo espezie bakoitzak izen zientifiko bakarra, “one fungus one name”, edukitzea adostu zen, 2011n Amsterdamen egindako sinposio batean. Bertan, *International Commission on the Taxonomy of Fungi* (ICTF) komisioak “Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature” argitaratu zuen (Hawksworth, 2011). Gehienetan, generoaren izena zaharrena izango da. Honetaz gain, *Lomentospora prolificans* espeziearen izendapenak ere aldaketak jasan ditu. Orain gutxi arte *Scedosporium* generoaren barnean sailkatzen zen, baina *Internal transcribed spacers*-en (ITS) DNA erribosomikoaren sekuentzien analisiaren bidez, ikusi da filogenetikoki desberdina dela genero honetan sailkatzen diren gainerako espezieekiko (Lackner *et al.*, 2014) (1. Irudia).

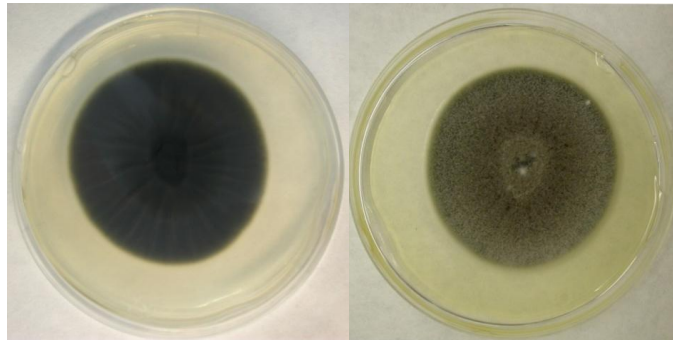


1. Irudia. Microascaceae familiaren sailkapen filogenetikoa. Internal transcribed spacers-en DNA erribosomikoaren sekuentzien analisiaren bidez egin da (Lackner *et al.*, 2014).

1.2. Ezaugarri morfologikoak

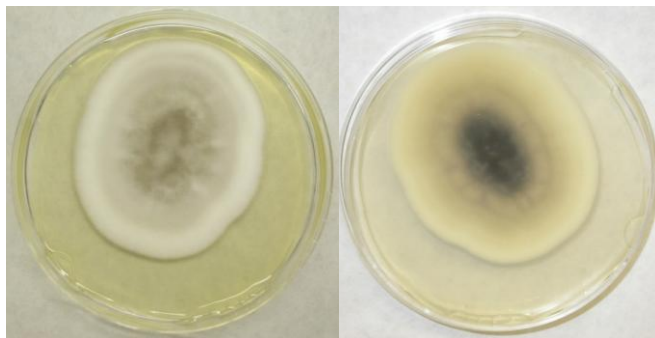
Gaur egun, Microascaceae familian sailkatzen diren ondoen artean patogenizitateari dagokionez garrantzitsuenak orain arte deskribatutako *L. prolificans* eta *Scedosporium apiospermum* dira, *Scedosporium aurantiacum*-ek ere arazoak sortzen dituelarik. Espezie hauek morfologikoki nahiko antzekoak dira, baina badituzte zenbait ezaugarri bereizle haien artean desberdinak direnak.

L. prolificans onddo haritsua da, hifa txiki, hialino eta sentikorrek ekoizten dituen, anelide puztuekin oinarrian. Konidioak pareta leunekoak dira, globo itxurakoak eta kolore argikoak zein marroi ilunak izan daitezke. 3-7 x 2-3 μm -ko tamaina izaten dute eta anelideen alde apikalean pilatzen dira tanta itxurako egiturak sortuz. Espezie honek kolonia zuriak ekoizten ditu, heldzean berde marroixkak bihurtzen direnak. Itxura zapala dute eta gutxi zabaltzen dira, armiarma-sare itxurako mizelio aereoak eratuz (2. Irudia). Sabouraud kultibo medioan 25°C-tan inkubatuz gero, nahiko azkar hazten dira, 5 egunetan heldu eta astebetean 3 cm baino gehiago neurtzea lortzen dutelarik.



2. Irudia. *L. prolificans* onddoaren koloniaren morfologia. Ezkerreko irudian gaineko aldea azaltzen da eta eskuinekoan azpikoa.

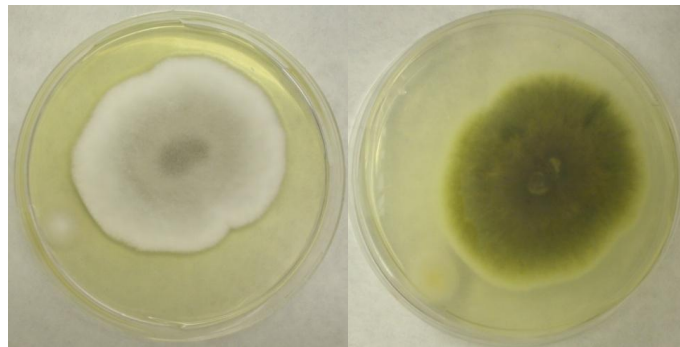
S. apiospermum onddoaren koloniak kolore gris argikoak dira gaineko aldean eta gris ilun edo beltzak azpialdean (3. Irudia). Anelideak zilindro itxurakoak dira eta euren alde apikalean hazten diren konidioak forma oboide-elipsoidala dute. Hauek bakarka edo taldetan haz daitezke konidioforo simple zein adarkatueta. Euren hazkuntzarako tenperatura optimoa 30-37°C artekoa da.



3. Irudia. *S. apiospermum* onddoaren koloniaren morfologia. Ezkerreko irudian gaineko aldea azaltzen da eta eskuinekoan azpikoa.

Bestalde, *S. aurantiacum* onddoaren koloniak kolore gris argikoak eta leunak dira (4. Irudia). Zelula konidiogenoak eta konidioak *S. apiospermum*-en antzekoak direnez, hauek desberdintzeko metodorik egokiena analisi genetikoak dira. Hifa desberdintzatugabeetatik sortzen diren zelula konidiogenoak zilindro-matrazte arteko itxura dute eta haietatik hazten diren konidioak pareta-leunekoak,

azpiahialinoak eta oboide-elipsoidalak dira, 5-14 x 2-5 µm-tako tamainakoak. Haien hazkuntzarako temperatura optimoa 27-40°C artekoa da, baina 45°C-tan ere bizirauteko gai dira.



4. irudia. *S. aurantiacum* onddoaren koloniaren morfologia. Ezkerreko irudian gaineko aldea azaltzen da eta eskuinekoan azpikoa.

Hiru espezieek patata dextrosa agarra (PDA) duen medioan abiadura azkarrean garatu eta heltzeko ahalmena dute, ezaugarri morfologiko desberdinak erakusten dituztelarik euren artean bereizteko erabilgarriak direnak (1. Taula).

1. Taula. *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium apiospermum* eta *Scedosporium aurantiacum*-en ezaugarri morfologikoak. Hiru espezieen kolonien ezaugarriak, temperatura desberdinetan biziraupena eta mikroskopiotik behatuz duten morfologia deskribatzen dira.

Espeziea	Kolonía			Temperatura		Mikroskopioa			
	Gaineko aldea	Azpiko aldea	Pigmentu barreigarriak	40°C	45°C	Anelideak	Konidioak	Sinema	Askoma
<i>Lomentospora prolificans</i>	Beltza, hezea, alde apikal zuriekin	Beltza	Ez	Bai	Ez	Matraze itxurakoak	Globo itxurakoak	Ez	Ez
<i>Scedosporium apiospermum</i>	Leuna, gris-marroixka, ertz argiekin	Marroi iluna	Batzuetan	Bai	Ez	Zilindrikoa	Oboide-elipsoidala	Bai	Ez
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	Leuna, gris-marroixka edo horixka	Marroi-laranja	Bai	Bai	Bai	Zilindro-matraze itxurakoa	Oboide-elipsoidala	Bai	Ez

1.3. Banaketa geografikoa

Onddo patogeno hauek mundu osoan zehar hedatuta daude, batez ere klima epeleko zonaldeetan, non gizakiak eraldatutako zein kutsatutako inguruneetan isolatzen diren (Cooley *et al.*, 2007). Beraz, gizakiak eguneroko kontaktua izan dezake onddo hauekin.

Espainia mailan gaixotasun infekzioso gehien eragiten dituen onddo haritsuaren generoa *Aspergillus* da, baina *Scedosporium*-ek (aurreko urtera arte *L. prolificans* genero honetan sailkatua zegoen) gertutik jarraitzen dio (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013).

Hala ere, hiru espezie hauen banapen geografikoa ez da guztiz berdina. *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum*-en hedapena zabalagoa da *L. prolificans* espeziearena baino. Izan ere, *L. prolificans*-en banapena mugatuagoa da, lan honen sarreran azaldu bezala, kasu kliniko gehienak Iberiar penintsulako iparraldean, Australian eta Estatu Batuetan eman direlarik (Cortez *et al.*, 2008).

1.4. *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium apiospermum* eta *Scedosporium aurantiacum* onddoek eragindako gaixotasunak

Hiru espezie hauek morfologikoki eta banaketa geografikoari dagokionez desberdinak izateaz gain, praktika klinikoan ere badituzte zenbait ezaugarri bereizle. Alde batetik, *L. prolificans* espezieak erresistentzia maila altuagoa erakusten du borikonazol antifungikoaren aurrean. Bestetik, *L. prolificans*-ek eragindako gaixotasunen espektra desberdina da *Scedosporium* generoko onddoek sortzen dituztenekiko. Lehenengoak gehienetan infekzio barreiatuak eragiten ditu immunoeskasia duten gaixoengan eta bigarrenak, itotzearen sindromearen zein mizetoma eumikotikoen eragileak dira (Lackner *et al.*, 2014).

L. prolificans-ek gizakiengan eragindako lehen infekzioa 1984. urtean deskribatu zen (Malloch & Salkin, 1984). Gaur egun, hiru baldintza kliniko desberdinei lotuta agertzen dira (Idigoras *et al.*, 1990-1999):

1. Kolonizazioa, batez ere arnabideetako, HIESa edo fibrosi kistikoa duten gaixoengan zein gibel edo biriken transplantea jasan duten pertsonengan.
2. Gainazaleko eta sakonean lokalizatutako infekzioak gaixo immunokonpetente zein immunoeskasia dutenengan, larruzalekoak, okularrak, biriketakoak, osteoartikularrak, endokarditis, peritonitis eta meningozefalitisa barne.
3. Barreiatutako infekzioak immunoeskasia duten gaixoengan. *L. prolificans*-ek sortutako infekzioak leuzemia, linfoma zein HIESa duten gaixoengan deskribatu dira eta baita biriken edota hezur muinaren transplantea jasan duten indibiduoengan.

S. apiospermum onddoak ere infekzioak eragiten ditu, normalean traumatismo edo zauri sakon baten ondorioz, lurzoru edo simaurrarekin kontaktuan jartzean. Hala ere, kirurgia, rakinanestesia, kutsatutako uretan barneratzea, neutropenia, umetan gaixotasun granulomatoso kronikoa pairatzea eta

immunoeskasi zelularrak (transplanteak, HIESa, kortikoideak...) ere eragin dezakete infekzioa. Gainera, espezie hau kontuan eduki beharrekoa da pneumonia pairatzen duten gaixoengan eta baita ur kutsatuetan barneratzean biriketako zein zerebroko abzesuak jasaten dituztenengan (San Juan *et al.*, 2003).

S. aurantiacum espezieak *S. apiospermum*-en antzeko infekzioak sortzen dituela ikusi da eta beraz, immunoeskasidun gaixoak edo transplanteak jaso dituztenak infekzioekiko sentikorra goak dira. Eragiten dituen gaixotasunen artean otitisa, osteomelitisa, sinusitis inbasiboa, keratitisa eta pneumonia daude (Heath *et al.*, 2009).

1.5. Arnasbideetako erantzun immunea *Lomentospora prolificans* espeziearen aurka

Pseudallescheria/Scedosporium konplexuko espezieak, baita *L. prolificans* ere, gizakia bizi deneko inguruneetan oso hedatuak daude (Kaltseis *et al.*, 2009). Beraz, immunitate sistemak indibiduo osasuntsuei egunerokoan emandako babesak, onddo haritsu hauen aurkako defentsak eraginkorra izango da eta gaixoaren biziraupena mugatuko du. *L. prolificans* espeziea infekzio larriengan giza gorputzean arnasbideak erabiliz barneratzen da (Cortez *et al.*, 2008). Ondorioz, ostalariak zenbait estrategia garatu ditu bere burua babesteko, epiteliaren muga funtzioa, eztula, mukozilioen arteko hutsunea, zelula immune profesionalak eta ostalariaren babeserako molekulen jariatzea barne. Honela, arnas traktuaren gainazaleko epitelioko eta epitelioko azpimukosalak izugarriko garrantzia dute biriketako patogenoen aurka (Roilides *et al.*, 2010).

Albeoloetara iristean, arnastutako konidioak topatzen dituzten lehenengoak ostalariaren albeoloetako makrofagoak dira. Hauek konidioak intrazelulari apurtzen dituzte, haien hozitzea ekidinez (Waldorf *et al.*, 1984) eta leukozito polimorfonuklearrak (PMN) errekrutatuz. Arnastutako konidio batek berak ere hozitzea lortzen ez badu, zirkulatzen ari diren monozito eta PMNetara lotuko dira. Hauek gai dira hifak apurtzeko oxigeno menpeko zein ez-menpeko mekanismoen bidez. Monozito primarioek eta makrofagoek hifak kaltetzen dituzten bitartean, PMNek oxigeno espezie erreaktibo (ROS) kantitate handiak askatzen dituzte hifak hondatuz (Balloy & Chignard, 2009). Sistema immunearen zelula hauetaz gain, arnas traktuak aireko onddo haritsuen aurkako jaiotzetiko defentsak ere baditu, hala nola, zitokinak, hartzaileak eta peptido antimikrobiarrak. Onddoen konidio edo hifen gainazaleko patogenoei lotutako eredu molekular (PAMP) batzuk, fagozitoen eredu ezagumendurako hartzaileetara (PRR) lotzen dira eta hantura zein fagozitoen aktibitate antifungikoaren seinale molekularra sortzen dute (Bartlett *et al.*, 2008). PRRak aktibatzean zenbait zitokina, kemokina eta hazkuntza faktore askatzen dira, garrantzia handia dutenak ostalariaren erantzunean eta onddo haritsuen infekzioen patogenesia (Romani, 2004).

Amaitzeko, erantzun immune moldagarriari dagokionez, immunoglobulinak dira gailentzen direnak, infekzioen aurka daukaten zeregin garrantzitsuagatik. Arnasbideetan listuak jariatzen duen A Immunoglobulinak (IgA), babesa ematen du patogenoen atxikidura zein ehun mukitsuetan sartzea ekidinez, eta baita fagozitosia zein aurre-hanturarako konposatuen sintesia bultzatuz. *L. prolificans*-en kasuan, ikerketa berri batek erakutsi du IgA-k errazago ezagutzen dituela konidioak hifak baino. Hau bat dator onddoen inbasioa arnasbideetatik ematean barneratzen direnak konidioak direla (hifak gutxitan) dioen hipotesiarekin. Ezagutzen diren proteina immunogainartzaileen artean, ugarienak metabolismoarekin erlazionatutako entzimak dira, baina badaude beste proteina talde garrantzitsu batzuk ere, hala nola, patuarekin, translazioarekin, edota energiaren ekoizpenarekin erlazionatutako entzimak (Pellon *et al.*, 2014).

1.6. Teknika proteomiko eta immunomikoen bidezko antigenoen ezagumendua

Azken urteetan, onddoen proteomika oso ikertua izan da mikologian. Metodo desberdinen bidez antigeno berriak topatu, antifungikoen aurkako erantzuna karakterizatu eta onddoen patogenizitatearen mekanismo molekularrak aztertu ahal izan dira. Teknika proteomikoak eta Western Blot-a konbinatuz, adibidez, immunoglobulina (Ig) isotopo desberdinek, hala nola, IgA, IgG eta IgE, ezagututako *Aspergillus fumigatus* onddoaren zenbait antigeno identifikatzea lortu da (Singh *et al.*, 2010(A); Singh *et al.*, 2010(B)).

Ikerketa proteomikoetan oso erabilia den teknika bat bi dimentsioko elektroforesia (2-DE) da. Honi esker, proteinak puntu isoelektrikoaren eta pisu molekularren arabera bana daitezke. Tindaketa prozesu desberdinak ere erabilgarriak dira proteinen identifikaziorako, hala nola, Coomassie urdina, zilar tindaketa edota koloratzaile fluoreszenteak. Teknika berrienen artean masa espektrometria eta isotopoekin aberasturiko kultibo medioen bidezko markaketa metabolikoa daude, kantitate txikian dauden proteinen, proteina hidrofobikoen zein mintzeko proteinetan aldaketak karakterizatzea eta identifikatzea ahalbidetzen dutenak.

Onddoen genoma sekuentziatua eta publikatua egon ez arren, ikerketa proteomikoei esker proteina garrantzitsuak identifikatzea posible izan da, esate baterako, garrantzi medikoa duten antigenoak *Pseudallescheria boydii* eta *L. prolificans* onddo espezieetan (Alcântara da Silva *et al.*, 2011; Pellon *et al.*, 2014). Horretarako, aztertutako proteinak beste onddo batzuen proteina ortologoekiko konparatzen dira, zeinak genoma sekuentziatua duten.

2. HELBURUAK

Lan honetan ikertutako onddoa, *L. prolificans*, oportunistea eta emergentea da. Gainera, hiriguneetan eta gizakiekin erlazionatutako ekosistemetan oso hedatua dago. Nahiz eta gizakiak onddoarekiko eguneroko kontaktua izan, gaixotasun infekziosoak immunoeskasia duten pertsonengan baino ez dira garatzen. Ondorioz, indibiduo immunokompetenteen immunitate-sistema eta erantzun immunea oso erabilgarriak izan daitezke *L. prolificans*-ek sortutako gaixotasun infekziosoa ekiditeko.

Ingurumeneko onddoek gorputzera barneratzeko erabiltzen duten sarrera-bide nagusia arnasbideak dira eta hortaz, bertako defentsa mekanismoak ezinbestekoak izan daitezke. Arnas traktuko mukosetan immunitate-mekanismo asko daude, makrofagoak, entzimak, defentsinak eta linfozitoak, besteak beste. Hala ere, listura jariatzen diren A isotipoko immunoglobulinekin oinarritako eginkizunak dituzte, hala nola, opsonizazioa eta neutralizazioa.

Hau guztia kontuan hartuta, lan honen helburu nagusia giza listuek ezagututako *Lomentospora/Scedosporium* generoko onddo patogenoen antigenoen karakterizazioa da. Horretarako, hurrengo helburu partzialak planteatu dira:

1. *L. prolificans*, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum* espezieen proteomen analisia eta karakterizazio proteomikoa.
2. Pertsona immunokompetenteen IgA-k ezagututako *L. prolificans*, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum*-en immunomen analisia eta karakterizazio proteomikoa.
3. Proteomen eta immunomen analisi konparatiboa erlazionatutako hiru onddo espezieen artean: *L. prolificans*, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum*.

3. MATERIALA ETA METODOAK

Ikerketarako *Lomentospora prolificans* espeziaren CECT 20842 anduia erabili zen, “Colección Española de Cultivos Tipo”-koa (CECT) eta *L. prolificans*-ek eragindako infekzio barreiatua zuen Marqués de Valdecilla ospitaleko gaixo batetik isolatutakoa (Santander, Espainia). Onddo hau *Scedosporium apiospermum* espeziearen 93-251 anduiarekin eta *Scedosporium aurantiacum*-en 116910 anduiarekin konparatu zen. Lagin hauek -80°C-tan kriokontserbatu eta patata dextrosa agarrean (PDA) kultibatu ziren 37°C-tan 6 egunetan zehar, erabili aurretik. Ondoren, kultiboak PDA zuten saio-hodietan gorde ziren 4°C-tan.

3.1. Ereintzak eta konidioen bilketa

Hiru onddo espezieak PDA medio solidoa zuten Petri kutxetan erein eta 6 egunetan zehar inkubatu ziren 37°C-tan. Inkubazio denbora igarotakoan, konidiosporak bildu ziren. Horretarako, plakak birritan garbitu ziren ur gazi esterilaren [%0,9 (p/b) NaCl] bidez eta ereinketarako hagatxo bat erabiliz. Konidioak mizeliotik banatu ahal izateko, disoluzioa iragazi egin zen gaza baten bidez esterilitatea mantenduz. Modu honetan, disoluzioan soilik esporak egongo ziren.

Onddoek ekoizten zituzten esporen kontzentrazioa txikiegia ez zela ziurtatzeko, hemozitometroaren bidez zenbatu eta 10^7 konidio/ml-ko kontzentrazioa zuen patata dextrosa medio likidoan (PDB) inkubatu ziren irabiatuz 7 egunetan zehar 37°C-tan. Onddoen hazkuntza eman zela egiaztatu ondoren, hazkuntza-medioak iragazi egin ziren bi aldiz. Esporen disoluzioak lortutakoan, zentrifugatu egin ziren 10 minututan zehar, -4°C-tan. Disoluzioa bi fasetan banatuta geratzean, gainjalkina bota zen, konidioen pastilla lortuz.

3.2. Proteinen erauzketa

Proteinak lortu ahal izateko, konidioen pastilla 1 ml PBS-tan (*phosphate-buffered saline*, pH 7,4) birsuspenditu zen eta eppendorf hodie beirazko esferak (0,5 mm-ko diametrokoak, Biospec Products, AEB) gehitu zitzaizkien, 1 ml inguru, esporak apurtu ahal izateko. Beirazko esferez gain, apurketa eraginkorragoa izateko, eppendorf hodietan %1 (b/b) β -merkaptotanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) eta %1 (b/b) anfolito (Pharmalyte TM 3-10 for IEF, GE Healthcare, Erresuma Batua) jarri ziren. Prestatutakoan, apurketari ekin zitzaion MILLMIX 20 homogeneousadorean (Biogen idec., Madril, Espainia), 20 minututan zehar eta 30 s⁻¹-eko maiztasunarekin. Amaitutakoan, erauzkina 5 minututan zehar 14.000 g-tan zentrifugatu eta gainjalkina jaso zen.

Proteinen prezipitazioa azetonaren lau bolumen, %10 (b/b) azido trikloroazetiko eta %0,07 (b/b) β -merkaptetoanol erabiliz egin zen, ordu batez -20°C -tan inkubatuz. Denbora igarotakoan, 20 minututan zehar zentrifugatu ziren 14.100g-tan eta gainjalkina bota zen, lortutako pastilla azetonarekin garbituz. Azkenik, proteinak hidratazio tanpoi batean birsuspenditu ziren (7 M urea, 2 M tiourea, %4 (p/b) CHAPS, %2 (b/b) anfolito eta %2 (b/b) β -merkaptetoanol).

3.3. Bi dimentsioko elektroforesia (2-DE)

Birsuspenditutako proteinei %1 (b/b) anfolito, %1 (b/b) β -merkaptetoanol eta bromofenol urdina (Merck, Darmstadt, Alemania) gehitu zitzaizkien, proteinak tinda zitezen. Disoluzioa hau isoelektroenfokerako kutxetan jarri eta gainean, 7 cm-ko luzerako eta 3-10 arteko pH gradienteko IEF gelak (Immobiline Drystrip, GE Healthcare) ipini ziren, espezie bakoitzeko hiru. Ondoren, laginei baselina (Panreac, Bartzelona, Espainia) gehitu zitzaien, laginaren lurrunketa ekiditeko eta estalkia jarri. Amaitzeko, isoelektroenfokea martxan jarri zen (Ettam IPGphor, GE Healthcare): 10 h hidratazioa, 4 h 500V-tan, 3 h 1000V-tan, 2 h 5000V-tan eta 8 h 5000V-tan.

Isoelektroenfokea bukatzean, gelak 5 ml orekatze tanpoidun (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 6,8, %25,5 (b/b) glizerol, %2 (p/b) SDS, %0,002 (p/b) bromofenol urdina) bi hoditan inkubatu ziren birritan 5 minututan zehar, lehen inkubazioan %1 (p/b) DTT eta bigarrean %2,5 (p/b) iodoazetamida gehitu zirelarik. Elektroforesiaren bigarren dimentsiorako %12,5eko kontzentrazioa zuten akrilamidazko gelak erabili ziren (Bio-Rad, T = %40, C = %3,3) eta Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) sistemaren bidez burutu zena, 70 mA, 200 V eta 100 W-etan. Markatzaile bat ere gehitu zitzaion gelari, pisu molekularren adierazlea izango zena (Precision Plus ProteinTM Standards, Bio-Rad).

3.4. Giza listuaren Immunoglobulina A-k ezagututako antigenoen detekzioa

Elektroforesiaren bidez lortutako gelak Hybond-P PVDF mintzetara (GE Healthcare) elektrotransferitu ziren Trans-Blot SDan (Bio-Rad), 30 minutuz 400 mA, 200 V eta 100 W-tan.

Ondoren, antigenoen detekzioa Western Blot-aren bidez burutu zen, protokoloa jarraituz (Pellon *et al.*, 2014). Horretarako, 14 indibiduo osasuntsuen listu laginak jaso eta zentrifugatu egin ziren, hondakin zelularrak kentzeko. Gainjalkina hartu eta bakoitzeko 1,5 ml inguru nahastu ziren Falcon hodi batean, 20 ml-ko *pool* bat lortu arte.

Western Blot-a egiteko, lehenik eta behin, lotura ez-espezifikoa egon ez zitezen mintzak blokeoan jarri ziren ordu batez TBS-n (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) inkubatuz, %7ko (p/b) esne hautsarekin (TBSM). Jarraian, inkubazio berri bat egin zen, kasu honetan listuen *pool*arekin, %7 (p/b)

esne hautsarekin eta %0,25 (b/b) Tween20-rekin eta ordu batez utzi zen. Denbora igarotakoan, bost minutuko bi garbiketa egin ziren TBS-rekin, lotu ez ziren antigorputzak kendu ahal izateko. Ondoren, antigorputz sekundarioarekin hirugarren inkubazio bat burutu zen. Horretarako, peroxidasarekin markatutako giza anti-IgA erabili zen TBS-an 1/100.000 aldiz diluitua eta %0,25 (b/b) Tween20-rekin. Azkenik, bost minututako bi garbiketa gehiago egin ziren TBS-rekin.

Mintzeko seinaleen antzematea ECL plus (GE, Healthcare) sistemaren bidez egin zen eta igorritako kimioluminiszentzia G:BOX Chemi-an (Syngene, Cambridge, Erresuma Batua) detektatu zen. Emaitzak ImageMaster 2D Platinum 5.0 (GE, Healthcare) softwarearekin aztertu ziren, hiru espezieen arteko analisi konparatibo bat eginez.

3.5. ELISA

Behin onddoen erauzkina lortuta, proteinen kontzentrazioa determinatu zen Pierce 660 nm TM Protein Assay Reagent bidez (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Ondoren, espezie bakoitzaren 5 µg erauzkin hiru aldiz gehitu ziren ELISA hutsuneetan eta gau osoan zehar inkubatu. Gaua igarotakoan, blokeoan jarri ziren TBS-an, %5 (p/b) esne hautsa (TBSM) eta %0,05 (p/b) Tween20-ekin ordu batez. Jarraian, listu laginak %0,05 (b/b) Tween20 zuen TBSan ¼ aldiz diluitu eta ordu batez inkubatu ziren. Inkubazioa amaitzean, hiru garbiketa egin ziren %0,05 Tween20-dun TBS-rekin eta ELISA plaka ordu batez inkubatu zen TBS-%0,05 (b/b) Tween20-tan 1/50.000 aldiz diluitutako anti-IgA-rekin. Plaka berriz ere hiru aldiz garbitua izan zen TBS-rekin. Azkenik, erauzkinak TMB-rekin (Sigma Aldrich) inkubatu ziren 30 minututan zehar eta stop soluzio modura 1M H₂SO₄ gehitu zen.

Plakak 450 nm-tan irakurri ziren BioTek Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski, VT) plaka irakurgailuaren bidez. Datuak normalizatu eta ANOVA test bat eginez analizatu ziren, 0,05eko esangarritasunarekin (SPSS-statistics 22.0).

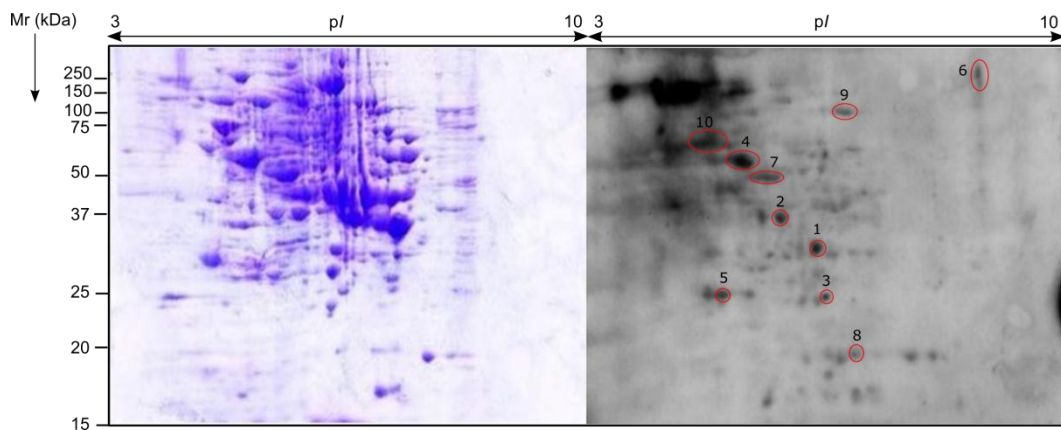
4. EMAITZAK

4.1. Giza listuko Immunoglobulina A-k ezagututako antigenoen detekzioa

Hiru onddo patogenoen proteoma bi dimentsioko elektroforesiaren bidez eta mintzera elektrotransferituz ikertu zen. Honela, pertsona immunokonpetenteen listuko IgA-k ezagututako antigenoak detektatu ahal izan ziren Western Blot-ak eginez. Kimioluminiszentzia irudiak lortu eta ImageMaster softwarea erabiliz, proteina immunogenikoak aztertu ziren, euren puntu isoelektrikoa zein pisu molekularra estimatuz.

4.1.1. *Lomentospora prolificans*-en antigenoen detekzioa

Proteomari dagokionez, *L. prolificans*-en proteinak 25 kDa-tik gora eta 3-8 arteko puntu isoelektrikoan agertu ziren gehienbat. Western Blot-etan ImageMaster softwarearen bidez, 102 *spot* detektatu ziren, eremu errektiboena 3-8 arteko puntu isoelektrikoa eta 25 kDa-etik gorako tamainako eskualdea izan zelarik. Zenbatutako *spot* guztien artean intentsitate erlatibo handiena erakusten zuten hamarrak adierazi ziren, *spot*aren intentsitatea, azalera eta bolumena kontuan hartzen dituen (5. Irudia).



5. Irudia. *L. prolificans* espeziearen mintzaren (ezkerrekoa) eta Western Blot-aren (eskuinekoa) irudiak.

Ezkerreko irudian onddoaren proteoma beha daiteke eta eskuinekoan immunoma, *spot* intentsuenak biribilduta daudelarik. Ezkerreko marjinan pisu molekularra (Mr) eta goikoan puntu isoelektrikoa (pI) adierazita daude.

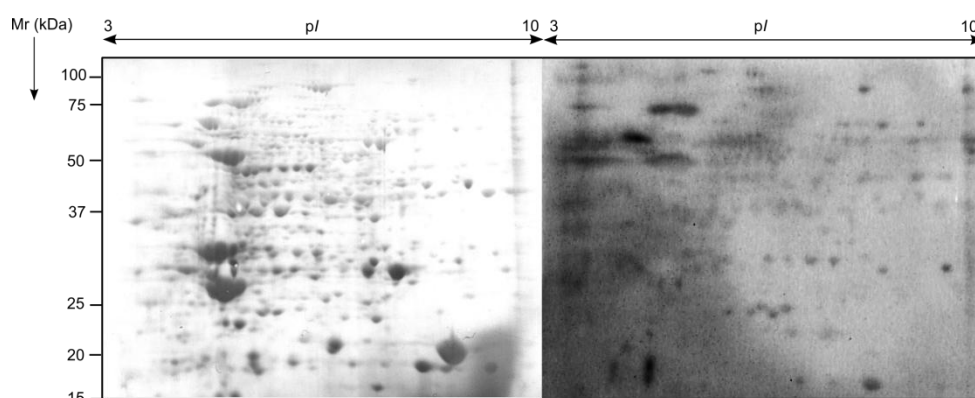
Intentsitate erlatibo handiena erakutsi zuten antigenoen puntu isoelektrikoa, pisu molekularra eta intentsitate balioak adierazi ziren (2. Taula). Proteina hauetatik hiru aldeztatik laborategian identifikatu ziren masa espektrometriaren bidez prebalentzian oinarrituriko ikerketa batean.

2. Taula. *L. prolificans* espeziaren intentsitate erlatibo handieneko antigenoak. Proteinen puntu isoelektrikoa (pI), pisu molekularra (MW), intentsitatea, azalera, bolumena eta % intentsitatearen balio esperimentalak deskribatzen dira.

Spot zk.	Proteina	pI	MW (Da)	Intentsitatea	Azalera	Bolumena	% Intentsitatea
1	40S proteina s6 erribosomala	6,63746	31560	113,00	32,8320	1686,19	2,47091
2	-	6,04532	36592	106,00	21,9113	1288,57	2,31784
3	-	6,80665	24605	105,00	17,0810	771,236	2,29598
4	Enolasa	5,37915	55334	104,00	52,1531	3205,84	2,27411
5	-	5,07251	24762	89,00	24,5015	1297,74	1,94612
6	-	9,34441	262861	85,00	60,4836	1738,69	1,85865
7	-	5,78097	48274	81,00	61,7437	2849,59	1,77118
8	Ziklofilina I	7,27190	19257	78,00	26,1116	637,108	1,70558
9	-	7,09215	95974	77,00	27,8617	1160,95	1,68372
10	-	4,79758	66410	75,00	86,0351	3800,32	1,63998

4.1.2. *Scedosporium apiospermum*-en antigenoen detekzioa

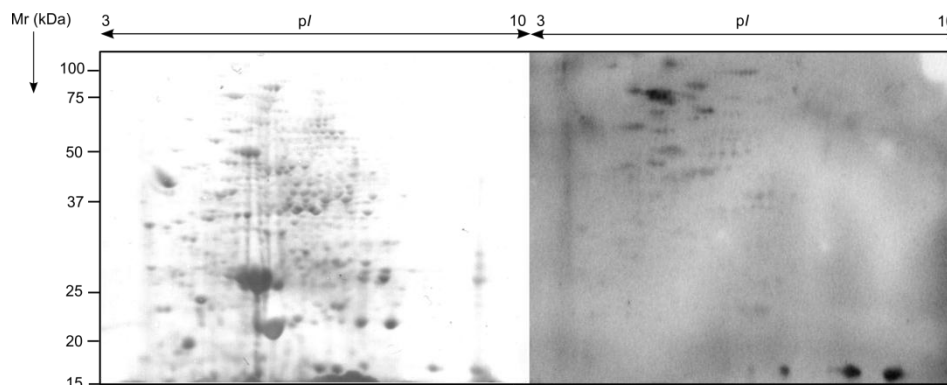
S. apiospermum espeziearen proteinekin bi dimentsioko hiru elektroforesi eta Western Blot egin ziren giza listuen *poolaren* aurrean ondo hauek zituzten proteina immunogenikoak detektatzeko. Hiru mintzetan agertu ziren *spot* kopuru totalaren batz bestekoa 119koa izan zen eta *L. prolificans*-en mintzetan bezala, eremu erreaktiboena 3-8 arteko puntu isoelektrikoan eta 25 kDa-etik gora kokatu zen (6. Irudia).



6. Irudia. *S. apiospermum* espeziearen mintzaren (ezkerrekoa) eta Western Blot-aren (eskuinekoa) irudiak. Ezkerreko irudian ondoaren proteoma beha daiteke eta eskuinekoan, immunoma. Ezkerreko marjinaran pisu molekularra (Mr) eta goikoan puntu isoelektrikoa (pI) adierazita daude.

4.1.3. *Scedosporium aurantiacum*-en antigenoen detekzioa

Bestalde, *S. aurantiacum* espeziearekin ere bi dimentsioko hiru elektroforesi eta hiru WB egin ziren. WB-etako *spot* kopuru totalaren batzaz bestekoa 74koa izan zen eta azkeneko honetan ere 3-8 arteko puntu isoelektrikoan eta 25 kDa-etik gorako eskualdean topatu zen eremu erreaktiboena (7. Irudia).



7. Irudia. *S. aurantiacum* espeziearen mintzaren eta Western Blot-aren irudiak. Ezkerreko irudian onddoaren proteoma beha daiteke eta eskuinekoan, immunoma. Ezkerreko marjinaran pisu molekularra (Mr) eta goikoan puntu isoelektrikoa (pI) adierazita daude.

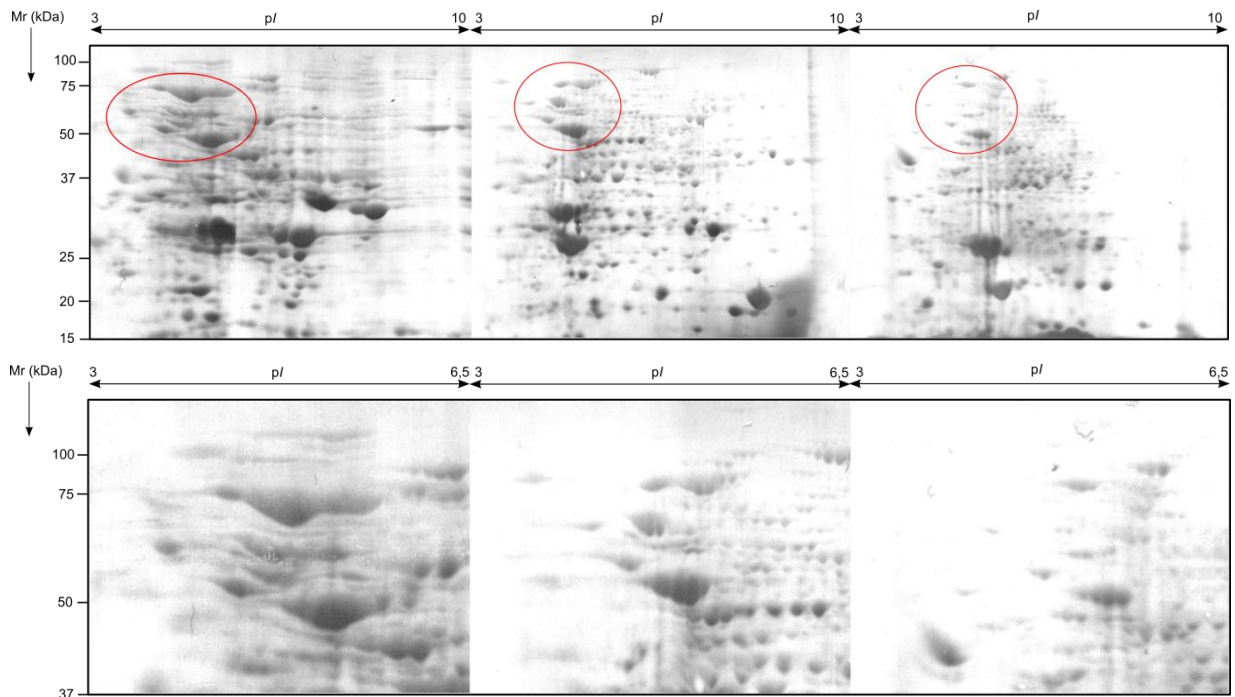
4.2. Proteina immunogenikoen ereduaren analisi konparatiboa

Hiru espezieen proteomak zein immunomak banaka aztertu ondoren, hain artean konpartitzen zituzten antigeno garrantzitsuenak aztertzeko analisi konparatibo bat egin zen.

4.2.1. Proteomen arteko konparaketa

Hiru espezieen mintzak elkarren artean konparatu ziren haien proteomen arteko antzekotasun eta desberdintasunak behatu ahal izateko (8. Irudia). *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum* espezieen patroi proteikoak nahiko desberdinak ziren *L. prolificans*-enarekiko. Hala ere, 3-6 pI eta 100-50 kDa arteko eskualdea hiru espezieetan errepikatzen zen. Gainerako eremuan ez zegoen antzekotasun handirik.

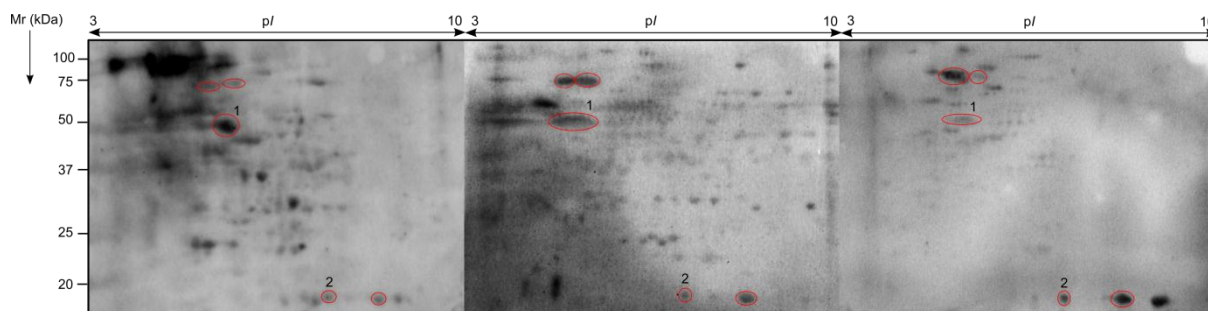
Bestalde, espero zen moduan, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum* espezieen patroiak nahiko antzekoak ziren euren artean, genero bereko espezieak baitira. Proteina asko berdinak ziren eta puntu isoelektriko zein pisu molekular ia berbera zuten, batez ere 50kDa-tik gorako eremuan.



8. Irudia. *L. prolificans* (ezkerrekoa), *S. apiospermum* (erdikoa) eta *S. aurantiacum* (eskuinekoa) espezieen proteoma. Azpiko irudiak hiru espezieetan errepikatzen den zonaldearen (goikoetan birbildutakoak) handipenak dira. Ezkerreko marjinan pisu molekularra (Mr) eta goikoan puntu isoelektrikoa (pI) adierazita daude.

4.2.2. Immunomen arteko konparaketa

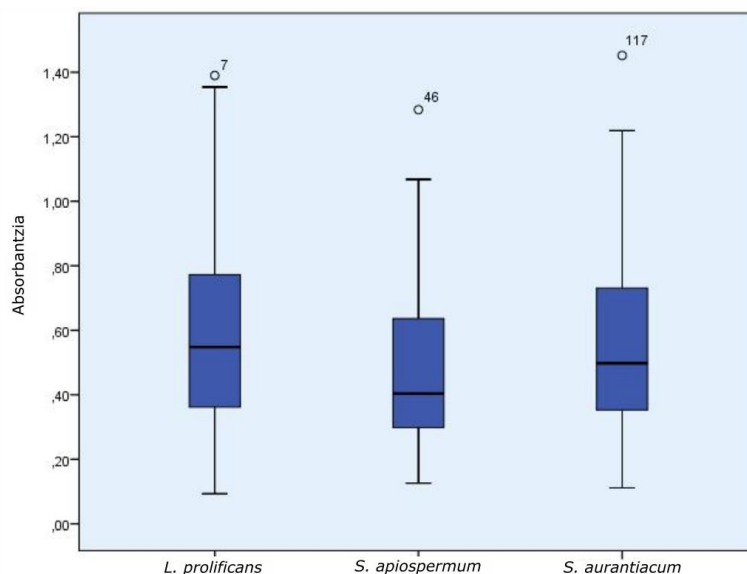
Hiru espezieen Western Blot-ak lortuta, euren immunomak elkarren artean konparatu ziren antzekotasunak zein desberdintasunak behatzeko (9. Irudia). Proteomarekin gertatu zen bezala, *S. apiospermum* eta *S.aurantiacum*-en immunomak *L. prolificans*-enarekiko nahiko desberdinak ziren. Hala ere, kasu honetan bi eskualde errepikatzen ziren: 3-6 pI eta 100-50 kDa arteko eremua zein 7-9 pI eta 20 kDa-tik beherakoa. Lehenengo eskualdean hiru proteina errepikatzen ziren, pisu molekular zein puntu isoelektriko berbera zutenak. Horietako bat, 1 zenbakiarekin izendatutakoa, prebalentziaren ikerketan identifikatutako enolasa proteina zen. Bigarren eskualdean, berriz, bi ziren hiru WB-etan errepikatutako proteinak eta hauen artean puntu isoelektriko baxuena zuena aurretik identifikatutako ziklofilina I proteina zen, 2 zenbakiarekin izendatutakoa, hain zuzen ere.



9. Irudia. *L. proliferans* (ezkerrekoa), *S. apiospermum* (erdikoa) eta *S. aurantiacum* (eskuinekoa) espezieen immunoma. Hiru espezieetan errepikatzen diren proteinak biribilduta daude, 1 zenbakiarekin izendatutakoa enolasa da eta 2 zenbakiarekin izendatutakoa, ziklofilina I. Ezkerreko marjinan pisu molekularra (Mr) eta goikoan puntu isoelektrikoa (pI) adierazita daude.

4.2.3. Antigenoekin elkartutako Immunoglobulina A kontzentrazioaren kuantifikazioa

ELISA bat eginez, *L. proliferans*, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum* espezieen aurkako IgA kontzentrazioa aztertu zen 40 pertsona immunokonpetenteengan. Horretarako, plaka batean onddoen erazukinak finkatu eta pertsonen listuekiko erreakzioa kuantifikatu zen, materiala eta metodoen atalean azaldu bezala. Behin emaitzak irakurrita, ANOVA test bat egin zen eta SPSS-statistics 22.0 programaren bidez bloxpot grafika bat (10. Irudia).



10. Irudia. Giza IgA-en kontzentrazioen konparaketa. Bloxpot grafika bat ageri da, zeinean *L. proliferans*, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum* espezieen proteinen absorbantzia adierazten den.

Hiru espezieen absorbantziaren bataz bestekoa antzekoa izan zen. Beraz, ez zegoen desberdintasun esangarririk ($p < 0,05$).

5. EZTABAIDA

Ikerketa honetan aztertutako *L. prolificans* onddoa patogeno emergentea da, prebalentzia baxua izan arren, gero eta gaixotasun gehiago eragiten baititu (Bouchara *et al.*, 2009). Garrantzia kliniko handia du, sortutako gaixotasunak larriak baitira, immunoeskasidun gaixoengan heriotzak eraginez. Heriotzatasua altua izan ohi da, honen arrazoi nagusiak onddoak antifungikoekiko duen erresistentzia intrintsekoa eta gaixoaren egoera klinikoa direlarik (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013).

Giza inguruneetan oso hedatua dagoenez (Cooley *et al.*, 2007), gizakiak egunerokoan etengabeko kontaktua du onddoarekin. Hala ere, konidioak arnastu ondoren, pertsona immunokonpetenteen mukosak gai dira erantzun immune eraginkor bat sortzeko, gaixotzea ekidinez. Horretarako, mukosak dituen defentsa mekanismoen artean proteina mota desberdinak jariatzen ditu lumenera, haien artean garrantzitsuenetarikoa listuko IgA delarik. Honek mikroorganismoen atxikidura eta arnasbideetako epitelioaren kolonizazioa ekiditen ditu, erantzun immuneari hasiera emanaz.

Aldez aurretik egindako ikerketek erakutsi dute giza listuko immunoglobulinekin konidio eta hifen antigenoak antzeman arren, batez ere *L. prolificans*-en konidio morfologia ezagutzen dutela (Pellon *et al.*, 2014). Honetaz gain, laborategian teknika proteomikoak erabiliz listuko IgA bidezko *L. prolificans*-en antigenoen ezagumenduaren ikerketan sakondu da, antigeno nagusiak identifikatuz eta euren prebalentzia aztertuz. Ikerketa lerro honekin jarraituz, lan honetan *L. prolificans*-en antigenoak gertutasun filogenetikoa duten *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum* espezieenekin konparatu dira.

Ikerketa honetan, *L. prolificans* espeziaren proteoma zein immunoma aztertu dira, *spot* guztien artean hamar intentsuenak hautatu direlarik. Horietatik hiru laborategian aldez aurretik egindako ikerketetan masa espektrometriaren bidez identifikatutako 40S proteina s6 erribosomala, enolasa eta ziklofilinak dira.

Lehena, 40S proteina s6 erribosomala, 40S azpiunitate erribosomalaren osagaia da, orain arte antigeno fungiko moduan deskribatu ez dena. Hau topatua ez izan arren, beste proteina erribosomal batzuk identifikatu izan dira antigeno fungiko bezala, euren sekuentziak aztertuz oso kontserbatuak daudela ikusi delarik (Saxena *et al.*, 2003).

Identifikatutako bigarren proteina enolasa (2-fosfo-D-glizerato hidrolasa) da, glukolisian 2-fosfo-D-glizerato eta fosfoenolpirubatoaren interkonbertsioa katalizatzen duen nonahiko entzima izanik. 1994an deskribatu zen lehenengo aldiz *Candida albicans* espeziearen antigeno moduan (Mitsutake *et al.*, 1994). Garai hartatik aurrera ikerketa ugari egin dira legami honetan enolasaren inguruan, esate baterako, kandidiasi inbasiboaren detekziorako erabili izan da (Laín *et al.*, 2007).

Hirugarren proteina ziklofilina (peptidil-propil *cis trans* isomerasa) da, gainerako ziklofilinekin batera proteinen tolesduran ezinbestekoak diren nonahiko proteinen familia homologo bat osatzen duena.

Entzima hauek prolina hondakinak dituzten lotura peptidikoaren *trans* formatik *cis* formaranzko isomerizazioa katalizatzen dute. Esan beharra dago ziklofilinak identifikatu izan direla beste onddo batzuen antigeno moduan, hala nola, IgE-k ezagututa *Psilocybe cubensis*, *Aspergillus fumigatus* eta *Malassezia furfur* espezieetan (Flückiger *et al.*, 2002).

Bestalde, *Internal transcribed spacers*-en (ITS) DNA erribosomikoaren sekuentzien analisiaren ondorioz, *L. prolificans* onddoa *Scedosporium* generotik kanpo geratu zen, genero honetan sailkatutako espezieengandik filogenetikoki urrun zegoela ikusi baitzen (Lackner *et al.*, 2014). Lan honetan aztertu diren *Scedosporium* generoko onddoen proteomak ere urruntasun hau baieztatu dute, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum*-en proteomak antzekotasun ugari baitituzte euren artean eta bien proteomak desberdinagoak baitira *L. prolificans*-enarekiko. Hala ere, hiru espezieek proteomaren zonalde bat antzekoa dute, 3-6 pI eta 100-50 kDa-eko tamaina arteko eskualdea, hain zuzen ere. Ere horietako hiru proteina hiru onddoetan berdinak direla ondoriozta daiteke, pisu molekular eta puntu isoelektriko ia berbera baitute. Hala ere, beharrezkoa izango litzateke masa espektrometriaren bidezko identifikazioa emaitzak guztiz ziurtatzeko

Western Blot bidez, giza listu laginen aurrean hiru onddo espezieek zituzten proteina immunogenikoak detektatu eta lortutako mintzak euren artean konparatu ziren, antzekotasun zein desberdintasunak behatzeko. Proteoma aztertuz ikusi den moduan, immunomaren kasuan ere antzekotasun handiagoa dago *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum*-en artean eta bi espezieak desberdinagoak dira *L. prolificans*-ekiko. Hala ere, immunomaren bi eskualde errepikatu dira, 3-6 pI eta 100-50 kDa artekoa zein 7-9 pI eta 20 kDa-tik beherakoa, hain zuzen ere. Hiru espezieetan detektatutako proteinetatik, *L. prolificans*-en identifikatutako enolasa eta ziklofilinak agertzen dira, puntu isoelektriko zein pisu molekular berarekin. Hau ulertzekoa da, bi proteina horiek kontserbazio filogenetiko altua baitute eta askotan detektatuak izan baitira organismo prokarioto zein eukariotoetan (Flückiger *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2000). Dena den, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum* espezieetan agertutako proteinak enolasa eta ziklofilinak direla baieztatuz, bi espezie horietan haien identifikazioa egin beharko litzateke.

Azkenik, hiru espezieen proteinen erazkinak lortu ziren eta 40 pertsona osasuntsuengan zegoen IgA-ren kontzentrazioa ELISAren bidez aztertu zen. Lortutako balioen batzuetan bestekoa egin ondoren, emaitzek erakutsi zuten hiru onddoen aurkako giza listuko IgA-ren kontzentrazioa antzekoa dela. Hortaz, euren artean desberdintasun esangarririk ez dagoenez, hau ez da hiru espezieek eragiten duten patogenizitate desberdinaren adierazlea.

Laburbilduz, ikerketa honetan giza listuaren aurrean *L. prolificans*-ek dituen antigeno nagusiak detektatu dira, intentsitate altuena erakutsi dutenen artean, aurretik identifikatutako 40S proteina s6 erribosomala, enolasa eta ziklofilina I daudelarik. Orain arte 40S proteina s6 erribosomala ez da argitaratu antigeno fungiko moduan. Gainera, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum* espezieekin

konparatzean, ikusi da bai enolasak eta baita ziklofilinak ere, bi espezie horien antígeno moduan jokatzen dutela giza listuko IgA-ren aurka.

Beraz, ikerketa hau hiru onddo espezie hauek sortutako infekzioen diagnostikorako teknika berrietarako zein tratamendu eraginkorren sorrerarako aurrerapauso bat da. Ikerketa lerro honen jarraipena indibiduo osasuntsu zein infekziodunen listuek ezagututako *L. proliferans*, *S. apiospermum* eta *S. aurantiacum*-en antígenoen identifikazio eta karakterizazioa izango da. Modu honetan, indibiduo osasuntsuengan ezagututako antígenok txertoak ekoizteko edo itu terapeutiko moduan erabili ahalko lirateke eta infekzioa dutenengan ezagututakoak, berriz, itu diagnostiko bezala.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alastruey-Izquierdo A., Mellado E., Peláez T., Pemán J., Zapico S., Alvarez M., Rodríguez-Tudela J. L., Cuenca-Estrella M. & FILPOP Study Group, 2013. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 3380-3387.
- Alcântara da Silva B., Lacerda Sodr e C., Souza-Gonalves A. L., Aor A. C., Ferreira Kneipp L., Bastos Fonseca B., Rozental S., Villela Romanos M. T., Sola-Penna M., Perales J., Eluan Kalume D. & Souza dos Santos A. L., 2011. Proteomic analysis of the secretions of *Pseudallescheria boydii*, a human fungal pathogen with unknown genome. *Journal of Proteome Research.* 11: 172-188.
- Balloy V. & Chignard M., 2009. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection.* 11: 919-927.
- Bartlett J., Fischer A. & McCray P. B. Jr., 2008. Innate immune functions of the airway epithelium. *Microbiol. Basel, Karger.* 15: 147-163.
- Bouchara JP, Horr e R & de Hoog S., 2009. *Pseudallescheria* and *Scedosporium*: emerging opportunists. *Medical Micology.* 47: 341-342.
- Cooley L., Spelman D., Thursky K. & Salvin M., 2007. Infection with *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans*, Australia. *Emerging Infectious Diseases.* 13: 1170-1177.
- Cortez K. J., Roilides E., Quiroz-Telles F., Meletiadis J., Antachopoulos C., Knudsen T., Buchanan W., Milanovich J., Sutton D. A., Fothergill A., Rinaldi M. G., Shea Y. R., Zaoutis T., Kottitil S. & Walsh J., 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clinical microbiology reviews.* 21: 157-197.
- Fl uckiger S., Fijten H., Whitley P., Blaser K. & Crameri R., 2002. Cyclophilins, a new family of cross-reactive allergens. *Eur. J. Immunol.* 32: 10-17.
- Hawksworth D. L., 2011. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus.* 2: 155-162.
- Heath C. H., Salvin M. A., Sorrell T. C., Handke R., Harun A., Phillips M., Nguyen Q., Delhaes L., Ellis D., Meyer W. & Chen S. C. A., 2009. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease, manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin Microbiol Infect.* 15: 689-693.

- Idigoras P., Pérez-Trallero E., Piñeiro L., Larruskain J., López-Lopategui M. C., Rodríguez N. & Marín González J., 2001. Disseminated infection and colonization by *Scedosporium prolificans*: a review of 18 cases, 1990-1999. *Clinical infectious diseases*. 32: 158-165.
- Kaltseis J., Rainer J. & De Hoog G. S., 2009. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Medical Mycology*. 47: 398-405.
- Lackner M., Sybren de Hoog G., Yang L., Ferreira Moreno L., Ahmed S. A., Andreas F., Kaltseis J., Nagl M., Lass-Flörl C., Risslegger B., Rambach G., Speth C., Robert V., Buzina W., Chen S., Bouchara J. P., Cano-Lira J. F., Guarro J., Gené J., Fernández Silva F., Haido R., Haase G., Havlicek V., Garcia-Hermoso D., Meis J. F., Hagen F., Kirchmair M., Rainer J., Schwabenbauer K., Zoderer M., Meyer W., Gilgado F., Vicente V. A., Piecková E., Regenermel M., Rath P. M., Steinmann J., Wellington de Alencar X., Symoens F., Tintelnot K., Ulfig K., Velegraki A., Tortorano A. M., Giraud S., Mina S., Riegler-Hohenwarter K., Hernando F. L., Ramirez-Garcia A., Pellon A., Kaur J., Barreto Bergter E., Vieira de Meirelles J., Dutra da Silva I., Delhaes L., Alastruey-Izquierdo A., Li R., Lu Q., Moussa T., Almaghrabi O., Al-Zahrani H., Okada G., Deng S., Liao W., Zeng J., Issakainen J. & Liporagi Lopes L. C., 2014. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Diversity*.
- Laín A., Moragues M. D., García Ruiz J. C., Mendoza J., Camacho A., del Palacio A. & Pontón J., 2007. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect immunoglobulin G antibody to enolase for serodiagnosis of invasive candidiasis. *Clinical and vaccine immunology*. 14: 318-319.
- Malloch D. & Salkin IF., 1984. A new species of *Scedosporium* associated with osteomyelitis in humans. *Mycotaxon*. 21: 247-255.
- Mitsutake K., Kohno S., Miyazaki T., Maesaki S. & Koga H., 1994. Detection of *Candida* enolase antibody in patients with candidiasis. *J. Clin. Lab. Anal.* 8: 207-210.
- Pellon A., Ramirez-Garcia A., Antoran A., Fernandez-Molina J. V., Abad-Diaz-de-Cerio A., Montañez D., Sevilla M. J., Rementeria A. & Hernando F. L., 2014. *Scedosporium prolificans* immunomes against human salivary immunoglobulin A. *Fungal biology*. 118: 94-105.
- Roilides E., Simitsopoulou M., Katragkou A. & Walsh T. J., 2009. Host immune response against *Scedosporium* species. *Medical Mycology*. 47: 433-440.
- Romani L., 2004. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*. 4: 11-24.

San Juan R., Berenguer J. & Aguado J. M., 2003. Hongos filamentosos emergentes: *Scedosporium*. Control calidad SEIMC.

Saxena S., Madan T., Muralidhar K. & Sarma P. U., 2003. cDNA cloning, expression and characterization of an allergenic L3 ribosomal protein of *Aspergillus fumigatus*. Clin. Exp. Immunol. 134: 86-91.

Simon B., Probst G., Kajava A. V., Oberkofler H., Susani M., Cramer R., Ferreira F., Ebner C. & Breitenbach M., 2000. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. J. Allergy Clin. Immunol. 106: 887-895.

Singh B., Oellerich M., Kumar R., Kumar M., Bhadorla D. P., Reichard U., Gupta V. K., Sharma G. L. & Asif A. R., 2010 (A). Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*. Journal of Proteome Research. 9: 5517-5529.

Singh B., Sharma G. L., Oellerich M., Kumar R., Singh S., Bhadoria D. P., Katyal A., Reichard U. & Asif A. R., 2010 (B). Novel cytosolic allergens of *Aspergillus fumigatus* identified from germinating conidia. Journal of Proteome Research. 9: 5530-5541.

Waldorf A. R., Levitz S. M. & Diamond R. D., 1984. In vivo bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. The Journal of Infectious Diseases. 150: 752-760.

