Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

# Patogenní kvasinky komplexu *Candida parapsilosis*

Klára Kalousová

Bakalářská práce

2019

**Univerzita Pardubice**
**Fakulta chemicko-technologická**
Akademický rok: **2017/2018**

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

| | |
|---|---|
| Jméno a příjmení: | **Klára Kalousová** |
| Osobní číslo: | **C15645** |
| Studijní program: | **B3912 Speciální chemicko-biologické obory** |
| Studijní obor: | **Zdravotní laborant** |
| Název tématu: | **Patogenní kvasinky komplexu Candida parapsilopsis** |
| Zadávající katedra: | **Katedra biologických a biochemických věd** |

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte současné poznatky o vlastnostech a epidemiologii patogenních kvasinek komplexu Candida parapsilosis.
2. Popište historii a důvody rozdělení druhu C. parapsilosis na nové druhy Candida parapsilosis sensu stricto, Candida orthopsilosis, Candida metapsilosis.
3. Zaměřte se na vlastnosti, které činí tyto kvasinky patogenními.
4. Popište další zajímavé vlastnosti těchto kvasinek, např. charakter mitochondriálního genomu anebo schopnost metabolizovat deriváty kyseliny benzoové.
5. Vypracujte literární rešerši na uvedené téma. Při vyhledávání literárních údajů využijte databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information) a Web of Science.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Guinea J. (2014) Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. Clin Microbiol Infect 20, 5-10.**
**Trofa D. et al. (2008) Candida parapsilosis, an Emerging Fungal Pathogen. Clin Microbiol Revs 21, 606-625**
**Tavanti A. et al. (2005) Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III. J. Clin. Microbiol. 43, 284-292**
**Cillingová A. et al. (2017) Eukaryotic transporters for hydroxyderivatives of benzoic acid. Sci. Rep. 7: 8998**
**Nosek J. et al. (2002) Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen Candida parapsilosis. J Clin Microbiol 40,1283-1289**

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzit Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28. 6. 2019

…….

Klára Kalousová

**PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za výběr tématu, odborné vedení a především trpělivost.

**ANOTACE**

Bakalářská práce je zaměřena na patogenní komplex *Candida parapsilosis*. V úvodní části práce je obecně charakterizován rod *Candida*. V následujícím textu je přiblížen samotný komplex *Candida parapsilosis*, jeho objevení, identifikace a zajímavé vlastnosti. V závěru práce jsou popsány nejdůležitější faktory virulence.

**KLÍČOVÁ SLOVA**

kandidy, *Candida parapsilosis*, morfologie, identifikace, virulence

**TITLE**

The pathogenic complex of *Candida parapsilosis*

**ANNOTATION**

The bachelor thesis is focused on the pathogenic complex of *Candida parapsilosis*. The Candida genus is generally characterized in the introductory part. The following sections describe the complex Candida parapsilosis, its discovery, identification and interesting properties. The most important factors of virulence are described in final chapter of the work.

**KEYWORDS**

candida, *Candida parapsilosis*, morphology, identification, virulence

**Obsah**

**Úvod**.....11

1 Obecná charakteristika kvasinek .....12

1.1 Rozmnožování a morfologie kvasinek.....12

2 Charakteristika kvasinek rodu *Candida* .....14

2.1 Taxonomické zařazení rodu *Candida* .....14

2.2 Fylogenetické zařazení rodu *Candida*.....14

2.2.1 Skupina CTG.....15

2.2.2 Skupina WGD .....15

2.3 Onemocnění způsobená kandidami.....16

2.3.1 Léčba kandidóz.....17

2.4 Výskyt druhů Candida v zeměpisných oblastech.....18

2.5 Candida albicans .....18

2.6 Candida glabrata.....19

2.7 Candida tropicalis.....19

3 Charakteristika komplexu *Candida parapsilosis* .....20

3.1 Morfologie buněk *Candida parapsilosis* .....20

3.1.1 Vliv aminokyselin na morfologii .....20

3.2 Objev *Candida parapsilosis*.....22

3.3 Rozdělení komlexu *Candida parapsilosis* .....22

3.3.1 *Candida orthopsilosis*.....22

3.3.2 *Candida metapsilosis* .....23

3.4 Identifikace komplexu *C. parapsilosis* .....23

3.4.1 Metoda FISH .....24

3.4.2 Metoda PCR .....24

3.4.3 Metoda MALDI-TOF MS .....24

3.5 Heterogenita komplexu *C. parapsilosis*.....25

3.6 Mitochondriální DNA ..... 26
3.7 Schopnost *Candida parapsilosis* metabolizovat deriváty kyseliny benzoové 26
3.7.1 3- oxoadipátová dráha ..... 27
3.7.2 Gentisátová dráha ..... 27
4 Faktory virulence komplexu *Candida parapsilosis* ..... 30
4.1 Vybrané faktory virulence ..... 30
4.1.1 Adheze ..... 30
4.1.2 Sekretované aspartátové proteázy ..... 30
4.1.3 Fytáza ..... 31
4.1.4 Kataláza ..... 31
4.1.5 Sacharidy buněčných stěn ..... 31
4.1.6 Hemolyzin ..... 31
4.1.7 Lipázy ..... 32
4.1.8 Fosfolipázy ..... 32
4.1.9 Biofilm ..... 32
4.2 Rozdíly ve faktorech virulence ..... 33
**Závěr** ..... 34
5 Použitá literatura ..... 35

## SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obrázek 1** Morfologie kvasinek .....13
**Obrázek 2** Fylogenetický strom rodu Candida .....14
**Obrázek 4** Fenotypové přepínání C. rapsilosis..... 21
**Obrázek 5** Heterogenita komplexu Candida parapsilosis metodou RAPD .....25
**Obrázek 6** Metabolismus hydroxybenzenů a hydroxybenzoátů .....28

## SEZNAM TABULEK

**Tabulka 1** Seznam kandid hlášených jako původci kandidózy .....17
**Tabulka 2** Přehled metod používaných k identifikaci kvasinek .....23

## SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---|---|
| **CTG** | cytosin, thymin, guanin |
| **CUG** | cytosin, uracil, guanin |
| **RNA** | ribonukleová kyselina |
| **tRNA** | transferová ribonukleová kyselina |
| **Ser-tRNA** | serin transferová ribonukleová kyselina |
| **AIDS** | syndrom získaného imunodeficitu (Acquired Immune Deficiency Syndrome) |
| **HIV** | virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus) |
| **DNA** | deoxyribonukleová kyselina |

# Úvod

V současné době je kvasinka *Candida parapsilosis* druhou nejčastěji se vyskytující kandidou v klinických izolátech na světě. Způsobuje povrchové nebo i systémové infekce u lidí. Tyto infekce jsou často nozokomiální, což je spjaté s výskytem *C. parapsilosis* na rukou každého třetího zdravotnického pracovníka. *C. parapsilosis* dokáže růst jak na biotickém, tak i na abiotickém povrchu.

Do komlexu *C. paraspilosis* patří tři velmi blízké druhy *Candida parapsilosis sensu stricto, Candida orthopsilosis* a *Candida metapsilosis,* mezi sebou fenotypově téměř nerozlišitelné. K identifikaci slouží molekulárně-biologické metody jako PCR, MALDI-TOF MS, FISH a NASBA.

*Candida parapsilosis* má několik zajímavých vlastností oproti ostatním kandidám. Jde například o lineární mitochondriální DNA nebo schopnost metabolizovat deriváty kyseliny benzoové.

Kvasinky komplexu *Candida parapsilosis* si vyvinuly tzv. virulentní faktory, díky kterým mají schopnost kolonizovat hostitelské tkáně, způsobit onemocnění, nebo překonat hostitelovu obranyschopnost.

# 1 Obecná charakteristika kvasinek

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou drobné jednobuněčné mikroorganismy řazené do říše hub, jsou známé jako užitečné a člověkem hojně využívané kultury v různých průmyslových odvětvích, známé jsou především jejich dobré vlastnosti v procesech kvašení. Další druhy kvasinek už tolik užitku nepřinášejí. Patří sem druhy způsobující různá onemocnění – kožní, slizniční aj. takové kvasinky nazýváme patogenní, mezi které patří např: zástupci rodu *Candida, Cryptococcus a Trichosporon.* V této práci se zaměřuji na rod *Candida*, hlavně na patogenní kvasinky rodu *Candida*.

Charakteristickým znakem životního cyklu kvasinek je střídání haploidní a diploidní fáze, většina kandid je však diploidní (mají dvě sady chromozomů) [1].

## 1.1 Rozmnožování a morfologie kvasinek

Kvasinky se rozmnožují hlavně pučením a dělením (tj. vegetativně), ale také pohlavně, vytvářením spor. Po rozmnožení kvasinky tvoří 3 morfologické struktury, a to kvasinkovou formu (blastokonidie), pseudohyfy nebo pravé hyfy. Některé kvasinky mohou vytvářet vegetativní spory, některé kandidy dokáží vytvořit chlamydospory [1].

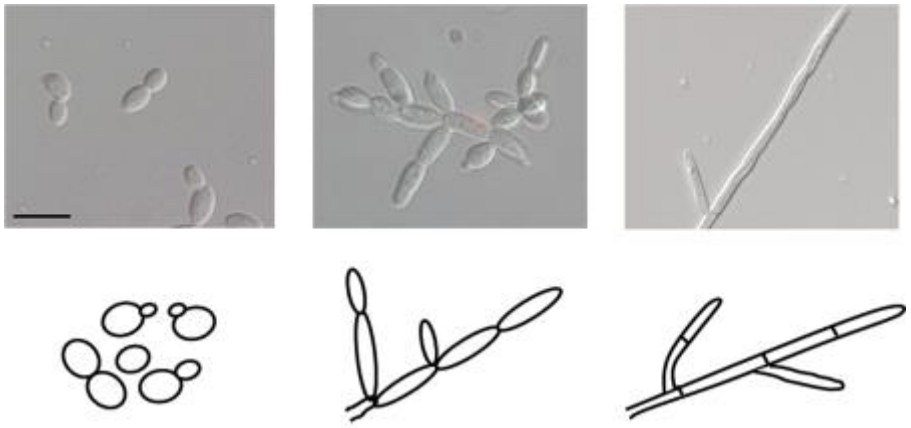
Kvasinková forma se vyznačuje kulatým či oválným tvarem buňky a velikostí zhruba 2–5 × 3–7 μm. Modelovým organismem této formy je *Saccharomyces cerevisiae*.

Pseudohyfy a pravé hyfy je označení pro vláknitý typ růstu. Rozdíl mezi těmito morfologiemi spočívá v rozdílném způsobu jejich vzniku a tvaru.

Pseudohyfální buňky mají elipsovitý tvar (tj. jejich šířka je větší v centru než na koncích) a jsou zúžené v septových křižovatkách. Bývají tvořeny z kvasinkových buněk, nebo z hyf vzniklých pučením. Vzniklé pseudohyfy zůstávají připojeny k rodičovské buňce, tím je vlákno prodlouženo.

Pravé hyfy mají obecně rovnoběžné strany a jsou rovnoměrně široké, bez zúžení v septových křižovatkách. Bývají tvořeny kvasinkovými buňkami, nebo již vzniklými větvemi hyf. Vývoj pravé hyfy je iniciován přítomností "zárodečných klíčků", díky tomu, jsou vlákna prodlužována a větvena. Septa, která vznikají při prodlužování vláken, oddělují hyfy na houbové jednotky. Vlákna pravých hyf jsou méně rozvětvená, než vlákna pseudohyf [2; 3].

Chlamydospory mají 3 až 4 krát větší velikost, než kvasinková forma. Jsou to kulaté, silnostěnné buňky, které vznikají na koncích hyfálních vláken. Kvasinky, které vytváří chlamydospory, takto reagují na prostředí chudé na živiny [3].




*Obrázek 1 Morfologie kvasinek [3]*

V horní části (obr. 1) jsou vyobrazené buňky *C. albicans* mikroskopicky pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), v dolní části jsou jednotlivé morfologie znázorněné schématicky (upraveno dle [3]).

# 2 Charakteristika kvasinek rodu *Candida*

## 2.1 Taxonomické zařazení rodu *Candida*

Říše: *Eukaryota*

Podříše: *Fungi* (Houby)

Kmen: *Ascomycota* (Houby vřeckovýtrusné)

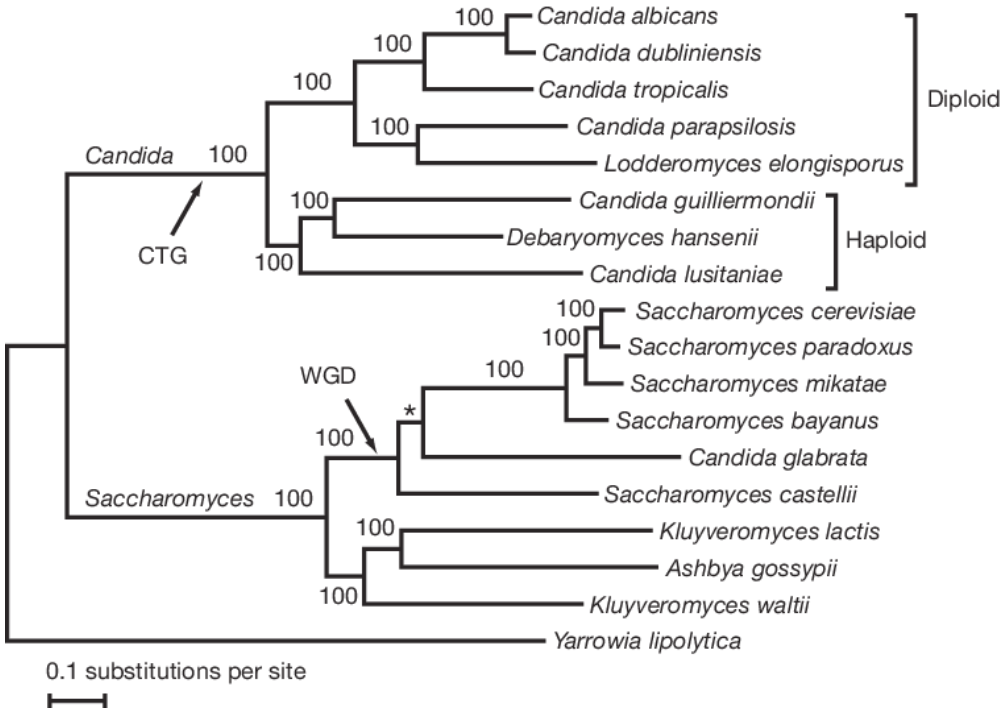
Třída: *Hemiascomycetes*

Řád: *Saccharomycetales* (Kvasinkotvaré)

Čeleď: *Candidaceae* (Kvasinkovité)

Rod: *Candida*

## 2.2 Fylogenetické zařazení rodu *Candida*




*Obrázek 2 Fylogenetický strom rodu Candida [4]*

Samotný rod *Candida* je velmi složitý a heterogenní taxon, který se skládá z více než 160 rozdílných druhů. Můžeme říci, že do rodu *Candida* patří evolučně vzdálené linie, které obsahují jak patogenní, tak i nepatogenní kandidy.

V jednotlivých větvích fylogenetického stromu se nacházejí druhy kvasinek s různou měrou příbuznosti, a právě na základě jejich příbuznosti jsou fylogenetické stromy vytvářeny. Například *C. glabrata* je běžným patogenem, který je úzce příbuzný

s nepatogenním druhem *Saccharomyces cerevisiae, C. parapsilosis* je zřetelně odlišný od *C. albicans*, ale úzce příbuzný s nepatogenním druhem *Lodderomyces elongisporus* a podobně (obr.2). Jedinou výjimkou je *C. krusei*, která je fylogeneticky podobná *Brettanomyces bruxellensis*. *C. boidinii* a *C. parapolymorpha* se nacházejí ve stejné skupině jako *C. krusei*, ačkoliv obě jsou považovány za nepatogenní. Patogenní druhy se hlavně vyskytují ve dvou různých větvích, a to CTG skupina a WGD skupina.

### 2.2.1 Skupina CTG

CUG kodon je ve standardním genetickém kódu organismů překládán jako leucin, zatímco v CTG skupině je tento kodon většinou překládán jako serin (v 95–97 %). Tato neobvyklá translace je umožněna z toho důvodu, že Ser-tRNA může být rozpoznána dvěma způsoby a to seryl-tRNA syntetázou, kodon je přeložen jako serin, nebo leucyl-tRNA syntetázou, kodon je přeložen jako leucin.

Záměna těchto dvou aminokyselin má za následek vznik rodin proteinů se změněnou strukturou a funkcí. Je tedy pravděpodobné, že takto chybná translace CUG kodonu může poskytovat lepší schopnost adherence a vyšší míru úspěšnosti v boji s imunitním systémem hostitele.

Do této skupiny řadíme většinu patogenních druhů kandid, nejvýznamnějšími jsou *C. albicans, C. parapsilosis* a *C. tropicalis* [5; 6].

### 2.2.2 Skupina WGD

Druhou hlavní skupinou, do které patří patogenní druhy, je tzv. WGD („whole genome duplication“ - zdvojení celého genomu) linie [7]. Tato skupina je různorodější a obsahuje jak průmyslově zajímavé kvasinky, tak také i patogenní kvasinky například *C. glabrata* [6].

Organismus, který prošel WGD zhruba před 100–200 miliony let, obsahoval asi 5 000 genů. Z důvodu duplikace se tento počet navýšil asi na 10 000 genů, většina ze získaných genů se tzv. ztratila, to znamená, že jeden ze dvou genů v každé dvojici byl odstraněn, obvykle bez dalších přesunů v chromozomu. Druhy “post WGD” nyní typicky obsahují asi 5 500 genů, které zahrnují 500 párů genů, které byly získány WGD [8].

## 2.3 Onemocnění způsobená kandidami

Řada kandid je součástí lidské komenzální mikroflóry, některé druhy *Candida* způsobují systémové nebo povrchové infekce např. na nehtech nebo na sliznicích, povrchové infekce neohrožují život, ale výrazně snižují jeho kvalitu. Systémové infekce kandidy způsobují zejména při oslabené imunitě a jsou tedy oportunně patogenními kvasinkami. Onemocnění jimi způsobené se nazývá kandidóza. Mezi významné patogenní kvasinky rodu *Candida* patří *Candida albicans, Candida glabrata, Canida tropicalis, Candada parapsilosis.* Tyto čtyři druhy dohromady způsobují 95 % identifikovatelných infekcí způsobených kandidami. Jiné druhy kvasinek rodu *Candida*, včetně *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* a *Candida guilliearmondii* tvoří méně jak 5 % případů invazivní kandidózy [9].

Druhy kvasinek rodu *Candida* patří mezi nejčastějších 10 patogenů, které způsobují infekce krevního oběhu spojené s vysokou úmrtností. Navzdory vývoji nových antifungálních léků ukázaly epidemiologické studie, že rezistence vůči antifungálním lékům u izolátů *Candida* se stává velkým problémem [4].

V posledních asi třech desetiletích se invazivní kandidóza stala nejčastěji diagnostikovanou těžkou kvasinkovou infekcí po celém světě.

Mnoho druhů *Candida* způsobuje nozokomiální infekce u hospitalizovaných pacientů, zejména u starších pacientů s déle trvající lékařskou péčí, u novorozenců s nízkou porodní hmotností a u pacientů s povrchovými poraněními nebo s antimikrobiální či steroidní léčbou. V této souvislosti je třeba uvést, že *Candida* se nachází na rukou každého třetího zdravotnického pracovníka a je známa jako čtvrtý nejčastěji izolovaný mikroorganismus z krevních kultur hospitalizovaných pacientů.

Kandidy nerostou jen na biotickém povrchu, mohou také kolonizovat abiotické vlhké povrchy např. zubní protézy, je těžké je odstranit a uživateli protézy značně komplikují život. Mnohem závažnější je, když kolonizují katetry, nebo kloubní náhrady [10].

Za zmínku stojí fakt, že *C. parapsilosis* se hojně vyskytuje u předčasně narozených novorozenců s porodní hmotností méně jak 1000 g. Takoví pacienti nutně potřebují cévní katetry pro parenterální výživu, které jsou často kolonizovány právě touto kandidou. Oproti tomu *C. glabrata* způsobuje infekce hlavně u dospělých nad 70 let. Tato skupina lidí často žije v nemocnicích, zařízeních pro dlouhodobě nemocné,

mívají zubní náhrady, užívají psychotropní léky, což často bývá predispozicemi pro onemocnění kandidóza [11; 12].

Většina patogenních kandid nemusí primárně způsobovat onemocnění, ale ve spojení s řadou onemocnění (AIDS, oslabená imunita a mnoho dalších) způsobují i ony onemocnění, to znamená, že jsou oportunně patogenními kvasinkami [13].

*Tabulka 1 Seznam kandid hlášených jako původci kandidózy [6]*

| **Výskyt** | **Druh** |
|---|---|
| **Nejčastější původci kandidózy (5 % až 70 %)** | *Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis* |
| **Vzácné, ale mohou být lokálně časté (0,1 až 3 %)** | *C. krusei, C. lusitanae, C.orthopsilosis, C. metapsilosis, C. guilliermondii, C. kefyr, C. inconspicua, C. famata, C. rugosa, C. dubliniensis, C. norvegensis, C. nivariensis, C. bracarensis* |
| **Zřídka hlášené (<0,1 % včetně jednorázových hlášení)** | *C. peliculosa, C. subhashii, C. lipolytica, C. sake, C. apicola, C. zeylanoides, C. valida, C. intermedia, C. pulcherrima, C. hemulonii, C. stellatoidea, C. utilis, C. humicola, C. lambica, C. ciferii, C. holmii, C. marina, C. sphaerica* |

### 2.3.1 Léčba kandidóz

Léčiva proti kvasinkám se nazývají antimykotika. Dříve byl nejpoužívanějším antimykotikem amfotericin B, který ale pro svoji toxicitu byl postupně nahrazován jinými netoxickými látkami. Jeho nevýhodou také bylo to, že některé kandidy např. *C. parapsilosis* si na něho dovedly vytvořit rezistenci. Amfotericin B se váže na strukturní složky buněčných membrán (ergosterol, u savců také na cholesterol), tím poškozuje jejich permeabilitu, dochází k depolarizaci. Navíc podporuje tvorbu kyslíkových radikálů, které se také podílejí na poškozování permeability membrány. Těmito kroky dochází k buněčné smrti [14; 15].

Alternativou za amfotericin B se staly azoly jako flukonazol a vorikonazol, ale i na ně si některé kandidy dokázaly vytvořit rezistenci např. *C. glabrata*. Azolová antimykotika zabraňují syntéze ergosterolu, který je hlavní složkou plazmatických membrán kvasinek. Z toho důvodu dochází k narušení struktury membrán, narušení transportu živin a syntéze chitinu. Ergosterol je také hormonem, který vede k růstu a proliferaci buněk, tomu také azolové sloučeniny brání [16].

V kombinaci s amfotericinem B nebo s azolem se podává, i když méně často, flucytosin zejména při meningitidě způsobené kandidami.

Nejnovější třídou antimykotik jsou echinokandiny ty jsou zejména dostupné ve Spojených státech amerických a zahrnují kaspofungin, micafungin a anidulafungin. Tyto léky inhibují (1,3) -β-d-glukan syntetázu, což je enzym vytvářející glukanové polymery, které jsou součástí buněčné stěny kvasinek, a touto inhibicí narušují buněčnou stěnu kvasinek [15].

## 2.4 Výskyt druhů Candida v zeměpisných oblastech

*Candida albicans* je nejrozšířenější kandida na světě, nejčastěji je izolována od pacientů v Severní Americe, Evropě, Japonsku, Číně, Austrálii a ve většině státech Jížní Ameriky. Druhá nejčastěji izolována *C. glabrata* se hojně vyskytuje ve střední Evropě, Skandinávii, Severní Americe, Austrálii a nejvíce ze všech v Indii. *C. parapsilosis* je třetí nejčastěji izolovanou kandidou. Za zmínku stojí její zvyšující se prevalence v Latinské Americe, kde ji patří první místo ve státech Kolumbie a Venezuela. Zajímavé je zvyšování výskytu *C. parapsilosis* v Jihoafrické republice, kde tento druh je zodpovědný za 35 % invazivních kandidóz a dokonce za 50 % v nemocnicích soukromého sektoru [17].

## 2.5 Candida albicans

*Candida albicans* je nejčastější kandidou, která způsobuje onemocnění. Asi v posledních třech desetiletích se stala důležitým problémem veřejného zdraví. Spektrum onemocnění způsobených tímto druhem se pohybuje od vaginálních infekcí, které postihují až 75 % žen alespoň jednou za celý život, k hlubokým infekcím (to jsou takové infekce, které se nenachází na povrchu těla pacienta) u hospitalizovaných

pacientů, což vede k vysoké míře úmrtnosti. *C. albicans* může také hrát roli v perzistenci nebo zhoršení některých chronických zánětlivých onemocnění střev. Navzdory pokroku ve výzkumech je stále obtížná diagnostika nozokomiálních infekcí a jejich sledování. Jako jediná je polymorfní, tj. dokáže vedle kvasinkových buněk tvořit také vláknité pseudohyfy nebo hyfy, ostatní patogenní kandidy dokáží tvořit nanejvýš pseudohyfy. Antimykotika, která se používají v léčbě proti *C. albicans* jsou azoly a echinokandiny, zejména kaspofungin [10; 18].

## 2.6 Candida glabrata

*Candida glabrata* je jedním z nejvýznamnějších druhů *Candida* spojených s těžkými případy kandidózy. *C. glabrata* je patogen urogenitálního traktu a krevního oběhu, a to zvláště u starších a HIV pozitivních lidí. *C. glabrata* je přirozeně odolná vůči azolovým sloučeninám a je nejběžnější kvasinkou, která dokáže získat rezistenci vůči antimykotikům [19]. Kaspofungin má však silné antimykotické účinky a je prokázán jeho účinek vůči *C. glabrata* [15].

## 2.7 Candida tropicalis

Je to běžný patogen u neutropenických hostitelů a u onkologických pacientů často způsobuje infekce močových cest. Jedná se o komenzální mikroorganismus vyskytující se v dutině ústní přibližně u 50–70 % zdravých jedinců. Může se stát patogenním v důsledku změn prostředí, nebo v důsledku oslabení hostitelského imunitního systému. Pro invazivní onemocnění zahrnují léčby amfotericin B, echinokandiny nebo triazolové antifungální látky s rozšířeným spektrem [9].

# 3 Charakteristika komplexu *Candida parapsilosis*

*C. parapsilosis* je sice přirozený lidský komenzál, ale na rozdíl od dalších oportunně patogenních kandid se hojně vyskytuje také v přírodě. V přírodě, může být izolována z domácích zvířat, hmyzu, půdy a také z mořského prostředí.

V roce 2003 bylo zjištěno sledovacím programem SENTRY, že *C. parapsilosis* je druhou nejčastěji se vyskytující kandidou na lidském těle hned za *C. albicans* v Evropě a Latinské Americe, v Severní Americe třetí za *C. albicans* a *C. glabrata* [15; 20].

V letech 1997–2005 byla *C. parapsilosis* až čtvrtou nejčastější patogenní kandidou způsobující kandidózu z izolátů v oblastech Asie-Tichomoří, Latinské Ameriky, Evropy, Afriky-Blízkého východu a Severní Ameriky. V poslední době je *C. parapsilosis* v některých zemích Latinské Ameriky a Evropy druhou nejčastější kandidou způsobující kandidózu dokonce může být i na prvním místě. Podle uvedených studií relativní výskyt *C. parapsilosis* v klinických vzorcích stoupá [15; 21].

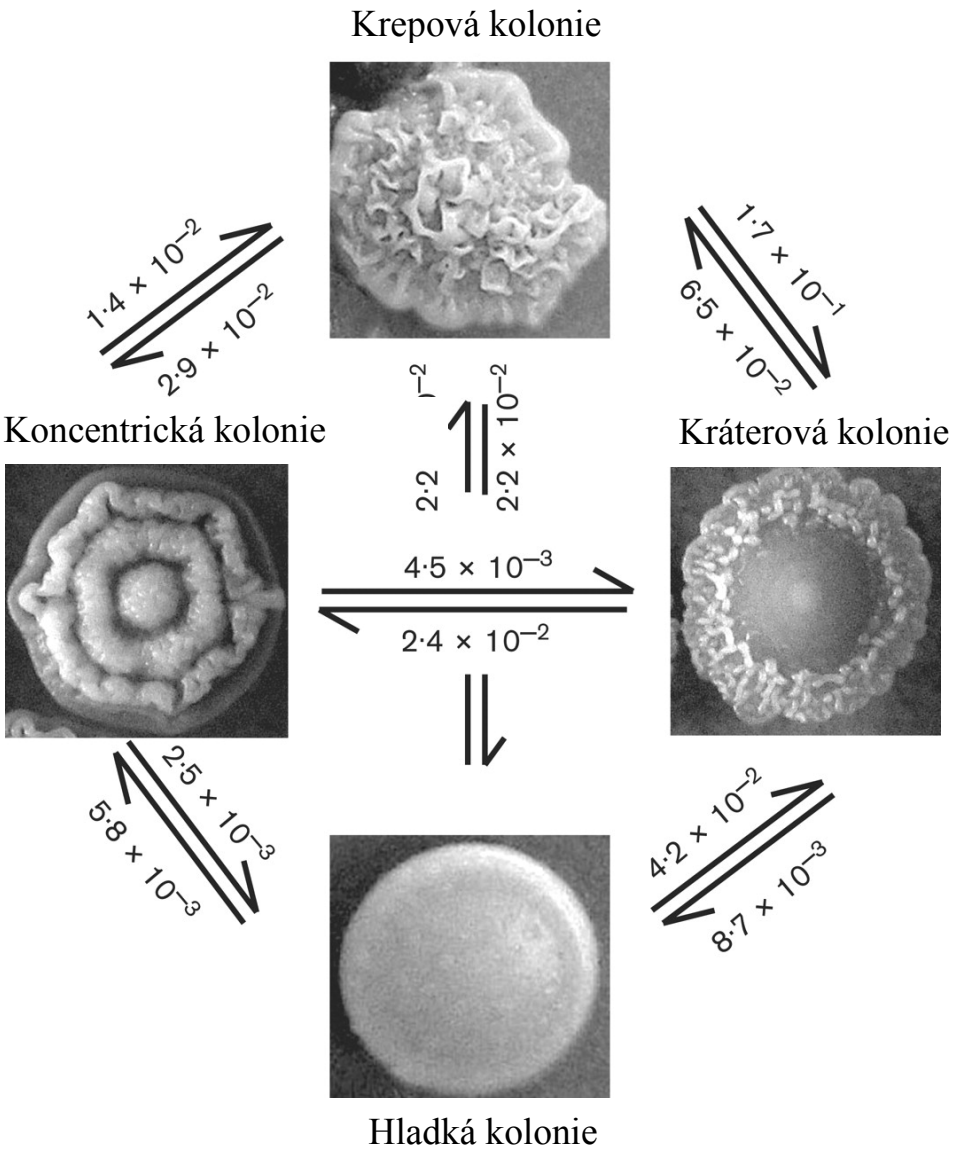
## 3.1 Morfologie buněk *Candida parapsilosis*

Buňky *C. parapsilosis* jsou oválné, kulaté nebo válcovité, na Sabouraudově agaru kolonie vyrůstají bíle, krémově, leskle, hladce až pokrčeně. Na rozdíl od *C. albicans* a *C. tropicalis*, které mohou existovat ve více morfogenetických formách, *C. parapsilosis* netvoří pravou hyfu a existuje jen buď v kvasinkové fázi nebo v pseudohyfální formě. V pseudohyfální formě byly pozorovány na kukuřičném agaru a mohou být identifikovány světelným mikroskopem, což už se v dnešní době moc neprovádí. Nedávné studie ukazují, že tvorba pseudohyf *C. parapsilosis* je spojena se specifickou sadou aminokyselin, zejména citrulinem, které způsobují významné změny v morfologii buněk a kolonií. Fenotypy kolonií také závisí na formě *C. parapsilosis*: kvasinkové kolonie jsou hladké nebo kráterové, zatímco kolonie obsahující pseudohyfy jsou krepové nebo koncentrické [15].

### 3.1.1 Vliv aminokyselin na morfologii

Lysin, arginin a glutamin mají vliv na vytváření krepových kolonií. Asparagin, kyselina asparágová a valin mají vliv na kráterový vzhled kolonií. Glycin, izoleucin, threonin a tyrosin vytvářejí koncentrické uspořádání kolonií. Leucin a methionin indukují invazivní růst.

Při procesu morfogeneze, kdy aminokyseliny spouští morfogenetické změny dochází obvykle ke zvýšení příjmu aminokyselin do buňky. Výjimkou je citrulin, u něhož vznik morfogeneze nezávisí na schopnosti této aminokyseliny vstoupit do buňky [22].




*Obrázek 3 Fenotypové přepínání C. parapsilosis s četností samotného přepínání mezi jednotlivými fenotypy (upraveno dle [41])*

## 3.2 Objev *Candida parapsilosis*

V roce 1928 byla *Candida parapsilosis* poprvé izolována panem Ashfordem, jako druh nefermentující maltózu *Monilia,* ze stolice pacienta s průjmem v Portoriku. Tento druh byl nazván *Monilia parapsilosis,* aby se odlišil od známějšího druhu *Monilia psilosis*, dnes známého jako *Candida albicans.* Tento druh byl nejdříve považován za nepatogenní, ale později byla *Candida parapsilosis* identifikována jako příčina případu endokarditidy u intravenózního uživatele drog v roce 1940 [15].

## 3.3 Rozdělení komlexu *Candida parapsilosis*

Studie z konce minulého století ukazují, že izoláty *C. parapsilosis* mají mezi sebou značné rozdílnosti jako např. izoenzymovou aktivitu, která se mezi kmeny izolovanými z různého prostředí značně liší, na základě těchto rozdílností se druh *C. parapsilosis* rozdělil do třech skupin a to I, II a III [23].

Detailnější genetické studie ukazují, že izoláty tohoto druhu jsou více genotypově heterogenní než izoláty jiných druhů kandid, z tohoto důvodu je výhodnější druh *C. parapsilosis* rozdělit na 3 velmi blízké druhy, nejen na skupiny. Proto se ustálilo nové označení *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* a *Candida metapsilosis*, které se běžně užívá dodnes [15; 24].

Pojmenování "psilosis" těchto druhů je odvozeno od stejnojmenného onemocnění psilosis, které postihuje tenké střevo v doprovodu průjmů a předpony "ortho", "meta" a "para" jsou převzaty z chemického pojmenování různých poloh v jednom šestičlenném kruhu [24].

Tyto druhy se liší v jejich prevalenci a virulenci, nejvíce patogenní je *C. parapsilosis sensu stricto*, méně patogenní je *C. orthopsilosis* a nejméně patogenní a vzácněji izolována je *C. metapsilosis* [6; 25].

### 3.3.1 *Candida orthopsilosis*

Druhý nejvirulentnější z komplexu, má podobné virulenční a adhezní schopnosti jako *C. parapsilosis*. *C. orthopsilosis* je homozygotní, také heterogenní [26]. Z důvodu velké heterogenity se u *C. orthopsilosis* rozlišuje mezi 2 poddruhy zvanými typ 1 a typ 2 [27]. Objevuje se také hypotéza, že *C. orthopsilosis* je předkem *C. parapsilosis* [24].

### 3.3.2 *Candida metapsilosis*

*C. metapsilosis* je diploidní a vysoce heterozygotní druh, jehož rodičovské druhy jsou nepatogenní, ale hybridizace mezi nimi vytvořily patogen [6]. V současné době údaje naznačují, že je to spíše organismus životního prostředí, naznačují to fakta, která informují o jejím nízkém klinickém výskytu [15]. Může se však i přes toto tvrzení objevovat v dutině ústní jako komenzál [27].

## 3.4 Identifikace komplexu *C. parapsilosis*

K identifikaci každého mikroorganismu slouží velké množství metod, kterými jsme schopni mikroorganismy od sebe odlišit i na úrovni druhů. Takové metody se zaměřují na fenotypové (biochemické, mikromorfologické, sérologické aj.) a genotypové (molekulárně-biologické testy) vlastnosti.

*Tabulka 2 Přehled metod používaných k identifikaci kvasinek (upraveno dle [28] )*

| **METODY** | **PRINCIP** | **IDENTIFIKACE** | **HODNOCENÍ** |
|---|---|---|---|
| **FENOTYPOVÉ** | mikromorfologie | nativní preparát | pravé hyfy, pseudohyfy, blastokonidie, chlamydospory |
| | | barvený preparát | pouzdra, spory |
| | aktivita enzymů, produkce pigmentů | vzhled na selektivních a diagnostických půdách | barva kolonie, fluorescence |
| | sérologické reakce | sérologické testy | aglutinace |
| | biochemické vlastnosti | asimilační testy | změna barvy, zákal |
| | | fermentační testy | produkce $CO_2$ |
| **GENOTYPOVÉ** | analýza RNA | NASBA | rozdíly v RNA |
| | analýza proteinů | MALDI-TOF MS | hmotnostní spektrum |
| | analýza DNA | PCR + PAT, FISH | rozdíly v DNA |

**RNA** – ribonukleová kyselina**, NASBA** – amplifikace založená na sekvencích nukleové kyseliny (nucleic acid sequence based amplification), **MALDI-TOF MS**- hmotnostní spektrometrie (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight), **DNA** - deoxyribonukleová kyselina, **PCR** – polymerázová řetězová reakce,
**PAT** – postamplifikační testy, **FISH** – fluorescenční hybridizace *in situ*

Komplex *Candida parapsilosis* je fenotypově natolik podobný, že se pouhými morfologickými, sérologickými a biochemickými metodami nedá rozlišit.

Nejspolehlivějšími metodami sloužícími k odlišení jednotlivých druhů zahrnutých v komplexu *C. parapsilosis* jsou molekulárně-biologické metody. Mezi tyto metody lze zařadit PCR s postamplifikačními testy, MALDI-TOF MS, FISH, NASBA.

### 3.4.1 Metoda FISH

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) se řadí mezi techniky přímé analýzy DNA. Principem této metody je přímá vazba (hybridizace) fluorochromem značené sondy na komplementární úseky vyšetřované DNA. Sondou se rozumí jednovláknová různě dlouhá molekula DNA nebo RNA s předem známou sekvencí nukleotidů. Vzniklá hybridizace se zjišťuje pomocí fluorescenčního mikroskopu. Tato metoda je značně cenově náročná, a ne zcela přesná k odlišení samotných druhů v komplexu *C. parapsilosis*, proto se hlavně v diagnostických laboratořích využívá metod PCR a MALDI-TOF MS [29].

### 3.4.2 Metoda PCR

PCR (polymerázová řetězová reakce) je nejvíce využívaná metoda k přesné identifikaci druhů v komplexu *C. parapsilosis*. Principem této metody je cyklické zmnožení úseku DNA, které se vymezí dvojicí oligonukleotidů (primerů), tyto primery jsou schopny se navázat na předem vybrané specifické sekvence na templátové DNA. Důležitou součástí této reakce jsou také deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs), které jsou stavebními kameny nově vznikající DNA a termostabilní enzym DNA polymeráza, jenž vytváří komplementární úseky [30].

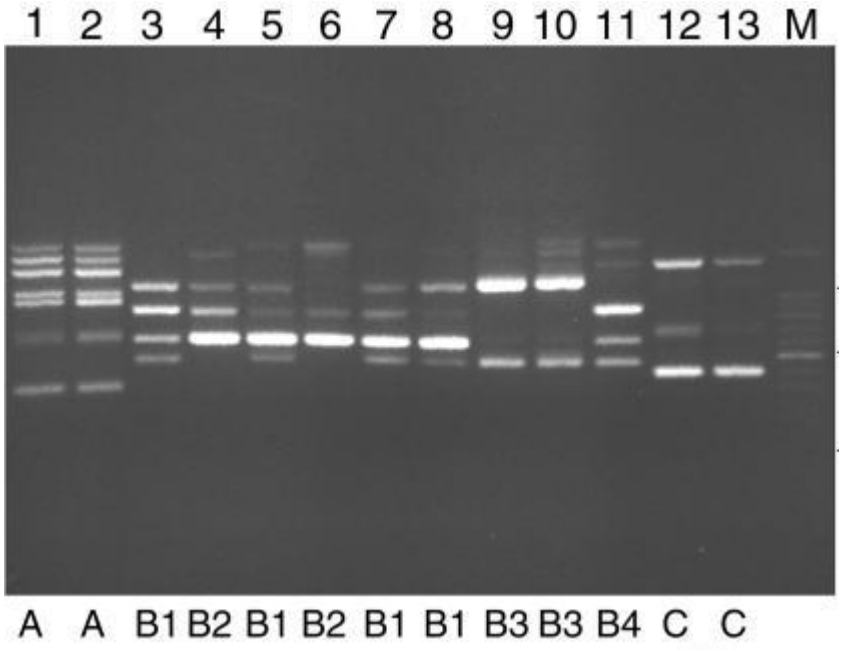
### 3.4.3 Metoda MALDI-TOF MS

V posledních letech se v diagnostických laboratořích hojně využívá hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí / ionizací s využitím matrice (MALDI-TOF MS). Tato metoda se ukázala jako spolehlivá, a hlavně rychlá k identifikaci bakterií a v poslední době také kvasinek. Principem této metody je analýza hmotnostního spektra surového buněčného extraktu, složeného primárně z hojných proteinů. Získaná spektra jsou porovnávána s referenčními druhově specifickými vzory uloženými v databázi přístrojů [31].

## 3.5 Heterogenita komplexu *C. parapsilosis*

Genetická heterogenita komplexu je natolik výrazná, až to dospělo k tomu rozdělit druh *C. parapsilosis* na tři samostatné jednotky. V mé práci uvedu příklad studie, ve které byla tato heterogenita dokázána.

V roce 2005 A. Tavanti a spol. provedli studii a dokázali, že druh *C. parapsilosis* je natolik heterogenní, aby mohl být rozdělen na tři samostatné druhy. Tuto studii provedli se 32 izoláty *C. parapsilosis*. 21 izolátů bylo přiřazeno k nejčastěji se vyskytujícímu druhu *C. parapsilosis sensu stricto*, 9 izolátů k *C. orthopsilosis* a 2 izoláty k *C. metapsilosis*. Všechny izoláty byly testovány pomocí RAPD (randomly amplified polymorphic DNA – náhodně amplifikované polymorfní DNA), při této metodě je využíván jen jeden primer, zatímco při klasické PCR jsou používány primery dva. Přičemž byl použit primer RPO2 (5´-GCGATCCCCA-3´), za podmínek s nízkou stringencí (např. teplota) pro amplifikaci genomové DNA, to znamená, že při amplifikaci díky těmto podmínkám může nasedat i primer ne zcela komplementární.




*Obrázek 4 Heterogenita komplexu Candida parapsilosis metodou RAPD [24]*

Na obrázku jsou patrné RAPD vzory s RPO2 primerem vytvořené pro 32 kmenů komplexu *C. parapsilosis*.

Získané amplifikované profily vykazovaly vysokou genomovou homogenitu v izolátech *C. parapsilosis sensu stricto* (obr. 4, profil A), dva izoláty *C. metapsilosis*

vykazovaly také téměř identický profil (obr. 4, profil C). Naopak izoláty *C. orthopsilosis* vykazovaly vysokou míru genomové heterogenity (obr. 4, profil B1 – B4) [24].

Heterogenitu komplexu také dokazují geny *SADH* pro sekundární alkohol dehydrogenázu a *SYA1* pro alanyl tRNA syntetázu. Podobnost pod 90 % mezi těmito geny u *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis* potvrzují, jak je komplex *C. parapsilosis* heterogenní. Z tohoto důvodu se i tyto geny využívají k rozlišení mezi jednotlivými druhy komplexu pomocí PCR a byly využity i ve výchozí studii Tavanti et al (2005).

## 3.6 Mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) u většiny organismů má kruhovitý tvar, zatímco některé kvasinky mají tvar mtDNA lineární. *Candida parapsilosis* vlastní neobvyklou strukturu této DNA. Mitochondriální genom *Candida parapsilosis* je složen z lineárních dvouřetězcových molekul DNA, které jsou zakončené telomerami. Vedle lineárních molekul jsou v mtDNA obsaženy také kruhové molekuly, nazývané telomerické kruhy (t-kruhy).

Telomerické kruhy společně s mitochondriálním telomery vázajícím proteinem (mtTBP) chrání konce lineárních molekul mtDNA.

Telomerické kruhy byly nedávno objeveny také v lidských buňkách, toto zjištění může vést k lékařským důsledkům v podobě prodlužování telomer na koncích jaderného chromozomu eukaryot.

Mitochondriální DNA je natolik odlišná mezi druhy, že byla navržena pro klinickou identifikaci jednotlivých druhů *Candida* [32; 33; 34].

## 3.7 Schopnost *Candida parapsilosis* metabolizovat deriváty kyseliny benzoové

*Candida parapsilosis* je běžně izolována z půdy, rostlin a jiných přírodních zdrojů. Tento fakt naznačuje, že se podílí na rozkladu rostlinných tkání, včetně produktů rozkladu hemicelulózy a ligninu. Toto je schopna provádět, protože může fermentovat

D-xylózu a využívat různé fenolové deriváty jako jediné zdroje uhlíku, pochopení metabolismu fenolových sloučenin může být přínosem pro biotechnologické aplikace [35].

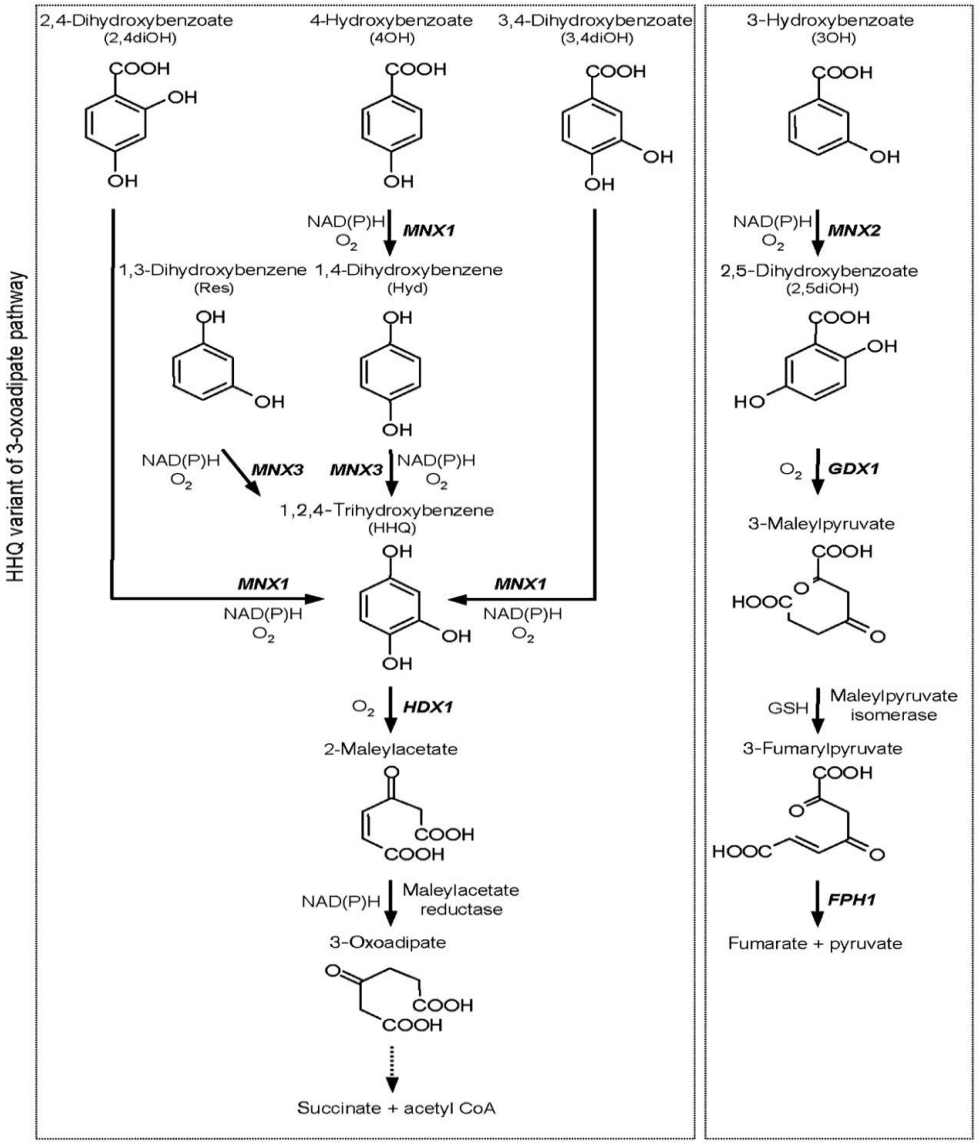
*Candida parapsilosis* metabolizuje hydroxybenzeny a hydroxybenzoáty dvěma různýma způsoby. Za prvé pomocí hydroxyhydrochinonu (HHQ, 1,2,4 - trihydroxybenzen) tzv. 3 – oxoadipátová dráha a za druhé pomocí glutathionu (GSH) tzv. gentisátová dráha. Tyto dráhy by nefungovaly bez aktivity monooxygenáz (MNX1, MNX2, MNX3) a dioxygenáz (HDX1, GDX1), které otevírají aromatický kruh katabolických sloučenin [35].

### 3.7.1 3- oxoadipátová dráha

V této dráze 4- hydroxybenzoát 1- hydroxyláza (MNX1) dekarboxyluje 4- hydroxybenzoát na hydrochinon (1,4- hydroxybenzen), který je substrátem hydrochinonhydroxylázy (fenol-2- monooxygenázy, MNX3). Oba tyto enzymy (MNX1, MNX3) jsou NAD(P) H – dependentní flavoproteinové monooxygenázy s širokou substrátovou specifitou. MNX1 katalyzuje 4- hydroxybenzoát, resorcinát (2,4- dihydroxybenzoát) a protocatechuát (3,4- dihydroxybenzoát). MNX3 katalyzuje hydrochinon a resorcinol (1,3- dihydroxybenzen). Tyto substráty se dále převádějí na HHQ, který je metabolizován přes 2- maleylacetát a 3- oxoadipát na sukcinát a acetyl – koenzym A (acetyl – CoA) (viz obr. 5).

### 3.7.2 Gentisátová dráha

Gentisátová dráha zajišťuje, že je 3- hydroxybenzoát hydroxylován pomocí enzymu 3- hydroxybenzoát 6- monooxygenázou (MNX2) na gentisát (2,5 – dihydroxybenzoát), který je převeden gentisát 1,2- dioxygenázou (GDX1) na 3- maleylpyruvát a následně metabolizován přes 3- fumarylpyruvát na fumarát a pyruvát (viz obr. 5) [35; 36].




*Obrázek 5 Metabolismus hydroxybenzenů a hydroxybenzoátů [35]*

Metabolity obou drah jsou substráty pro reakce, jako například pyruvát dehydrogenázový komplex, cyklus trikarboxylových kyselin a další, které vedou k syntéze aminokyselin, nebo mastných kyselin.

Obě tyto dráhy probíhají v cytosolu a v mitochondriích. Specifické mitochondriální nosiče (MC) transportují produkty, nebo meziprodukty metabolismu hydroxybenzoátů skrz vnitřní mitochondriální membránu, tímto jsou propojeny biochemické reakce působící v cytosolu a mitochondriích [37].

Metabolizovat deriváty kyseliny benzoové oběma způsoby je schopna z *Candida* druhů pouze *C. parapsilosis. C. glabrata, C. lusitaniae* nejsou schopny vůbec růst v přítomnosti těchto derivátů. Ostatní kandidy jako například *C. albicans, C. dubliniensis, C. metapsilosis, C. orthopsilosis, C. tropicalis* rostou v omezené míře, tyto kandidy postrádají gentisátovou dráhu [35].

# 4 Faktory virulence komplexu *Candida parapsilosis*

Patogenní kvasinky rodu *Candida* si vyvinuly širokou škálu virulentních faktorů, které jim zajišťují schopnost kolonizovat hostitelské tkáně, způsobit onemocnění, anebo také překonat hostitelovu obranyschopnost.

Mezi virulentní faktory patří extracelulární sekretované hydrolytické enzymy, které získaly značnou pozornost kvůli jejich roli v patogenezi a jako možné cíle pro budoucí antimikrobiální terapii. Mezi tyto enzymy lze zařadit: proteázy, lipázy, fytázy, katalázy, hemolyziny. Nejenže usnadňují adhezi, penetraci, ale také invazi, šíření a vyhýbání se imunitnímu systému hostitele a také zvyšují biologickou dostupnost základních živin [20].

## 4.1 Vybrané faktory virulence

### 4.1.1 Adheze

Adheze je primárním faktorem při kolonizaci lidských tkání a abiotických povrchů, na kterých poté vytváří biofilm. Tento proces je stimulován několika kaskádami buněčné signalizace, jak v kvasince, tak i v prostředí.

Přilnutí buněk kandid na lidskou tkáň je zprostředkováno nespecifickými faktory (hydrofobnost, elektrostatické síly) a specifickými faktory (adheziny), které jsou přítomny na povrchu kvasinek. Adheziny jsou schopny rozpoznávat proteiny, fibrinogen a fibronektin [10].

### 4.1.2 Sekretované aspartátové proteázy

Sekretované aspartátové proteázy (SAP) hrají důležitou roli ve virulenci patogenních kandid. U *C. parapsilosis* byly zjištěny tři geny kódující tyto proteiny *SAPP1, SAPP2, SAPP3*. Nejvíce byl zkoumán gen *SAPP1*, u kterého bylo zjištěno, že v genomu *C. parapsilosis* je duplikován, absence tohoto genu by neumožňovala růst *C. parapsilosis* v lidském séru a přežití v makrofázích [20; 38].

Aspartátové proteázy usnadňují kolonizaci a invazi do hostitelské tkáně, tím že narušují mukózní bariérové proteiny, jako je albumin, keratin, kolagen a mucin, dále degradují proteiny podílející se na důležitých imunologických procesech a obranné proteiny, jako například těžké řetězce imunoglobulinu G,

C3 protein, kolagen, $\alpha_2$ – mikroglobulin, β – laktoglobulin, fibronektin a laktoperoxidáza [15; 39].

V poslední době jsou zkoumány inhibitory SAP jako antimykotika, tyto inhibitory (ritonavir, sachinavir) blokují penetraci patogenů přes slizniční povrchy a tím snižují histopatologické poškození hostitelovy tkáně [15].

### 4.1.3 Fytáza

Fytáza je fosfohydroláza, která postupně štěpí fytát za účelem uvolnění anorganického fosfátu a inositolu, což jsou základní živiny pro všechny živé buňky. Pro druhy *Candida* jsou tyto látky důležité pro samotné přežití, ale také množení a virulenci.

### 4.1.4 Kataláza

Je to enzym, který je schopen rozkládat peroxid vodíku, a proto se pokládá za důležitou antioxidační obranyschopnost proti neutrofilům a makrofágům.

### 4.1.5 Sacharidy buněčných stěn

Mají roli v mnoha fungálních procesech. U *C. parapsilosis* obsahují mannan, který se účastní adheze k epiteliálním buňkám, rozpoznává vrozené imunitní receptory. N – acetylglukosamin je klíčovou složkou chitinu, polysacharidu, který se zúčastňuje důležitých strukturálních procesech buněčné stěny a také iniciuje expresi virulentních genů. Kyselina sialová zabraňuje rozpoznání kvasinky imunitním systémem hostitele a chrání buňku před imunitní odpovědí [20].

### 4.1.6 Hemolyzin

Schopnost hemolýzy je dalším faktorem virulence, který hraje důležitou roli při oslabení hostitele. Tento protein umožňuje rozklad červených krvinek, za použití hemoglobinu jako zdroje železa. Železo je anorganický prvek, který je důležitý pro správný vývoj a růst mikroorganismů včetně kvasinek, schopnost získat tento prvek umožňuje vytvoření infekčního procesu [10; 39].

### 4.1.7 Lipázy

Lipázy patří mezi hydrolázy karboxylových kyselin, katalyzují hydrolýzu a syntézu triacylglycerolů. Mikrobiální extracelulární lipázy napomáhají trávení lipidů po získání živin, synergickým interakcím s jinými enzymy, adhezi k hostitelským tkáním a buňkám, iniciací zánětlivých procesů ovlivněním imunitních buněk a umožňují sebeobranu vůči konkurenčním mikroflórám. Sekrece lipáz umožňuje *C. parapsilosis* bezpečně překonat fagocytózu a následné přežití uvnitř makrofágů.

*C. parapsilosis* má dva geny, které kódují lipázy, a to *CpLIP1, CpLIP2*. Je však dokázáno, že inhibitory enzymů kódovaných těmito geny významně snižují virulenci, dochází například k produkci tenčích a méně složitých biofilmů, snižuje se poškození tkáně u pacientů nakažených *C. parapsilosis* a také je tento patogen snadněji zachycen a usmrcen v makrofázích [15; 40].

### 4.1.8 Fosfolipázy

Fosfolipázy jsou enzymy, které jsou schopné hydrolyzovat jednu nebo více esterových vazeb ve glycerofosfolipidech, tím usnadňují invazi patogenu na hostitelský mukózní epitel a také se předpokládá, že se podílejí na rozrušení membrán hostitelských buněk. *C. metapsilosis* ani *C. orthopsilosis* nejsou schopné produkovat fosfolipázy [39].

### 4.1.9 Biofilm

Jedním z nejdůležitějších faktorů virulence je tvorba biofilmů. Biofilmy jsou specifické a organizované komunity buněk, toto seskupení buněk přináší významnou odolnost proti antimykotické terapii a chrání buňky před hostitelskými imunitními reakcemi.

Tvorbě biofilmu předchází přilnutí buněk k povrchům zdravotnických prostředků (například centrálních a periferních katétrů, hemodialýzy, intrakardiálních protetických prostředků, protetických kloubů a jiných) k tomu napomáhá hydrofobnost povrchu buněk. Nebo také přilnavost ke tkáním, což může pravděpodobně vést ke změně morfologie a chování organismů.

*C. parapsilosis* produkuje méně složitý biofilm, než *C. albicans*. Biofilm tvořený *C. parapsilosis* neobsahuje pravé hyfy, je tvořen pouze z kvasinkové

formy a pseudohyfální formy, tato forma tvoří agresivnější biofilm. Biofilm *C. parapsilosis* obsahuje velké množství sacharidů a malé množství bílkovin, v porovnání s ostatními kandidami [9; 15; 10].

## 4.2 Rozdíly ve faktorech virulence

*C. metapsilosis* na rozdíl od *C. parapsilosis* a *C. orthopsilosis* nevytváří pseudohyfy, to také souvisí s její menší virulencí. Tvorba pseudohyf je spojena s produkcí dvou skupin proteinů: proteiny buněčné stěny Hyr/Iff a glykoproteiny na povrchu buněk.

Sekretované lipázy hrají, jak už bylo zmíněné výše, také důležitou roli ve virulenci. Dřívější zprávy poukazovaly na to, že *C. metapsilosis* nedokáže produkovat extracelulární lipázy. A to mohl být jeden z důvodů fylogenetické odlišnosti mezi druhy tohoto komplexu, později se však ukázalo, že *C. metapsilosis* má genom, který skutečně kóduje podobný počet sekretovaných lipáz jako *C. parapsilosis* a *C. orthopsilosis*. Tahle skutečnost naznačuje, že fenotypové rozdíly mohou být způsobeny rozdílnou regulací lipázové aktivity spíše než vlastní schopností sekretované lipázy produkovat.

Aktivita sekretovaných aspartátových proteáz (SAP) byla prokázána jak u *C. albicans* tak i u *C. parapsilosis*, zajímavé je, že *C. metapsilosis a C. parapsilosis* mají kodovaných více sekretovaných aspartátových proteáz než *C. orthopsilosis* [26].

# Závěr

Existuje více než 20 druhů kandid, které mohou způsobovat infekce u lidí. Od 80. let 20. století se zvyšoval počet pacientů s kandidózou. *Candida parapsilosis* byla v letech 1997-2005 až čtvrtou kandidou způsobující infekce u lidí, v posledních letech se však stává stále častějším původcem kandidózy, dokonce v některých státech Jižní Ameriky je nejčastěji izolovanou kandidou.

Identifikaci kandid značně zjednodušují molekulárně-biologické metody, které dokáží rozpoznat fenotypové i genotypové vlastnosti a rozlišit tak i sebemenší rozdíly na úrovni jednoho biologického druhu. Jak se stalo i v případě komplexu *Candida parapsilosis*, kdy se pomocí těchto metod přišlo na vysokou heterogennost tohoto komplexu. Na jejímž základě byl tento komplex rozdělen na tři samostatné druhy. Skutečnost, že byly takto objeveny nové druhy patogenních kvasinek, může vést až k potřebě znovu analyzovat, případně nově definovat i další druhy.

# 5 Použitá literatura


[1] **NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ.** *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.

[2] **SILVA, Sónia, Melyssa NEGRI, Mariana HENRIQUES, Rosário OLIVEIRA, David WILLIAMS a Joana AZEREDO**. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2012, **36**(2), 288-305 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x

[3] **THOMPSON, Delma, Patricia CARLISLE a David KADOSH.** Coevolution of Morphology and Virulence in Candida Species. *Eukaryotic Cell* [online]. 2011, **10**(9), 1173-1182 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1128/EC.05085-11. ISSN 1535-9778. Dostupné z: http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.05085-11

[4] **BUTLER, Geraldine, Matthew RASMUSSEN, Michael LIN et al.** Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes. *Nature* [online]. 2009, **459**(7247), 657-662 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1038/nature08064. ISSN 0028-0836. Dostupné z: http://www.nature.com/articles/nature08064

[5] **MIRANDA, Isabel, Ana SILVA-DIAS, Rita ROCHA et al.** Candida albicans CUG Mistranslation Is a Mechanism To Create Cell Surface Variation. *MBio* [online]. 2013, **4**(4), 00285-13 [cit. 2019-05-23]. DOI: 10.1128/mBio.00285-13. ISSN 2150-7511. Dostupné z: https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00285-13

[6] **GABALDÓN, Toni, Miguel NARANJO-ORTÍZ, Marina MARCET-HOUBEN a Carol MUNRO.** Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina. *FEMS Yeast Research* [online]. 2016, **16**(6) [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1093/femsyr/fow064. ISSN 1567-1364. Dostupné z: https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fow064

[7] **MARCET-HOUBEN, Marina, Toni GABALDÓN a Laurence HURST.** Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage. *PLOS Biology* [online]. 2015,

**13**(8) [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002220. ISSN 1545-7885. Dostupné z: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002220

[8] **WOLFE, Kenneth, David ARMISÉN, Estelle PROUX-WERA, Seán ÓHÉIGEARTAIGH, Haleema AZAM, Jonathan GORDON, Kevin BYRNE a Jens NIELSEN.** Clade- and species-specific features of genome evolution in the Saccharomycetaceae. *FEMS Yeast Research* [online]. 2015, **15**(5) [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1093/femsyr/fov035. ISSN 1567-1364. Dostupné z: https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fov035

[9] **SILVA, Sónia, Mariana HENRIQUES, António MARTINS, Rosário OLIVEIRA, David WILLIAMS a Joana AZEREDO.** Biofilms of non- Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology* [online]. 2009, **47**(7), 681-689 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.3109/13693780802549594. ISSN 1369-3786. Dostupné z: https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.3109/13693780802549594

[10] **MENDES GIANNINI, M., T. BERNARDI, L. SCORZONI, A. FUSCO-ALMEIDA a J. SARDI.** Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2013, **62**(1), 10-24 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1099/jmm.0.045054-0. ISSN 0022-2615. Dostupné z: http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.045054-0

[11] **GUINEA, J.** Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2014, **20**(6), 5-10 [cit. 2019-06-02]. DOI: 10.1111/1469-0691.12539. ISSN 1198743X. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14603268

[12] **PAMMI, Mohan, Linda HOLLAND, Geraldine BUTLER, Attila GACSER a Joseph M. BLISS.** Candida parapsilosis Is a Significant Neonatal Pathogen. *The Pediatric Infectious Disease Journal* [online]. 2013, **32**(5), 206-216 [cit. 2019-06-02]. DOI: 10.1097/INF.0b013e3182863a1c. ISSN 0891-3668. Dostupné z: https://insights.ovid.com/crossref?an=00006454-201305000-00044

[13] **CASADEVALL, Arturo, Liise-anne PIROFSKI a H. ANDREWS-POLYMENIS.** What Is a Host? Incorporating the Microbiota into the Damage-Response Framework: TABLE 1. *Infection and Immunity* [online]. 2014, **83**(1), 2-7 [cit. 2019-03-

05]. DOI: 10.1128/IAI.02627-14. ISSN 0019-9567. Dostupné z: http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.02627-14

[14] **WU, A., E. GRELA, K. WÓJTOWICZ et al.** ABCA1 transporter reduces amphotericin B cytotoxicity in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2019, **18**(1-24), 31-54 [cit. 2019-06-02]. DOI: 10.1007/s00018-019-03154-w. ISSN 1420-682X. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00018-019-03154-w

[15] **TROFA, D., A. GACSER a J. NOSANCHUK.** Candida parapsilosis, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2008, **21**(4), 606-625 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1128/CMR.00013-08. ISSN 0893-8512. Dostupné z: http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00013-08

[16] **SHEEHAN, Daniel J., Christopher A. HITCHCOCK a Carol M. SIBLEY.** Current and Emerging Azole Antifungal Agents. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, **12**(1), 40-79 [cit. 2019-06-02]. DOI: 10.1128/CMR.12.1.40. ISSN 0893-8512. Dostupné z: http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.12.1.40

[17] **TÓTH, Renáta, Jozef NOSEK, Héctor M. MORA-MONTES et al.** Candida parapsilosis: from Genes to the Bedside. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2019, **32**(2), 00111-18 [cit. 2019-05-30]. DOI: 10.1128/CMR.00111-18. ISSN 0893-8512. Dostupné z: http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.00111-18

[18] **POULAIN, Daniel.** Candida albicans , plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2013, **41**(2), 208-217 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.3109/1040841X.2013.813904. ISSN 1040-841X. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2013.813904

[19] **RODRIGUES, Célia a Mariana HENRIQUES.** Portrait of Matrix Gene Expression in Candida glabrata Biofilms with Stress Induced by Different Drugs. *Genes* [online]. 2018, **9**(4) [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.3390/genes9040205. ISSN 2073-4425. Dostupné z: http://www.mdpi.com/2073-4425/9/4/205

[20] **ABI-CHACRA, Érika, Lucieri SOUZA, Lucas CRUZ et al.** Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the Candida parapsilosis complex. *FEMS Yeast Research* [online]. 2013, **13**(8), 831-848 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1111/1567-1364.12092. ISSN 15671356. Dostupné z: https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/1567-1364.12092

[21] **CANTÓN, Emilia, Javier PEMÁN, Guillermo QUINDÓS et al.** Prospective Multicenter Study of the Epidemiology, Molecular Identification, and Antifungal Susceptibility of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis Isolated from Patients with Candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2011, **55**(12), 5590-5596 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1128/AAC.00466-11. ISSN 0066-4804. Dostupné z: http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00466-11

[22] **KIM, S.-K.** Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen Candida parapsilosis. *Microbiology* [online]. 2006, **152**(10), 2885-2894 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1099/mic.0.29180-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.29180-0

[23] **LIN, D., L.C. WU, M.G. RINALDI a P.F. LEHMANN.** Three distinct genotypes within Candida parapsilosis from clinical sources. *Journal of clinical microbiology* [online]. 1995, **33**(7), 1815-21 [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665651

[24] **TAVANTI, A., A. DAVIDSON, N. GOW, M. MAIDEN a F. ODDS.** Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. To Replace Candida parapsilosis Groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2005, **43**(1), 284-292 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1128/JCM.43.1.284-292.2005. ISSN 0095-1137. Dostupné z: http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005

[25] **GAGO, Sara, Rocío GARCÍA-RODAS, Isabel CUESTA, Emilia MELLADO a Ana ALASTRUEY-IZQUIERDO.** Candida parapsilosis , Candida orthopsilosis , and Candida metapsilosis virulence in the non-conventional host Galleria mellonella. *Virulence* [online]. 2014, **5**(2), 278-285 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.4161/viru.26973. ISSN 2150-5594. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.26973

[26] **PRYSZCZ, Leszek, Tibor NÉMETH, Ester SAUS et al.** The Genomic Aftermath of Hybridization in the Opportunistic Pathogen Candida metapsilosis. *PLOS Genetics* [online]. 2015, **11**(10) [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005626. ISSN 1553-7404. Dostupné z: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005626

[27] **PRYSZCZ, Leszek, Tibor NÉMETH, Attila GÁCSER a Toni GABALDÓN.** Genome Comparison of Candida orthopsilosis Clinical Strains Reveals the Existence of Hybrids between Two Distinct Subspecies. *Genome Biology and Evolution* [online]. 2014,

**6**(5), 1069-1078 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1093/gbe/evu082. ISSN 1759-6653. Dostupné z: https://academic.oup.com/gbe/article-lookup/doi/10.1093/gbe/evu082

[28] **SVOBODOVÁ, MDDr.** *Diferenciace lékařsky významných kvasinek druhu Candida pelliculosa, Candida utilis a Candida fabianii*. Olomouc, 2016. Doktorská dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Doc. MUDr. Petra Hamala, Ph.D.

[29] **HAMAL, P., B. JANDOVÁ a K. MENCL.** Identifikace kvasinek z klinického materiálu.: Přehled současných možností se zaměřením na fenotypové metody a komerční produkty. *Postgrad Med.* 2010, **2010**(5), 64-70.

[30] **RACLAVSKÝ, Vladislav.** *Úvod do základních metod molekulární genetiky*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého, 1998, 34-38 s. ISBN 80-706-7892-5.

[31] **CAROLIS, E., L. HENSGENS, A. VELLA, B. POSTERARO, M. SANGUINETTI, S. SENESI a A. TAVANTI.** Identification and typing of the Candida parapsilosis complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Medical Mycology* [online]. 2014, **52**(2), 123-130 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1093/mmy/myt009. ISSN 1369-3786. Dostupné z: https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1093/mmy/myt009

[32] **KOSA, P.** Complete DNA sequences of the mitochondrial genomes of the pathogenic yeasts Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis: insight into the evolution of linear DNA genomes from mitochondrial telomere mutants. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(8), 2472-2481 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1093/nar/gkl327. ISSN 0305-1048. Dostupné z: https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl327

[33] **RYCOVSKA, A.** Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in Candida parapsilosis. *Microbiology* [online]. 2004, **150**(5), 1571-1580 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1099/mic.0.26988-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26988-0

[34] **MIYAKAWA, I., A. OKAMURO, S. KINSKY, K. VISACKA, L. TOMASKA a J. NOSEK.** Mitochondrial nucleoids from the yeast Candida parapsilosis: expansion of the repertoire of proteins associated with mitochondrial DNA. *Microbiology* [online]. 2009, **155**(5), 1558-1568 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1099/mic.0.027474-0. ISSN

1350-0872. Dostupné z: http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.027474-0

[35] **HOLESOVA, Z., M. JAKUBKOVA, I. ZAVADIAKOVA, I. ZEMAN, L. TOMASKA a J. NOSEK.** Gentisate and 3-oxoadipate pathways in the yeast Candida parapsilosis: identification and functional analysis of the genes coding for 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase and 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase. *Microbiology* [online]. 2011, **157**(7), 2152-2163 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1099/mic.0.048215-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.048215-0

[36] **CILLINGOVÁ, Andrea, Igor ZEMAN, Renáta TÓTH et al.** Eukaryotic transporters for hydroxyderivatives of benzoic acid. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 2045-2322 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1038/s41598-017-09408-6. Dostupné z: http://www.nature.com/articles/s41598-017-09408-6

[37] **ZEMAN, Igor, Martina NEBOHÁČOVÁ, Gabriela GÉRECOVÁ et al.** Mitochondrial Carriers Link the Catabolism of Hydroxyaromatic Compounds to the Central Metabolism in Candida parapsilosis. *G3* [online]. 2016, **6**(12), 4047-4058 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1534/g3.116.034389. ISSN 2160-1836. Dostupné z: http://g3journal.org/lookup/doi/10.1534/g3.116.034389

[38] **VINTEROVÁ, Zuzana, Miloslav ŠANDA, Jiří DOSTÁL, Olga HRUŠKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ a Iva PICHOVÁ.** Evidence for the presence of proteolytically active secreted aspartic proteinase 1 of Candida parapsilosis in the cell wall. *Protein Science* [online]. 2011, **20**(12), 2004-2012 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1002/pro.744. ISSN 09618368. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/pro.744

[39] **NEJI, Sourour, Ines HADRICH, Houaida TRABELSI, Salma ABBES, Fatma CHEIKHROUHOU, Hayet SELLAMI, Fattouma MAKNI a Ali AYADI.** Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among Candida parapsilosis complex isolates recovered from clinical specimens. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2017, **24**(1), 67 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1186/s12929-017-0376-2. ISSN 1423-0127. Dostupné z: https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-017-0376-2

[40] **TÓTH, Adél, Tibor NÉMETH, Katalin CSONKA, Péter HORVÁTH, Csaba VÁGVÖLGYI, Csaba VIZLER, Joshua D NOSANCHUK a Attila GÁCSER.** Secreted Candida parapsilosis lipase modulates the immune response of primary human

macrophages. *Virulence* [online]. 2014, **5**(4), 555-562 [cit. 2019-06-11]. DOI: 10.4161/viru.28509. ISSN 2150-5594. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.28509

[41] **LAFFEY, S.** Phenotype switching affects biofilm formation by Candida parapsilosis. *Microbiology* [online]. 2005, **151**(4), 1073-1081 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1099/mic.0.27739-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27739-0