

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Tereza Šeredová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Virulenční vlastnosti *Candida lusitaniae*
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Šeredová**
Osobní číslo: **C21226**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Virulenční vlastnosti *Candida lusitaniae***
Téma práce anglicky: **Virulence Properties of *Candida lusitaniae***
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. V úvodu práce se věnujte obecné charakteristice kvasinek. Zaměřte se na významné kvasinky s patogenním potenciálem.
2. Zpracujte literární rešerši o *Candida lusitaniae* se zaměřením na dominantní faktory virulence a patogenní potenciál tohoto agens.
3. Shrňte poznatky o klinických případech onemocnění způsobených *Candida lusitaniae* a také o možnostech laboratorní diagnostiky.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem **Virulenční vlastnosti *Candida lusitaniae*** 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 § 47b 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 Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. 5. 2024

Tereza Šeredová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala panu doc. Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D., za cenné rady, velkou ochotu, pomoc a odborné vedení při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala svým blízkým, především rodině a přátelům, za jejich obrovskou podporu.

ANOTACE

Tato bakalářská práce pojednává o virulenčních vlastnostech *Candida lusitaniae* v souvislosti s patogenezí této kvasinky. V bakalářské práci jsou shrnuty obecné informace o kvasinkách se zaměřením na klinicky významné kvasinky, dále také informace o nově vznikajícím oportunním patogenu *Candida lusitaniae* a možnostech její diagnostiky. Práce rovněž detailně popisuje faktory virulence této kvasinky. Studie je také zaměřena na onemocnění v souvislosti s kvasinkou *Candida lusitaniae* a možnosti léčby i prevence.

KLÍČOVÁ SLOVA

kvasinky; *Candida lusitaniae*; virulence; virulenční faktory; biofilm; antimykotika; rezistence; oportunní patogen; kandidóza

TITLE

Virulence properties of *Candida lusitaniae*

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the virulence properties of *Candida lusitaniae* in relation to the pathogenesis of this yeast. The bachelor thesis summarizes general information on yeasts with a focus on clinically important yeasts, as well as information on the emerging opportunistic pathogen *Candida lusitaniae* and its diagnostic possibilities. The thesis also describes in detail the virulence factors of this yeast. The study also focuses on the diseases associated with *Candida lusitaniae* and the possibilities of treatment and prevention.

KEYWORDS

yeast; *Candida lusitaniae*; virulence; virulence factors; biofilm; antifungals; resistance; opportunistic pathogen; candidiasis

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
TERMINOLOGIE	13
ÚVOD	15
1. Kvasinky	16
1.1. Historie kvasinek	16
1.2. Obecná charakteristika kvasinek	16
1.3. Klinicky významné kvasinky.....	18
1.3.1. Rod <i>Cryptococcus</i>	19
1.3.2. Rod <i>Trichosporon</i>	20
1.3.3. Rod <i>Malassezia</i>	21
1.3.4. Rod <i>Rhodotorula</i>	22
1.3.5. Rod <i>Candida</i>	23
2. <i>Candida lusitaniae</i>	27
2.1. Morfologie a rozmnožování <i>Candida lusitaniae</i>	27
2.2. Metabolismus.....	30
2.3. Výskyt a klinické dopady	30
2.4. Metody identifikace kvasinky <i>Candida lusitaniae</i>	31
2.4.1. Fenotypové metody.....	31
2.4.2. Molekulárně-biologické a další metody	34
2.5. Rezistence <i>Candida lusitaniae</i> k antimykotikům	36
2.5.1. Testování citlivosti k antimykotikům	40
3. Virulenční vlastnosti <i>Candida lusitaniae</i>	42
3.1. Mechanismus adheze	42
3.2. Mechanismus invaze	43
3.3. Dimorfismus kvasinek	44
3.4. Fenotypová variabilita	45
3.5. Hydrofobicita buněčné stěny	45

3.6.	Produkce hydrolytických enzymů	46
3.6.1.	Lipázy	46
3.6.2.	Fosfolipázy.....	47
3.6.3.	Sekretované aspartylproteázy	47
3.7.	Tvorba biofilmu	48
3.8.	Termotolerance	50
3.9.	Únik před reakcí imunitního systému	51
4.	Onemocnění v souvislosti s kvasinkou <i>Candida lusitaniae</i>	53
4.1.	Orální kandidóza	53
4.2.	Infekce močových cest v souvislosti s kvasinkou <i>Candida lusitaniae</i>	54
4.3.	Kandidémie	56
4.4.	Empyém plic v souvislosti s kvasinkou <i>Candida lusitaniae</i>	56
4.5.	Peritonitida v souvislosti s kvasinkou <i>Candida lusitaniae</i>	58
5.	ZÁVĚR	60
	POUŽITÁ LITERATURA	62

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 Nárůst <i>Cryptococcus</i> na krevním agaru	19
Obrázek 2 Hypochromní <i>tinea versicolor</i>	22
Obrázek 3 Pseudomembranózní kandidóza	26
Obrázek 4 Pseudohyfy <i>Candida lusitaniae</i>	28
Obrázek 5 <i>Candida lusitaniae</i> na Sabouradově agaru	32
Obrázek 6 <i>Candida lusitaniae</i> v preparátu obarveném dle Grama	32
Obrázek 7 <i>Candida lusitaniae</i> na CHROMagaru.....	33
Obrázek 8 Schématické znázornění procesu identifikace pomocí MALDI-TOF MS	36
Obrázek 9 Mechanismy rezistence <i>Candida lusitaniae</i> k antimykotikům	39
Obrázek 10 Ukázka vyhodnocení MIC amfotericinu B <i>Candida lusitaniae</i> pomocí E-testu	41
Obrázek 11 Schématické znázornění tvorby biofilmu	48
Obrázek 12 CT hrudníku prokazující pravostranný pleurální výpotek	57

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AFLP	Polymorfismus délky amplifikačního fragmentu (<i>z angl. Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity (<i>z angl. Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
ALS	Sekvence podobná aglutininu (<i>z angl. Agglutinin-Like Sequence</i>)
AmB	Amfotericin B (<i>z angl. Amphotericin B</i>)
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
DDT	Diskový difuzní test (<i>z angl. Disc Diffusion Test</i>)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (<i>z angl. DeoxyriboNucleic Acid</i>)
Ecm33	Adhezní protein kódovaný genem ECM33
EPS	Extracelulární polymerní substance (<i>z angl. Extracellular Polymeric Substances</i>)
ERG11	Gen kódující enzym 14 α -demethylazu
ERG3	Gen kódující enzym sterol Δ 5,6-desaturazu
HIV	Virus lidské imunodeficiency (<i>z angl. Human Immunodeficiency Virus</i>)
Hsp	Proteiny tepelného šoku (<i>z angl. Heat shock protein</i>)
Iff4	Adhezní protein kódovaný genem IFF4
MALDI-TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí/ionizací za přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem (<i>z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight, Mass Spektrometry</i>)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (<i>z angl. Minimum Inhibitory Concentration</i>)
Mp65	Adhezní manoprotein kódovaný genem MP65 (<i>z angl. Adhesin manoprotein encoded by the MP65 gene</i>)
OC	Orální kandidóza (<i>z angl. Oral Candidiasis</i>)
PAMP	Molekulární vzor spojený s patogenem (<i>z angl. Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (<i>z angl. Polymerase Chain Reaction</i>)
PNA FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s peptidovými nukleovými kyselinami (<i>z angl. Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization</i>)

PRR	Receptory pro rozpoznání vzoru (z angl. P attern R ecognition R eceptors)
Real-time PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z <i>angl.</i> R eal- T ime P olymerase C hain R eaction)
Saps	Sekretované aspartylproteázy (z <i>angl.</i> S ecreted A spartyl P roteases)
UTI	Infekce močových cest (z <i>angl.</i> U rinary T ract I nfections)
VVC	Vulvovaginální kandidóza (z <i>angl.</i> V ulvovaginal C andidiasis)

TERMINOLOGIE

abiotický	neživý (vztahující se k neživé, anorganické složce)
adheze	přilnutí, přichycení
akumulace	hromadění, shromažďování
amplifikace	zmnožení, nárůst
biotický	živý (vztahující se k živým organismům a jejich působení)
difúze	samovolného rozptylování částic v prostoru
diseminace	rozšíření nebo rozsev
empyém	hnisavý proces v tělní dutině
epitel	specializovaná tkáň pokrývající povrch těla a vnitřní povrchy orgánů
extracelulární matrix	mezibuněčná hmota (složka tkání obklopující buňky)
gastrointestinální trakt	trávicí soustava
imunokompromitovaný	mající poškozený či oslabený imunitní systém
imunosuprese	potlačení imunitní odpovědi (útlum činnosti imunitního systému)
komezál	druh žijící v asociaci s hostitelem, aniž by mu způsoboval škodu
kultivace	pěstování nebo množení živých organismů za kontrolovaných podmínek v laboratoři
meningitida	zánět mozkových blan
morbidita	nemocnost, výskyt onemocnění
mortalita	úmrtnost
nozokomiální	nemocniční (získaný v nemocničním prostředí)
obstrukce	neprůchodnost, uzávěr, zablokování
oportunní patogen	mikroorganismus vyvolávající onemocnění u hostitele s významnou poruchou imunity
patogen	mikroorganismus způsobující nemoci nebo infekci
patogeneze	proces, kterým mikroorganismy nebo jiné patogenní faktory způsobují vznik a vývoj nemoci v hostiteli
perforace	průchod, protržení
peritonitida	zánět pobřišnice
planktonická buňka	volně se vznášející buňka (nikoliv usazená)
predispozice	sklon nebo náchylnost k určitému stavu nebo onemocnění
reflux	zpětný tok tekutiny

seps	rozšíření infekce krví do celého organismu
soor	kvasinková infekce sliznic nejčastěji u dětí
stagnace	zadržení tekutiny
symbióza	vztah, ve kterém dva organismy žijí společně a vzájemně si prospívají
syntéza	proces vytváření nových látek nebo molekul z jednodušších složek
urogenitální trakt	system orgánů zahrnující močové a pohlavní orgány
virulence	míra nebo schopnost mikroorganismů způsobit onemocnění
vulvovaginální kandidóza	kvasinková infekce postihující ženské genitálie
výpotek	tekutina nebo sekret vylučovaný z těla

ÚVOD

Kvasinky jsou rozšířenou skupinou mikroorganismů, které se přirozeně vyskytují ve vodě, půdě, vzduchu a na rostlinách. Jsou však také součástí lidské mikroflóry a potravinářských produktů. Ačkoliv mnohé kvasinky mají prospěšné využití, některé druhy jsou oportunními patogeny a mohou způsobovat závažná onemocnění, a to zejména u osob s oslabenou imunitou. V tomto ohledu zaujímá významné postavení rod *Candida*, který představuje jednu z nejvýznamnějších příčin mykotických infekcí obecně označovaných jako kandidózy. Patogenní potenciál kvasinek je podmíněn souborem virulentních faktorů, které jim umožňují přežívat a množit se v hostitelském organismu, narušovat obranné mechanismy a způsobovat klinické projevy onemocnění. Přestože druhem úzce spojeným s klinickými projevy je *Candida albicans*, v posledních desetiletích dochází k nárůstu infekcí způsobených tzv. non-albicans druhy, jako je např. *Candida lusitaniae*. Tento méně prozkoumaný druh kvasinek upoutává zvýšenou pozornost vědců, především kvůli svým specifickým virulenčním vlastnostem a přirozenou rezistencí vůči určitým běžně používaným antimykotikům.

Cílem mé bakalářské práce je poskytnout komplexní přehled doposud známých virulenčních vlastností kvasinky *Candida lusitaniae* a zhodnotit její patogenní potenciál v kontextu humánních infekcí. V této práci jsou popsány obecné vlastnosti klinicky významných kvasinek se zaměřením na rod *Candida*. Detailně se práce zaměřuje na kvasinku *Candida lusitaniae*, její morfologii, rozmnožování a metabolismus. Dále je zde kladen velký důraz na přehled doposud známých virulenčních vlastností této kvasinky. Zmíněny jsou také možné metody diagnostiky a identifikace *C. lusitaniae*. Závěrem se práce zabývá možnými onemocněními v souvislosti s touto oportunně patogenní kvasinkou a možnostmi jejich prevence a léčby.

1. Kvasinky

1.1. Historie kvasinek

První zmínky o praktickém využití kvasinek byly zaznamenány již v dávné minulosti. Antoni van Leeuwenhoek, vynálezce prvního mikroskopu, pozoroval kvasinky poprvé ve vzorku kvasícího piva. Avšak v té době byly tyto oválné mikroorganismy považovány za neživé škrobové částice (Davis, 2020). Později se kvasinkami a kvasnými mechanismy začali zabývat další vědci jako Charles Cagniard-Latour, Friedrich Kützing a Theodor Schwann. Všichni dospěli k závěru, že kvasinky jsou živé organismy schopné fermentace (Barnett, 1998). V roce 1857 provedl Louis Pasteur sérii experimentů prokazující vlastní podstatu fermentace. Louis Pasteur také zkoumal proces kvasinkové fermentace a jeho vliv na výrobu vína i piva. Experimentálně dokázal, že kvasinky jsou živé organismy, které při fermentaci přeměňují cukry na alkohol a další produkty. Přispěl také k popsání specifických druhů kvasinek a pochopení jejich vlivu na kvalitu a chuť výsledných produktů i zlepšení procesů fermentace (Barnett, 2000; Davis, 2020).

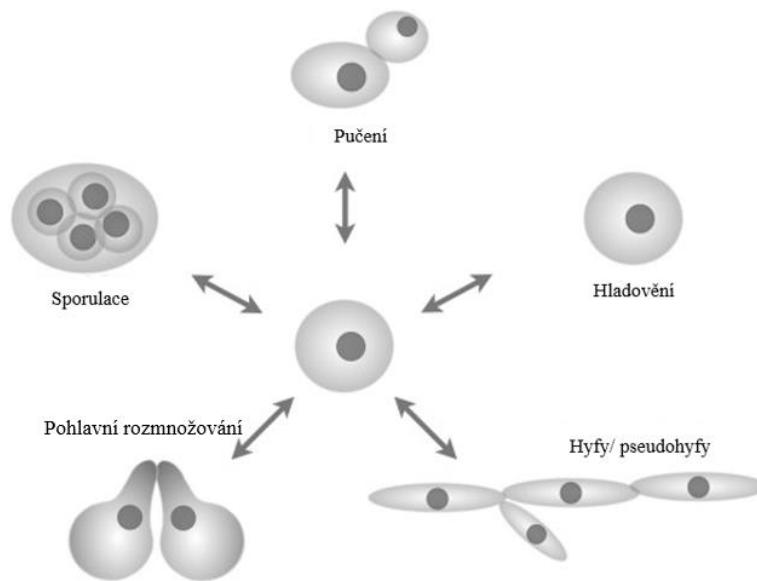
1.2. Obecná charakteristika kvasinek

Kvasinky řadíme mezi jednobuněčné eukaryotické mikroorganismy, které spadají do říše hub (Hocking a Pitt, 2022). Kvasinkové buňky mají schopnost vytvářet izolované kolonie nebo biofilmové struktury, jež jsou často pozorovatelné při humánních infekcích (Kundrát a Kvasničková, 2015). Buňky kvasinek mohou mít různý tvar, a to kulovitý až po protáhlý. Velikost těchto buněk závisí na konkrétním druhu, typicky se však pohybuje v rozmezí 2–5 μm . Tyto mikroorganismy jsou považovány za fakultativní anaeroby (přežívají jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti kyslíku). Kvasinky produkují a uvolňují enzymy (proteolytické, glykolytické a lipolytické), které umožňují rozklad organických látek a získávání živin. Kvasinky se spoléhají na oxidativní metabolismus, skrze který získávají energii aerobní metabolizací sacharidů (Hocking a Pitt, 2022; Shurson, 2018).

Kvasinky se vzhledem k jejich krátké generační době rychle rozmnožují. U některých druhů kvasinek může být generační doba pouze několik hodin. V populaci kvasinek se vyskytují dva typy buněk, a to buňky haploidní a diploidní. Haploidní kvasinkové buňky mají v jádře jedinou sadu homologních chromozomů. Diploidní kvasinkové buňky jsou složeny naopak ze dvou sad homologních chromozomů. Kvasinky se jako jednobuněčné organismy množí nepohlavně, ale

i pohlavně (Obrázek1) (Knop, 2011; Shurson, 2018). **Nepohlavní rozmnožování** kvasinek probíhá převážně pučením či dělením. Během pučení nastává standardní buněčné dělení (mateřské jádro se mitoticky rozdělí na dvě jádra dceřiná). Počet chromozomů v dceřiných jádrech zůstává podobný jako u mateřského jádra (Knop, 2011). V průběhu pučení se dceřiná buňka nejprve projevuje jako malý výrůstek. Tento typ pučení se označuje jako asymetrické pučení (vzniklá struktura připomíná pupen) (Shurson, 2018). Pučení může nastat jak u haploidních, tak i diploidních buněk. Z haploidních mateřských buněk vznikají haploidní dceřiné buňky, zatímco z diploidních mateřských buněk vznikají diploidní dceřiné buňky (Knop, 2011; Shurson, 2018).

Kvasinky jsou též schopné **pohlavního rozmnožování**. Při pohlavním rozmnožování vytvářejí kvasinky pohlavní spory. Během tohoto rozmnožovacího procesu dochází ke spojení dvou haploidních buněk (gamet). Po spojení buněk a jader vzniká diploidní buňka (zygota). V zygotě se diploidní jádro dělí meiózou a výsledkem jsou čtyři haploidní jádra. Tato haploidní jádra slouží následně jako základ pohlavních spor (Huraiiova *et al.*, 2018; Sieber *et al.*, 2023).



Obrázek 1 Možnosti vývoje kvasinek (upraveno dle Knop, 2011)

Některé kvasinky mají schopnost morfogenního přechodu mezi jednobuněčným, pseudohyfálním nebo hyfálním růstem (Obrázek 1). Tato změna se nazývá dimorfismus a je obvykle vyvolána nepříznivými podmínkami prostředí (pH, teplota, přítomnost stresových podmínek, nedostatek živin). Dimorfní přechod může být postupný a může generovat širokou škálu tvarů buněk, z nichž každý je specifickou odezvou na prostředí, v němž se buňky

nacházejí (Knop, 2011; Thompson *et al.*, 2011). V optimálních podmínkách mohou kvasinky růst jako **jednobuněčné organismy**. Buňky v těchto podmínkách jednoduše pučí a vytvářejí nové jednotlivé buňky. **Pseudohyální buňky** jsou elipsoidní, vytvářejí řetězce výrazně prodloužených buněk zúžených v místech septálních spojů. Při dělení pseudohyf dochází k postupnému prodlužování řetězce buněk. Dělení jádra a tvorba přepážkového prstence jsou pro tento proces zcela charakteristické. Pseudohyfy se neoddělují jako samostatné buňky, ale zůstávají spojené ve formě řetězce. Tento typ růstu umožňuje kvasinkám hledat živiny a substráty ve větší vzdálenosti od jejich původního místa kolonizace (Knop, 2011; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). **Hyfy** se skládají z několika buněk spojených dohromady, mají jednotnou šířku a pravá septa bez zúžení v septálních spojích. Každá hyfa může obsahovat více jader v cytoplazmě (Knop, 2011). Při dělení hyf dochází k postupnému prodlužování a růstu vlákna. Během tohoto procesu dochází k dělení buněk ve vlákne a vytváření nových buněk. Septa v hyfách mohou obsahovat póry umožňující komunikaci a přenos látek mezi buňkami. Mezi kvasinky s vlastnostmi morfogenního přechodu patří široká škála patogenů (*Candida albicans*), avšak také kvasinky nepatogenní (*Saccharomyces cerevisiae*) (Thompson *et al.*, 2011).

Kvasinky mají široké uplatnění jako modelové organismy ve výzkumu eukaryotických buněk, protože poskytují cenné poznatky o základních buněčných procesech. Dobře popsaná genetika, druhová pestrost, krátká generační doba a relativně snadná genová manipulace je činí ideálními buňkami pro výzkumné účely. Výzkum kvasinek též přispěl k pochopení různých oblastí biologie, jako je replikace DNA, buněčné dělení, genová exprese nebo funkce proteinů (Park *et al.*, 2023).

Existuje asi 60 různých rodů kvasinek, které se dále rozdělují do více než 500 různých druhů. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* a *Candida utilis* jsou využitelné především v průmyslu. Mezi patogenní kvasinky řadíme např. rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis* a *Trichosporon* (Shurson, 2018). Mnoho druhů kvasinek je tolerantní vůči kyselému prostředí stejně jako vláknité houby. Některé druhy jsou dokonce velmi odolné vůči slunečnímu záření a vysychání, což jim umožňuje dlouhodobější výskyt v přírodě, na površích listů, ovoce a zeleniny (Hocking a Pitt, 2022; Shurson, 2018).

1.3. Klinicky významné kvasinky

Kvasinky jsou běžnou součástí lidského mikrobiomu dutiny ústní, kůže, tlustého střeva a urogenitálního traktu. Mnohé kvasinky patří mezi oportunní patogeny s potenciálem vyvolat onemocnění u jedinců s oslabenou imunitou (Kundrát a Kvasničková, 2015). Jako klinicky

významné kvasinky se označují především kvasinky rodu *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Malassezia* a *Rhodotorula* (Shurson, 2018). Toto jsou jen některé z klinicky významných rodů kvasinek. Každý z uvedených rodů obsahuje různé druhy, které mají odlišné vlastnosti a mohou způsobovat specifické typy infekcí (Kundrát a Kvasničková, 2015).

1.3.1. Rod *Cryptococcus*

Rod *Cryptococcus* zahrnuje asi 70 druhů kvasinek. Jedná se o opouzdřené bazidiomycetní (stopkovýtrusné) kvasinky se schopností tvořit melanin (Al-Zubaidy a Shabaa, 2023; Bandalizadeh *et al.*, 2020). Tyto kvasinky získávají energii z organických látek odumřelých organismů nebo jejich částí (saprotrofy). Kvasinky tohoto rodu jsou nejčastěji izolovány z půdy a ptačích exkrementů (např. *Cryptococcus neoformans*). Vyskytují se však i v rostlinných materiálech, dutinách stromů nebo rozkládajícím se dřevě (např. *Cryptococcus gattii*) (Bandalizadeh *et al.*, 2020).

Kryptokoky jsou kvasinky, pro jejichž kultivaci se často využívají agarová média, jako např. Sabouraudův agar, Bird Seed Agar nebo krevní agar. Tato média poskytují vhodné podmínky pro růst a vývoj těchto mikroorganismů. Příkladem může být *Cryptococcus neoformans* na Obrázku 2, který vytváří na krevním agarovém médiu kulaté, lesklé a hladké kolonie bílé nebo krémové barvy (Al-Zubaidy a Shabaa, 2023; Fraser *et al.*, 2023). K posouzení schopnosti produkovat melaninový pigment lze využít methyldopové médium. Schopnost kryptokokových buněk tvořit melanin se projevuje vytvářením hnědých kolonií na tomto specifickém médiu (Al-Zubaidy a Shabaa, 2023).



Obrázek 1 Nárůst *Cryptococcus* na krevním agaru (Bal *et al.*, 2014)

Melanin je pigment, nezbytný pro virulenci kvasinek rodu *Cryptococcus*. Má významnou roli v ochraně kvasinek před oxidačním poškozením kyslíkovými radikály hostitelské buňky. Melanin má dále schopnost vázat běžná antimykotika (flucytosin) a snižovat jejich účinnost. Tento pigment také umožňuje kryptokokům růst v širokém teplotním rozmezí a odolávat ionizujícímu záření (McDonald *et al.*, 2012; Rossi a Zaragoza, 2021). Velkou zvláštností pro rod *Cryptococcus* je polysacharidové pouzdro, které jim poskytuje ochranu před stresovými faktory. Další unikátní schopností těchto kvasinek je vytváření tzv. gigantických buněk. Tyto nadměrně velké buňky již nemohou být pohlceny fagocyty, buňkami imunitního systému zodpovědnými za odstraňování cizorodých částic a mikroorganismů. Úkolem gigantických buněk je tedy chránit kvasinkové buňky *Cryptococcus* před imunitní odpovědí hostitele. Tento proces má důležitou roli při vzniku onemocnění (McDonald *et al.*, 2012). Jelikož jsou tyto kvasinky schopny přežít uvnitř makrofágů, jsou považovány za intracelulární patogeny (Rossi a Zaragoza, 2021). Existují pouze dva potvrzené druhy kryptokoků způsobující humánní onemocnění, a to *Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus gattii* (Bandalizadeh *et al.*, 2020). Tyto dva humánní patogeny mohou způsobit klinické onemocnění nejen u imunokompromitovaných pacientů, ale také imunokompetentních jedinců (Dutra *et al.*, 2018). Infekce způsobená *Cryptococcus neoformans* nebo *Cryptococcus gattii* se nazývá kryptokokóza. Tato infekce vzniká po vdechnutí kvasinek nebo jejich spor. Spory následně klíčí v plicní tkáni hostitele a mohou progredovat do fatální fáze meningocefalidity. Kryptokokóza je globálně považována za mykotické onemocnění s vysokou smrtností, a to zejména u lidí s AIDS (Al-Zubaidy a Shabaa 2023; Ballou a Johnston, 2017).

1.3.2. Rod *Trichosporon*

Rod *Trichosporon* zahrnuje 51 druhů, z nichž pouze 16 druhů je schopno infikovat lidské hostitele. Do tohoto rodu zařazujeme kvasinky podobné stopkovýtusným kvasinkám. Podobně jako jiné dimorfní houby jsou schopny vláknitého růstu, tvořit přepážkové hyfy s hojnými arthrokonidiami a blastokonidiami, což jsou formy reprodukčních struktur (Iturrieta-González *et al.*, 2014). Kvasinky tohoto rodu jsou součástí mikroflóry člověka, a to zejména v oblasti kůže, nehtů, sliznic dýchacího a gastrointestinálního traktu (Iturrieta-González *et al.*, 2014; Kuo *et al.*, 2021). Jelikož jsou hojně rozšířeny také v přírodě, lze je izolovat z vody, půdy, rozkládající se hmoty či z ptačího nebo netopýřího trusu (Kiley *et al.*, 2019; Kuo *et al.*, 2021).

Pro kultivaci *Trichosporon* se často používá Sabouraudův agar s glukózou nebo jiná specifická agarová média. Tato kultivační média jsou bohatá na živiny a podporují růst těchto kvasinek.

Kolonie mohou mít různý tvar, barvu a texturu v závislosti na konkrétním druhu. Na Sabouraudově agaru s glukózou roste *Trichosporon* spp. v podobě krémově zbarvených mukózních kolonií s cerebriformní (podobnost povrchu mozku) strukturou (Tse *et al.*, 2022).

U kvasinek rodu *Trichosporon* je popisována schopnost tvorby biofilmu, díky které jsou výrazně odolnější např. vůči fungicidům (Iturrieta-González *et al.*, 2014). Mezi další typické virulentní faktory patří hemolytická aktivita a produkce mnohých enzymů (proteázy a fosfolipázy). Tyto enzymy zvyšují patogenitu postupným rozkladem proteinů a narušováním membrán hostitelských buněk. Aktivita proteolytických enzymů má význam v patogenitě tím, že usnadňuje invazi degradací keratinu a kolagenu (Iturrieta-González *et al.*, 2014; Kumaravelu, 2021). Kvasinky z rodu *Trichosporon* řadíme mezi oportunní patogeny, často spojovanými s vysokou úmrtností imunokompromitovaných jedinců (Kuo *et al.*, 2021). Tyto kvasinky způsobují onemocnění od neškodné bílé piedry až po mykotické invazivní život ohrožující infekce (Francisco *et al.*, 2019; Kuo *et al.*, 2021). Nejběžnější povrchovou *Trichosporon*ovou infekcí je bílá piedra jejíž původcem je *Trichosporon beigeli*. Toto onemocnění se projevuje tvrdými, bílými až světle hnědými uzlíky, které jsou volně přichyceny k vlasovému stvolu (Kiley *et al.*, 2019).

1.3.3. Rod *Malassezia*

Rod *Malassezia* zahrnuje v současnosti 18 druhů lypofilních kvasinek. Kvasinky rodu *Malassezia* se vyskytují převážně v klasické kvasinkové formě, mohou však přecházet také do hyfálního stádia (Jiang *et al.*, 2023). Kvasinky *Malassezia* se rozmnožují pučením a velmi často žijí v symbióze s teplokrevnými živočichy (Das *et al.*, 2021). Přirozeně se vyskytují na lidské kůži jako součást běžné kožní mikroflóry. Byly detekovány také v trávicím traktu i dýchacím traktu, dokonce také v mozku člověka. Rod *Malassezia* je společně s rodem *Candida* považována za dominantní součást orálního mikrobiomu (Das *et al.*, 2021; Hamdino *et al.*, 2022).

Kvasinky rodu *Malassezia* rostou na kultivačních půdách jako je Dixonovo médium či maltózový agar, a to v oválných nebo kulovitých koloniích. Kolonie mohou mít různé odstíny růžové nebo fialové barvy a hladký, popř. vrásčitý povrch v závislosti na konkrétním druhu. Na CHROMagaru vytváří *Malassezia furfur* velké vrásčité a světle růžové kolonie. *Malassezia globosa* roste na tomto agaru v podobě hladkých fialových kolonií (Hamdino *et al.*, 2022).

Kvasinky tohoto rodu mohou být v určitých situacích původcem humánních infekcí (Das *et al.*, 2021; Hamdino *et al.*, 2022). Pokud se *Malassezia* dostane do patogenního hyfálního stádia, je schopna rychle vyvolat silnou zánětlivou reakci imunitního systému nebo podporovat agregaci zánětlivých buněk (Jiang *et al.*, 2023). *Malassezia* má unikátní a pevnou buněčnou stěnu, která se výrazně liší od stěny většiny ostatních hub. Zásadním rozdílem je obsah β -1,6-glukanu (asi 70 %) v porovnání s jinými houbami, které zpravidla obsahují β -1,3-glukan. Tato odlišnost v buněčné stěně může ovlivnit způsob, jak imunitní systém hostitele rozpoznává kvasinky rodu *Malassezia* (Ianiri *et al.*, 2022). Tyto kvasinky produkují lipázy k odbourávání kožního mazu, čímž uvolňují mastné kyseliny. Zároveň tyto kvasinky využívají nasycené mastné kyseliny obsažené v kožním mazu (Das *et al.*, 2021). *Malassezia* je typickým patogenním rodem hub často spojovaná s povrchovou kožní mykotickou infekcí nazývanou *tinea versicolor*. *Tinea versicolor* se nejčastěji vyskytuje v seboroických oblastech (záda, hrudník, krk) a klinicky se projevuje hyperpigmentovanými nebo hypopigmentovanými plaky (Obrázek 3), které jsou pokryty jemnými šupinami (Jiang *et al.*, 2023).



Obrázek 2 Hypochromní *tinea versicolor* (Bonifaz *et al.*, 2010)

1.3.4. Rod *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* se skládá z více než 40 druhů bazidiomycétních kvasinek, produkujících karotenoidní pigmenty. *Rhodotorula* je považována za jeden z nejhojnějších přírodních zdrojů karotenoidů. Karotenoidy mají za následek charakteristické červené zbarvení kolonií. O kvasinky tohoto rodu je obrovský zájem v mnoha různých odvětvích průmyslu právě kvůli

tomuto karotenoidnímu pigmentu (Kundrát a Kvasničková, 2015; Mussagy *et al.*, 2023). Kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou také známé schopností produkovat velké množství mastných kyselin, které lze přeměnit na biopaliva. Tyto mastné kyseliny mají uplatnění také v potravinářském průmyslu k získání funkčních potravin a doplňků stravy. *Rhodotorula* je také schopna syntetizovat širokou škálu dalších cenných molekul (lipidy, enzymy či polysacharidy) (Mussagy *et al.*, 2023). Zástupci rodu *Rhodotorula* jsou označovány jako všudypřítomné. Vyskytují se ve vodě, vzduchu, půdě i na rostlinách. Dále jsou také součástí lidského organismu. Izolace kvasinek rodu *Rhodotorula* byla u člověka provedena např. ze stolice, nehtů, kůže, sputa, trávicího traktu a adenoidů (Galán-Sánchez *et al.*, 1999; Mussagy *et al.*, 2023).

Kvasinky tohoto rodu jsou nejčastěji kultivovány na kultivačním médiu jako je Sabouraudův agar, mDixon agar či maltózový agar (El-ziney *et al.*, 2018). Kultura druhů *Rhodotorula* se při teplotě 30 °C na Sabouraudově agaru s glukózou rychle rozrůstá. Kolonie mají korálově růžovou barvu a jejich povrch je hladký, vlhký s mukoidní konzistencí (Hernández-Almanza *et al.*, 2014). Kolonie kvasinek *Rhodotorula* mohou obsahovat také intracelulární lipidové inkluze nasycené karotenoidy, přispívající ke zbarvení kultivačního média (od růžové po oranžovou barvu) (Li *et al.*, 2022).

Karotenoidní pigment slouží kvasinkám rodu *Rhodotorula* jako důležitá ochrana proti oxidativnímu stresu a škodlivému UV záření (Kundrát a Kvasničková, 2015; Mussagy *et al.*, 2023). Rod *Rhodotorula* zahrnuje kvasinky, jež jsou považovány za oportunní patogeny. Často vyvolávají infekce u jedinců s predisponujícími faktory nebo oslabenou imunitou jako např. pacienti s AIDS, pacienti s hematologickými novotvarami, pacienti léčení parenterálními antibiotiky (Navarro-Triviño *et al.*, 2020). Patogenními zástupci tohoto rodu jsou např. *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* a *Rhodotorula mucilaginosa* (Galán-Sánchez *et al.*, 1999). V posledních letech byly zaznamenány případy jak lokálních (endoftalmitida a peritonitida) tak i systémových infekcí (fungémie, endokarditida a meningitida) způsobených kvasinkami tohoto rodu (Galán-Sánchez *et al.*, 1999; Navarro-Triviño *et al.*, 2020).

1.3.5. Rod *Candida*

Rod *Candida* je rozsáhlý rod kvasinek zahrnující přibližně 200 druhů, z nichž více než 40 druhů může způsobit humánní infekce (Ghazi *et al.*, 2019). Kandidy jsou specifické různou morfologií (Arafa *et al.*, 2023). Některé druhy kvasinek tohoto rodu se používají při technologiích zpracování potravin např. při výrobě fermentovaného vína, domácích potravin a nápojů,

zákysů, mléčných výrobků, masa a uzenin (Polke, 2015). Kvasinky rodu *Candida* jsou rozšířeny v přírodních i umělých biotopech od vodních zdrojů, až po kůži a trávicí trakt zvířat a člověka (Hommel, 2014; Kunderát a Kvasničková, 2015). Kandidy jsou u zdravých jedinců považovány za komenzály v gastrointestinálním a urogenitálním traktu, a také v dutině ústní či jako součást mikrobioty očních spojivek (Neppelenbroek, 2014; Spampinato, 2013).

Kultivace kvasinek rodu *Candida* se provádí nejčastěji na kultivačních půdách jako jsou Sabouraudův agar nebo Sabouraudův agar s glukózou. Kolonie vyrůstají na většině agarových médií během 2–5 dní kultivace. Kandidy vytváří obvykle kulaté, vlhké kolonie bílé nebo krémové barvy. Přítomnost malých hyfových výběžků z okraje kolonie je charakteristické např. u *C. albicans* (Pfaller, 2015).

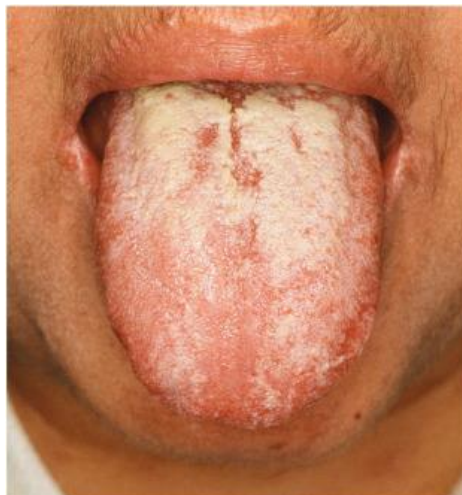
Je známo několik druhů kvasinek rodu *Candida*, které jsou lidskými oportunními patogeny (Neppelenbroek, 2014; Spampinato, 2013). V patogenezi rodu *Candida* sehrává klíčovou roli několik faktorů. Mezi tyto faktory patří komplexní transkripční okruhy, morfologická a fenotypová variabilita, tvorba biofilmu či extracelulární hydrolytické enzymy poškozující tkáň. Mezi další faktory můžeme zařadit metabolickou flexibilitu, plasticitu genomu, adaptaci na změny pH prostředí, robustní systém získávání živin, adhezení a invazi, proteiny tepelného šoku a cytolytické proteiny. Tyto kvasinky vykazují také schopnost odolávat útokům imunitního systému hostitele, rezistenci vůči antifungálním látkám a efektivní reakci na různé stresové podněty (Mba a Nweze, 2020; Polke, 2015). Patogenita souvisí se změnou mezi komenzální kvasinkovou formou a invazivním tvarem hyfy. Kvasinkové formy kandidy se mohou pohodlně šířit uvnitř hostitelských tkání. Zatímco vláknité tvary mají vyšší schopnost adheze a invaze do hostitelských tkání. Druhy rodu *Candida* musí být schopny efektivně kolonizovat svého hostitele a také se přizpůsobit vnějším podmínkám. Pozitivní reakce na tyto podmínky má okamžitý vliv na schopnost kandidy adaptovat se a podporovat svou virulenci a patogenitu (Arafa *et al.*, 2023; Polke, 2015). Značná patogenita je popisována u druhů *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* a *Candida parapsilosis*, které způsobují dohromady asi 95 % infekcí způsobených kvasinkami tohoto rodu. Zbýlých 5 % kvasinkových infekcí způsobují ostatní druhy kandid vč. *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* a *Candida guilliermondii* (Gabaldón *et al.*, 2016). Infekce způsobené kvasinkami rodu *Candida* jsou nazývány kandidózy, vyskytují se nejčastěji jako sekundární infekce u imunokompromitovaných jedinců. Mohou být klasifikovány podle míry postižení, a to jako povrchové (kožní, slizniční) a systémové invazivní infekce (hluboké a rozšířené). Povrchový typ infekce nastává, když *Candida* napadá ústní dutinu, kůži, genitálie, dýchací systém

a gastrointestinální trakt (Arya a Rafiq, 2023). Na druhé straně invazivní kandidóza zahrnuje infekce, které mají vážné důsledky a mohou postihnout vitální orgány. Mezi tyto extrémní stavy patří kandidémie (postihující krev), meningitida (postihující mozek) a endokarditida (postihující srdce). U pacientů s oslabeným imunitním systémem je invazivní kandidóza významnou příčinou morbidit a mortality (Arafa *et al.*, 2023). Tato forma infekce má vysokou incidenci a prevalenci, což z ní činí závažný zdravotní problém (Polke, 2015). Kvasinky rodu *Candida* mohou kolonizovat různé povrchy lékařských zařízení, vč. močových katetrů, centrálních žilních katetrů a kardiovaskulárních zařízení. Tato schopnost zvyšuje riziko vzniku kandidózy. Tyto infekce jsou často spojeny s morbiditou a úmrtím hospitalizovaných pacientů. Infekce spojené s lékařskými prostředky patří mezi hlavní faktory související s patogenezi v rámci kandidózy (Arafa *et al.*, 2023).

Nejčastější oblastí výskytu kandidózy je vaginální sliznice nebo dutina ústní. **Vulvovaginální kandidóza** (VVC) je symptomatická vaginitida (zánět pochvy, vulvy) (Lopez, 2015). Tato infekce každoročně postihuje miliony žen. Mezi převládající příznaky patří svědění vulvy a abnormální vaginální výtok (podobný sýru nebo vodnatý sekret). Hlavní příčinou VVC je *Candida albicans* a *Candida glabrata*. Rizikovými faktory rozvoje vulvovaginální kandidózy je hormonální substituce, nekontrolovaný diabetes, imunosuprese, užívání antibiotik, antikoncepce nebo glukokortikoidů či různé genetické predispozice. Těhotné ženy jsou obecně náchylnější k VVC v důsledku hormonálních změn během těhotenství (Lopez, 2015; Gonçalves, 2016).

Kvasinky rodu *Candida* mohou být dále detekovány v dutině ústní, a to až u 75 % populace. U zdravých jedinců zůstává tato přirozená kolonizace většinou bezproblémová. Nicméně u jedinců s mírně oslabeným imunitním systémem může častěji dojít k orální kandidóze (OC). **Orální kandidóza** je nejčastěji způsobena druhem *Candida albicans*. Tato infekce může postihnout orofarynx nebo jícen u jedinců s narušenou funkcí adaptivního imunitního systému. HIV představuje významný rizikový faktor pro vznik OC. Dalšími rizikovými faktory pro rozvoj OC patří nošení zubních protéz a pokročilý věk (Gonçalves, 2016). Mezi čtyři odlišné primární formy orální kandidózy řadíme pseudomembranózní kandidózu, akutní erytematózní kandidózu, chronickou erytematózní kandidózu a chronickou hyperplastickou kandidózu. Na Obrázku 4 je znázorněna pseudomembranózní kandidóza, jež je charakterizována přítomností bílého krémového povlaku, který postihuje nejčastěji jazyk, bukalní sliznici, tvrdé a měkké patro (Millsop a Fazel, 2016). Tyto léze mohou být akutní nebo chronické a jsou způsobeny přemnožením kvasinek ve sliznici dutiny ústní. Tento proces je spojen s deskvamací

epiteliálních buněk, akumulací keratinu, fibrinu, nekrotické tkáně a kvasinkových hyf. Klasickým indikátorem tohoto onemocnění je schopnost snadného setření či seškrabování bílých plaků v postižené oblasti se zanecháním erytematózního povrchu. Poměrně často se vyskytuje toto onemocnění i u novorozenců a dětí běžněji známé jako moučnivka či ústní soor (Lewis a Williams, 2017).



Obrázek 3 Pseudomembranózní kandidóza (Jillian a Nasim, 2016)

Akutní erytematózní kandidóza se projevuje zarudnutím sliznic v dutině ústní nebo jazyka. Tato forma se často rozvíjí v důsledku snížení hladin bakteriální složky orální mikroflóry po podání širokospektrálních antibiotik. Dalším současným lokálním faktorem může být užívání kortikosteroidů, zejména ve formě inhalátoru, což může vést k imunosupresi a následnému přemnožení kandidy (Lewis a Williams, 2017). Chronická erytematózní kandidóza je často označována jako stomatitida zubní náhrady spojená s kandidami a projevuje se zarudnutím sliznice pod přiléhavým povrchem zubní náhrady. Infekce může vzniknout pod jakoukoli akrylovou zubní náhradou (častěji se vyskytuje na patrové sliznici než na mandibulární sliznici). Hlavními rizikovými faktory spojenými s tímto stavem jsou nedostatečná ústní hygiena, trvalé nošení zubní náhrady nebo přítomnost špatně padnoucí zubní náhrady (Millsop a Fazel, 2016; Lewis a Williams, 2017). Hyperplastická kandidóza se projevuje dobře ohraničenými, mírně vyvýšenými, bílými plakami, které obvykle přiléhají k bukalní sliznici. Léze mohou mít různé velikosti, od malých, průhledných až po velké, neprůhledné plakaty. Mohou mít nodulární (uzlíkovitý) nebo skvrnitý vzhled. Tato forma kandidózy se od pseudomembranózní kandidózy odlišuje nesnadným setřením těchto vzniklých plaků. Znepokojující je u této infekce hypotéza o možné spojitosti s maligními změnami v postižených lézích (Millsop a Fazel, 2016).

2. *Candida lusitaniae*

Candida lusitaniae je oportunně patogenní druh kvasinky z rodu *Candida*. Tento druh byl identifikován jako klíčový etiologický faktor infekcí, a to zejména u jedinců s oslabeným imunitním systémem. Jedná se o poměrně vzácný druh kvasinky, jenž přitahuje stále větší pozornost vědců, kteří se zabývají studiem jejího výskytu a vlastností (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). *Candida lusitaniae* byla poprvé izolována z gastrointestinálního traktu teplokrevných živočichů již v roce 1959. Nicméně jako oportunní patogen byla poprvé popsána až v roce 1979 v případě pacienta s akutní myeloidní leukémií (Minari *et al.*, 2001).

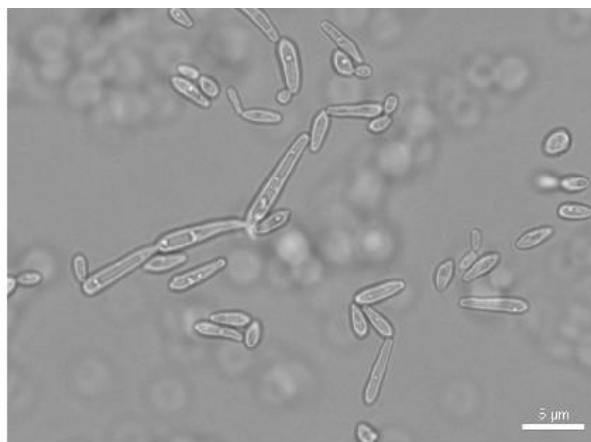
V současnosti dochází k postupnému nárůstu případů infekcí způsobených *Candida lusitaniae* (Khan *et al.*, 2019). Rostoucí výskyt těchto infekcí pravděpodobně souvisí s narůstajícím počtem imunokompromitovaných pacientů a také nárůstem rezistence kvasinek *C. lusitaniae* vůči antimykotickým léčivům (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

2.1. Morfologie a rozmnožování *Candida lusitaniae*

Candida lusitaniae je dimorfní haploidní organismus, tvořící vejčité, elipsoidní nebo protáhlé kvasinkové buňky o šířce 2–6 μm a délce 2–10 μm (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022; Sabra *et al.*, 2023). Vnitřní a vnější struktury a organely *C. lusitaniae* nejsou zatím příliš detailně popsány. Nicméně podobně jako u ostatních druhů *Candida* je u této kvasinky popsána buněčná stěna, cytoplazmatická membrána, endoplazmatické retikulum, ribozomy, Golgiho aparát a jádro (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Kvasinky mají pevnou buněčnou stěnu. Buněčná stěna má význam při udržování tvaru buňky a zajišťuje také ochranu buňky (Monje-Galvan a Klauda, 2015). V buněčné stěně *Candida lusitaniae* se nacházejí důležité složky jako polysacharidy, glykoproteiny, β -1,3-glukany a chitin. Pro stabilitu a pevnost buněčné stěny kvasinek je důležitá vazba proteinů na polysacharidy, a to prostřednictvím vazeb s β -1,6-glukanem, fungujícím jako spojovací můstek a ukotvující tyto složky dohromady. Buněčná stěna kvasinky má zásadní úlohu při imunitním rozpoznání a vzájemné interakci s obrannými mechanismy hostitelského organismu (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplazmatická membrána. Tato membrána je složena z fosfolipidové dvojvrstvy a proteinů. Cytoplazmatická membrána udržuje integritu buňky a reguluje prostup látek do buňky (Monje-Galvan a Klauda, 2015). Další organelou *C. lusitaniae* je endoplazmatické retikulum. Tato organela představuje síť membránových struktur ve formě kanálů a váček v cytoplazmě. Endoplazmatické retikulum slouží k syntéze proteinů a lipidů. Ribozomy se nacházejí na

povrchu hrubého endoplazmatického retikula nebo volně v cytoplazmě a jsou zodpovědné za syntézu proteinů. Golgiho aparát je soubor membránových váčků. Tento aparát představuje důležitý prvek propojující cytoplazmu s endoplazmatickým retikulem. Hlavní funkcí Golgiho aparátu je syntéza a modifikace polysacharidů a glykoproteinů v buňce (Monje-Galvan a Klauda, 2015). Významnou organelou v cytoplazmě kvasinkové buňky je jádro (Taddei a Gasser, 2012).

Jádro je tvořeno dvojitou membránou s póry pro komunikaci a regulaci toku látek dovnitř jádra. Hlavní úlohou jádra je uchovávání genetické informace kvasinky (Taddei a Gasser, 2012). Genom *Candida lusitanae* byl kompletně osekvenován, což poskytuje vědcům důležité informace pro studium této kvasinky. Genom je rozdělen do osmi chromozomů a patří do skupiny *Candida* CTG (genetický kodon). Tato skupina zahrnuje *C. albicans*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* a *C. parapsilosis*. Všichni členové této skupiny sdílí nekonvenční použití kodonu CUG, který kóduje serin namísto běžného leucinu. Jaderný genom *C. lusitanae* ATCC 42720 má délku 12,11 Mbp, obsah GC 44,5 % a obsahuje celkem 6153 genů kódujících proteiny a pět pseudogenů (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).



Obrázek 4 Pseudohyfy *Candida lusitanae* (Lastauskienė *et al.*, 2015)

Kvasinka *C. lusitanae* vykazuje schopnost dimorfismu. Tato kvasinka však není schopna vytvářet pravé hyfy, ale pouze tzv. pseudohyfy (Obrázek 5) na rozdíl od nejstudovanějšího druhu tohoto rodu *C. albicans*. Morfologická plasticita těchto kvasinek dává dceřiným buňkám možnost přežít obrané útoky imunitního systému hostitele, šířit se a vyvolávat infekce (Borgeat *et al.*, 2021; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

Kvasinky rodu *Candida* byly historicky klasifikovány jako nepohlavně se rozmnožující kvasinky. Byl však prokázán také pohlavní cyklus u několika druhů tohoto rodu, a to vč. kvasinky *C. lusitaniae* (Lee *et al.*, 2018; Sherwood a Bennett, 2009).

Kvasinka *Candida lusitaniae* je unikátní tím, že prochází pohlavním cyklem i přes absenci klíčových meiotických komponent (Reedy *et al.*, 2009; Sherwood a Bennett, 2009). Genom *Candida lusitaniae* obsahuje dva významné geny, MAT α 1 a MAT α 2. Tyto geny mají důležitou roli v pohlavním rozmnožování této kvasinky. Geny MAT α 1 a MAT α 2 kódují transkripční faktory nezbytné pro spojení a identitu buněk. Součástí genomu této kvasinky je také gen MAT α 1. Tento gen má významnou úlohu ve sporulaci. Během pohlavního rozmnožování prochází *C. lusitaniae* meiotickým pohlavním cyklem s rekombinací závislou na enzymu Spo11 (Sherwood a Bennett, 2009; Bloomfield, 2018). Tento enzym je vysoce konzervovaný v eukaryotech a jeho hlavní funkcí je vytváření dvouvláknových zlomů v DNA během meiózy. Tyto dvouvláknové zlomy DNA jsou nezbytné pro iniciaci meiotických rekombinací, při nichž dochází k výměně genetického materiálu mezi chromozomy (Reedy *et al.*, 2009). Většina buněk, které vznikají meiózou, jsou haploidní. Na rozdíl od tohoto běžného vzoru je u *Candida lusitaniae* přibližně třetina nově vznikajících buněk meiózou buď diploidních (s dvojnásobným množstvím chromozomů) nebo aneuploidních (s odchylkou v počtu chromozomů) (Sherwood a Bennett, 2009). Tato neobvyklá situace může nastat z důvodu neefektivní segregace chromozomů. V tomto případě nedochází k správnému a účinnému rozdělení chromozomů do dceřiných buněk (Klaasen *et al.*, 2022). Další možností je meiotická nondisjunkce neboli selhání správného oddělení chromozomů během procesu meiózy. Výsledkem jsou buňky s abnormálním počtem chromozomů (Halder *et al.*, 2021; Sherwood a Bennett, 2009). K těmto poruchám dochází zejména vzhledem k omezenému repertoáru meiotických komponent přítomných v genomu této kvasinky. *Candida lusitaniae* během pohlavního rozmnožování podstupuje haploidní-diploidní-haploidní cyklus (Sherwood a Bennett, 2009; Reedy *et al.*, 2009).

Kvasinka *Candida lusitaniae* je také schopna nepohlavního rozmnožování prostřednictvím mitózy. Během mitózy se buňka dělí na dvě identické dceřiné buňky, které mají stejný genetický materiál jako mateřská buňka. Tento proces zajišťuje rychlý a efektivní růst populace tohoto druhu (Knop, 2011).

Podmínky prostředí mají vliv na rozmnožování *C. lusitaniae* a mohou určit, zda se upřednostňuje pohlavní či nepohlavní rozmnožování. Kvasinky obvykle preferují nepohlavní

rozmnožování v nepříznivých podmínkách, zatímco za příznivých podmínek může dojít k pohlavnímu rozmnožování s cílem zvýšení genetické variability (Bloomfield, 2018; Knop, 2011).

2.2. Metabolismus

V současné době jsou dostupné pouze omezené informace o metabolismu kvasinky *C. lusitaniae* (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Tato kvasinka se vyznačuje fermentačním metabolismem podobně jako jiné druhy kvasinek. Tento metabolismus umožňuje kvasince produkci ethanolu z D-xylózy za anaerobních podmínek. Studie prokázaly, že *Candida lusitaniae* metabolizuje glukózu, cellobiózu a celotriózu. Kvasinky tohoto druhu však nejsou schopny degradovat methyl-D-glukosid a cellotetrózu. Tato vlastnost je fenotypickým znakem, který je odlišuje od *Candida guilliermondii*. *Candida lusitaniae* však může využívat také galaktózu, sacharózu, maltózu, laktát a trehalózu jako zdroje uhlíku. Schopnost adaptovat svůj metabolismus k asimilaci rozmanitých zdrojů uhlíku byla spojena s rezistencí vůči některým léčivům, vč. amfotericinu B (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022; Pérez *et al.*, 2019).

2.3. Výskyt a klinické dopady

Candida lusitaniae je považována za environmentální druh kvasinek. Běžně se nachází v půdě, vodě, rostlinách a na jiných přírodních materiálech (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022; Sabra *et al.*, 2023). Kvasinky druhu *Candida lusitaniae* přežívají jak v anaerobním, tak i aerobním prostředí stejně jako ostatní druhy tohoto rodu (Sabra *et al.*, 2023). Tyto kvasinky jsou také součástí normální lidské mikroflóry (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022; Sabra *et al.*, 2023). Kolonizace kvasinek může vytvořit predispozici k infekci v případě, že dochází k nadměrné proliferaci kvasinek a jejich následné invazi do hostitelského organismu. Tyto procesy jsou typicky spojeny s imunodeficiencí nebo poruchou normální mikrobiální flóry (Millsop a Fazel, 2016). Mezi další faktory přispívající k rostoucímu počtu infekcí způsobených kvasinkou *Candida lusitaniae* patří např. použití katetrů, invazivní chirurgické zákroky, užívání širokospektrálních antibiotik nebo transplantace (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

Candida lusitaniae byla nejčastěji izolována jako patogen z dýchacího traktu, pobřišnice, urogenitálního traktu a kůže, stejně tak i z vzorků moče a krve. Tato kvasinka je často identifikována u pacientů s hematologickými malignitami a může způsobit infekce u pediatrických pacientů nebo dokonce smrtelné infekce u imunokompromitovaných jedinců. Kromě kandidémie je spojována i s peritonitidou, meningitidou a infekcemi močových cest.

Vzhledem k častému výskytu u hospitalizovaných pacientů je tato kvasinka považována za potenciálního nositele nozokomiálních infekcí v klinickém prostředí (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022; Sabra *et al.*, 2023; Scott *et al.*, 2023).

Candida lusitaniae je zodpovědná za zhruba 19,3 % všech infekcí, které nejsou způsobeny kvasinkou *Candida albicans* a přibližně 1,7 % všech případů urogenitální kandidózy způsobené různými druhy kvasinek rodu *Candida* (Angiolella *et al.*, 2024; Sabra *et al.*, 2023). Významným pozitivem je aktuální nízká smrtelnost pacientů v důsledku infekcí vyvolaných kvasinkou *Candida lusitaniae* (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

2.4. Metody identifikace kvasinky *Candida lusitaniae*

V klinické praxi získává přesná identifikace kvasinek z rodu *Candida* stále větší význam vzhledem k výraznému nárůstu případů kandidózy. K dosažení přesného rozlišení a identifikaci různých druhů *Candida* jsou využívány různé metody (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Mezi tyto metody patří různé konvenční, komerční, molekulárně-biologické a některé další metody. Některé z těchto technik vyžadují předchozí izolaci kvasinek, zatímco jiné metody lze přímo aplikovat na klinické vzorky pro přímou identifikaci kvasinek rodu *Candida* (Deorukhkar a Roushani, 2018).

2.4.1. Fenotypové metody

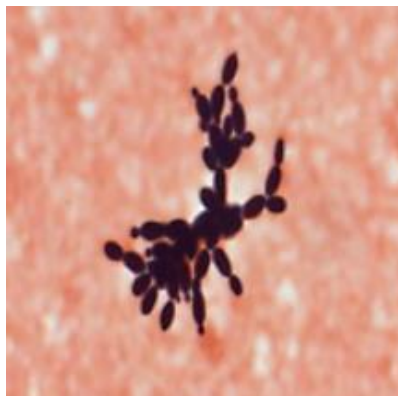
Konvenční techniky umožňují rozlišit různé druhy kvasinek na základě charakteristik, jako jsou morfologie a barva kolonií, tvar buněk a další vlastnosti (Deorukhkar a Roushani, 2018). Kultivace kvasinek na specifických médiích slouží k analýze a identifikaci jejich fyziologických vlastností (Arafa *et al.*, 2023). Kandidy nejsou náročné na kultivaci, hojně rostou na běžných kultivačních médiích používaných pro izolaci dalších patogenních hub i bakterií. Pro primární izolaci různých druhů *Candida* z klinických vzorků je široce využíván **Sabouraudův agar** (Deorukhkar a Roushani, 2018). Jak je znázorněno na Obrázku 6 *Candida lusitaniae* roste na tomto médiu ve formě kulatých, hladkých kolonií krémové barvy (Pfaller, 2015). Mezi další média pro kultivaci a identifikaci kvasinek patří maltózový agar, fosfomolybdenátový agar, Nickersonovo médium, bramborový agar s glukózou či kukuřičný agar (Deorukhkar a Roushani, 2018). Kultivace na kukuřičném médiu v podobě tzv. sklíčkové kultury se využívá pro sledování růstu, morfologie hyf, uspořádání blastospor a tvorby chlamydospor. Kvasinkové kolonie se inokulují na bloky kukuřičného média a po inkubaci je kultura podrobně mikroskopicky zkoumána (Grupta *et al.*, 2020). V kukuřičném agaru

vykazuje *C. lusitaniae* vejčité kvasinkové buňky, které jsou uspořádány do párů a řetízků. U této kvasinky lze také pozorovat hojně větvené a zakřivené pseudohyfy (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).



Obrázek 5 *Candida lusitaniae* na Sabouradově agaru
(upraveno dle Tapia, 2010)

Po izolaci kvasinek na kultivačních médiích je nezbytné vytvořit preparát pro detailnější mikroskopickou analýzu. Preparát poskytuje informace o velikosti, tvaru buňky a tvorbě blastospor či pseudohyf. V preparátu obarveném dle Grama se kvasinky (vč. *Candida lusitaniae*) jeví jako Gram-pozitivní (tmavě fialové). Gram-pozitivní buňky *Candida lusitaniae* jsou znázorněny na Obrázku 7. Avšak díky jejich velikosti, přítomnosti blastospor a pseudohyf je možné kvasinky spolehlivě odlišit od bakterií (Deorukhkar a Roushani, 2018).



Obrázek 6 *Candida lusitaniae* v preparátu obarveném dle Grama
(upraveno dle Shaikh *et al.*, 2022)

Identifikaci kvasinek umožňují také **metody založené na využití chromogenních médií**. **CHROMagar** představuje rychlou, přesnou a jednoduchou techniku identifikace kvasinek rodu *Candida* (Arafa *et al.*, 2023). Tato metoda využívá kultivační půdy obsahující více chromogenních substrátů jako je např. hexosaminidáza a β -glukosaminidáza. Substráty interagují s enzymy specifickými pro jednotlivé druhy kvasinek. V důsledku těchto interakcí vznikají různě barevné kolonie. Díky této vlastnosti kvasinek je možné snadno rozlišit různé druhy rodu *Candida*. Mezi komerčně dostupné chromogenní agary, patří např. CHROMagar *Candida*, Fluroplate, Candichrom, ID *Candida* agar, CHROMagar, BiGGY agar a další (Alam *et al.*, 2014). Na CHROMagaru *Candida* s chromogenním substrátem β -glukosaminidázy vyrůstá *Candida lusitanae* v kulatých hladkých koloniích fialové barvy (Obrázek 8) (Deorukhkar a Roushani, 2018).



Obrázek 7 *Candida lusitanae* na CHROMagaru
(upraveno dle Gupta *et al.*, 2020)

***Candida* ID agar** je druhem chromogenního média založeného na přítomnosti chromogenního substrátu indolyglukosaminid (Arafa *et al.*, 2023). Kandidy hydrolyzují tento substrát za vzniku různých nerozpustných barevných sloučenin. Konkrétně kvasinka *C. lusitanae* vyrůstá na tomto agarovém médiu v růžově zbarvených koloniích (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). **Biggy agar** je chromogenní médium obsahující siřičitan bismutitý. Kandidy tento substrát přeměňují na sulfid bismutitý (Arafa *et al.*, 2023). *Candida lusitanae* na Biggy agaru roste v červených kulatých hladkých koloniích (Pérez *et al.*, 2022).

Z důvodu přesnější confirmace jednotlivých druhů *Candida* se provádějí **biochemické testy**. Biochemické testy jsou založeny na hodnocení schopnosti kvasinek využívat např. různé typy sacharidů. Metabolické dráhy a enzymatické vybavení kvasinek se mezi jednotlivými druhy

liší. V důsledku toho mají různé druhy kvasinek odlišnou schopnost fermentovat a využívat určité typy sacharidů (Pérez *et al.*, 2019; Raju a Rajappa, 2011). V současné době jsou k dispozici také různé komerčně vyráběné testovací sady. Tyto diagnostické systémy pracují na principu běžného testování, avšak sacharidy jsou umístěny v jamkách s kultivačními médii. Růst kmene v jednotlivých jamkách je vyhodnocen dle změn v zakalení nebo zbarvení. Výsledky testů jsou porovnávány s databází, což umožňuje identifikovat konkrétní druhy kvasinek (Raju a Rajappa, 2011). Dále lze využít automatizovaný systém Vitek YBC pro určení biochemických vlastností jednotlivých druhů kvasinek. Systém Vitek YBC poskytuje spolehlivější informace a přesnější identifikaci druhů *Candida*. Tato metoda umožňuje provést současně dvacet šest biochemických testů u jednoho kmene. Součástí tohoto systému je počítačový program pro vyhodnocení výsledků (Arafa *et al.*, 2023). Kvasinka *Candida lusitanae* vykazuje průměrnou metabolickou aktivitu a může hydrolyzovat přibližně 30 různých substrátů. Některé z těchto substrátů jsou důležité pro identifikaci a rozlišení od ostatních druhů rodu *Candida*. Mezi tyto substráty patří např. ramnóza, rafinóza, celobióza, N-acetylglukosamin a eskulin (Pérez *et al.*, 2022).

Další možností pro identifikaci kvasinek jsou **sérologické metody** (Arafa *et al.*, 2023). Tyto diagnostické testy jsou založeny na detekci antigenů obsažených v buněčné stěně různých druhů kvasinek. Mezi tyto antigeny patří např. mannany a manoproteiny, glukany, Hsp90 (protein tepelného šoku 90), enolázy a další imunodominantní cytoplazmatické antigeny. Tyto metody také umožňují stanovení protilátek v séru, které vznikají jako odpověď organismu hostitele na přítomnost této kvasinky. Pro rychlou a přesnou identifikaci kvasinek rodu *Candida* existuje velké množství komerčně dostupných testů. Tyto testy umožňují identifikovat přítomnost antigenů ze stěny buněk kvasinky *Candida* nebo specifických protilátek proti této kvasince v různých tělních tekutinách. Mezi tyto testy patří latexová aglutinace, ELISA, imunoblotování, dot immunoassay, lipozomální immunoanalýza či radioimunoanalýza (Alam *et al.*, 2014; Arafa *et al.*, 2023).

2.4.2. Molekulárně-biologické a další metody

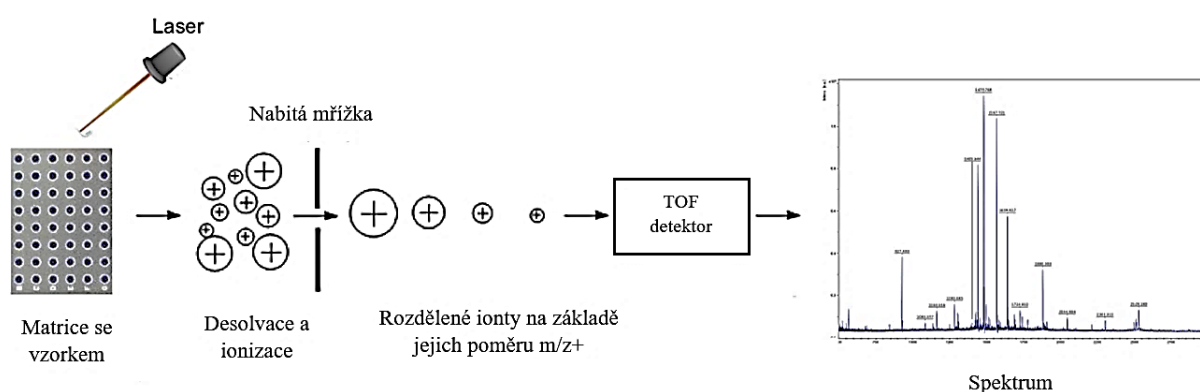
Tradiční a biochemická identifikace kvasinek rodu *Candida* představuje poměrně složitý proces (Hamzehee *et al.*, 2019). Z tohoto důvodu získávají metody molekulárně-biologické identifikace stále větší popularitu. Jedná se o přesné, vysoce specifické a citlivé techniky, které umožňují rozpoznání různých druhů rodu *Candida* (Arafa *et al.*, 2023). Metody zaměřené na analýzu DNA jsou často založeny na principu polymerázové řetězové reakce (Hamzehee *et al.*,

2019). Metoda PCR je schopna amplifikovat během několika minut fragmenty DNA (Arafa *et al.*, 2023). Mezi metody založené na principu PCR patří také např. **AFLP** (polymorfismus délky amplifikačního fragmentu). Tato metoda, slouží k analýze a identifikaci různých částí DNA. Technika AFLP využívá enzymatického štěpení DNA, následované amplifikací fragmentů. Izolované fragmenty DNA jsou identifikovány pomocí fluorescenčně označených primerů. Celý postup probíhá za zcela specifických podmínek (Arafa *et al.*, 2023). Mezi další techniky analýzy DNA založené na principu PCR patří **real-time PCR** a **DNA-čipy**. Real-time PCR umožňuje sledovat amplifikační signály v reálném čase, což umožňuje kvantifikaci. Tato metoda je často využívána k identifikaci druhů *Candida* ve vzorcích krve a tkání, není však tak běžná pro vzorky odebrané z dutiny ústní (Magalhães *et al.*, 2022). **DNA-čipy**, známé také jako DNA-microarray, jsou vysoce citlivé a specifické analytické nástroje pro identifikaci mikroorganismů. Tato technika využívá mikroskopické sondy z oligonukleotidů s fluorescenčními značkami. Tyto sondy se vážou na vzorky nukleových kyselin a jsou následně fixovány na pevném povrchu. Detekce vázaných sekvencí na čípech probíhá pomocí výkonného fluorescenčního skeneru a sofistikovaného počítačového softwaru, který zpracovává a interpretuje výsledky (Arafa *et al.*, 2023).

Další molekulárně-biologická metoda využívaná pro identifikaci kvasinek je **PNA-FISH** (fluorescenční *in situ* hybridizace s peptidovými nukleovými kyselinami) jedná se o metodu, která vyniká svojí jednoduchostí a efektivitou. Tato metoda je založena na principu hybridizace specifických sond s cílovými nukleovými kyselinami ve vzorku (Arafa *et al.*, 2023). Technika využívá sondy peptidových nukleových kyselin (PAN) označených fluoresceinem. Sondy jsou navrženy tak, aby byly specifické pro konkrétní úsek nukleové kyseliny. PNA sondy se navážou na specifické úseky DNA nebo RNA v buňkách. S využitím fluorescenčního mikroskopu dochází k detekci fluorescenčních signálů. Podle místa a intenzity těchto signálů lze spolehlivě identifikovat daný mikroorganismus (Arafa *et al.*, 2023; Magalhães *et al.*, 2022).

V posledních letech si v oblasti diagnostiky mikroorganismů získala velkou důvěru moderní metoda **MALDI-TOF MS** (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí/ionizací za přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem). Metoda MALDI-TOF MS poskytuje rychlou, ekonomicky efektivní a spolehlivou identifikaci mikroorganismů (Arafa *et al.*, 2023). Princip spočívá v generování proteinových „otisků prstů“ mikroorganismů ve vzorku. Tyto otisky jsou následně porovnávány s referenčními spektry. Metoda MALDI-TOF MS využívá laserový paprsek k ionizaci vzorku, částice tak získají náboj. Ionty se vlivem rozdílné hmotnosti a náboje pohybují různou rychlostí. Tato rozdílná rychlost způsobuje rozptyl iontů. MALDI-TOF MS

měří dobu, za jakou ionty překonají známou vzdálenost (tzv. doba letu). Doba letu iontů souvisí s hmotností částic. Tento vztah je využíván k vytvoření hmotnostních spekter pro identifikaci. Tento proces vytváří jedinečný obraz umožňující identifikaci konkrétního druhu mikroorganismu vč. kvasinek (Magalhães *et al.*, 2022; Singhal *et al.*, 2015). Schématické znázornění procesu identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF MS je znázorněno na Obrázku 9.



Obrázek 8 Schématické znázornění procesu identifikace pomocí MALDI-TOF MS (upraveno dle Sinhal *et al.*, 2015)

2.5. Rezistence *Candida lusitanae* k antimykotikům

Antimykotika jsou léčiva určená k potlačení nebo eliminaci patogenních kvasinek. Kvasinky si však mohou vyvinout rezistenci vůči těmto látkám, a to prostřednictvím několika mechanismů (Fisher *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2023). V klinické praxi jsou k dispozici pouze tři hlavní třídy antimykotik určené k léčbě invazivních kvasinkových a plísňových onemocnění. Mezi tato léčiva patří azoly, echinokandiny a polyeny (Lee *et al.*, 2023).

Azoly jsou nejrozšířenější skupinou antimykotik. Jedná se o pětičlenné heterocyklické sloučeniny obsahující dusík. Aktuálně jsou pro klinické použití dostupná čtyři triazolová léčiva jako je flukonazol, itraconazol, vorikonazol a posakonazol. Každé z těchto léčiv má své specifické farmakokinetické vlastnosti (Shapiro *et al.*, 2011). Azoly cílí na buněčnou stěnu kvasinek a způsobují inhibici 14 α -demethylázy (enzym důležitý v biosyntéze ergosterolů) (Lee *et al.*, 2023). Tímto způsobem blokují biosyntézu ergosterolu a vedou k hromadění toxického sterolu produkovaného Δ -5, 6desaturázou (enzym důležitý v biosyntéze polynenasycených

mastných kyselin kvasinek). Významnou nevýhodou azolů je jejich schopnost narušit metabolismus jiných léčiv (Lee *et al.*, 2023; Shapiro *et al.*, 2011). *Candida lusitanae* obsahuje gen s označením ERG11. Tento gen je zodpovědný za tvorbu enzymu 14- α demethylázy (Pristov a Ghannoum, 2019). V případě kvasinky *C. lusitanae* může rezistence vůči azolové terapii vznikat několika mechanismy. Jedním z těchto mechanismů je vytváření mutací v genu ERG11 kódující cílový enzym. Tyto mutace mohou způsobit strukturální změny enzymu, což vede ke snížení afinity antimikrobiálních látek k enzymu. Tato snížená afinita výrazně omezuje účinnost azolové terapie. Rezistenci kvasinek podporuje také nadměrná exprese genu ERG11 (Pristov a Ghannoum, 2019). Nadměrná produkce tohoto genu znamená zvýšení množství cílového enzymu v buňce. Díky tomuto procesu může dojít ke snížení efektivity interakce enzymu s léčivem a následně snížení schopnosti potlačit syntézu ergosterolu (Lee *et al.*, 2023; Borgeat *et al.*, 2021). Dalším způsobem vzniku rezistence proti azolovým léčivům jsou mutace v genu ERG3. Tyto mutace vytvářejí rezistenci tím, že blokují akumulaci toxických sterolů v buňce. Tímto způsobem se buňka snaží minimalizovat účinky antifungální terapie. Rezistence na azolovou terapii může být také spojena se zvýšenou regulací efluxních pump plazmatické membrány. Tyto pumpy mají schopnost odvádět antifungální látky z buňky a snižovat tak jejich intracelulární akumulaci a jejich působení (Lee *et al.*, 2023; Pristov a Ghannoum, 2019). *Candida lusitanae* dále obsahuje transkripční faktor MRR1. Tento faktor má zásadní význam v rezistenci proti léčivu flukonazolu. Když dojde k mutaci v tomto faktoru aktivuje se několik genů, vč. transportéru MFS7 (také známého jako MDR1). Dochází ke změnám v regulaci genů, které ovlivňují odstraňování léku z buněk. To znamená, že kvasinka se dokáže bránit proti působení flukonazolu a léčivo se dostává méně účinně do buněk (Borgeat *et al.*, 2021).

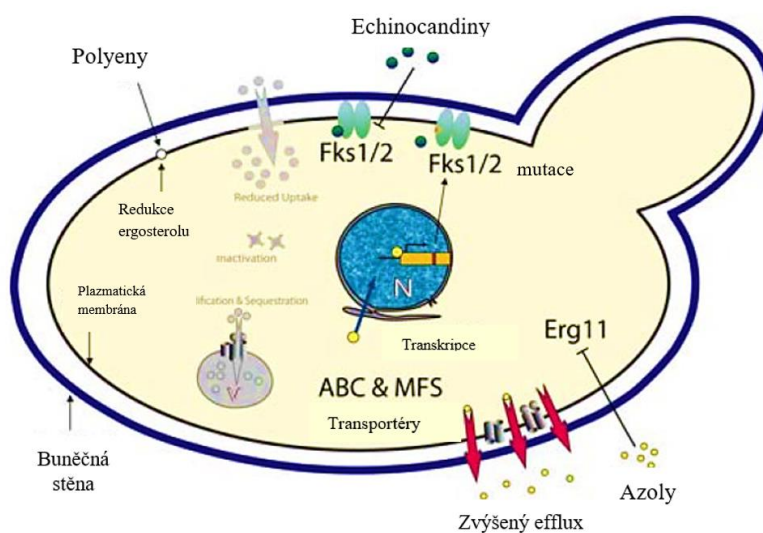
Echinokandiny jsou cyklické hexapeptidy s lipidovými postranními řetězci (Lee *et al.*, 2023). V současné době existují tři léčiva patřící do této třídy, jež jsou dostupné pro klinické použití (kaspofungin, mikafungin a anidulafungin). Byla zaznamenána významná antifungální aktivita těchto antimykotik proti rodům *Candida* a *Aspergillus* (Lee *et al.*, 2023; Shapiro *et al.*, 2011). Tato léčiva cílí na buněčnou stěnu kvasinek a hub prostřednictvím inhibice enzymu 1,3- β -D-glukansyntázy. Tento enzym je zodpovědný za biosyntézu 1,3- β -D-glukanu, polymeru v buněčné stěně kvasinek. Důležitým taktem je, že 1,3- β -D-glukan není přítomen v buňkách savců. Díky tomu mají echinokandiny omezený dopad na makroorganismus (Shapiro *et al.*, 2011). Rezistence vůči echinokandinům u kvasinek, vč. *Candida lusitanae*, může vznikat z důvodu bodových mutací genů FKS1 a FKS2. Tyto geny kódují katalytickou podjednotku enzymu 1,3- β -D-glukansyntázy. Mutace genů FKS1 a FKS2 mohou způsobit

změny v struktuře enzymu 1,3-β-D-glukansyntázy. Změny vedou ke snížení afinity echinokandinů k tomuto enzymu. Tento proces umožňuje kvasinkové buňce odolat účinkům antifungálních léků (Lee *et al.*, 2023; Pristov a Ghannoum, 2019). Kromě genetických mutací jsou také zapojeny buněčné faktory umožňující buňce reagovat na stres způsobený echinokandiny. Mezi tyto faktory patří molekulární chaperon Hsp90, různé proteiny, jež interagují s Hsp90 a geny regulující signální dráhu zachování buněčné stěny (např. zvýšení syntézy chitinu) (Lee *et al.*, 2023).

Polyeny vč. amfotericinu B (AmB) představují nejstarší antimykotika používaná v lékařské praxi pro léčbu systémových mykotických infekcí. Polyeny mají rozsáhlou biologickou aktivitu proti kvasinkám i plísním. Tato polyenová antimykotika projevují fungicidní aktivitu tím, že extrahují ergosterol z lipidových dvojvrstev cytoplazmatické membrány kvasinek (Lee *et al.*, 2023). Tato interakce vytváří póry a následně způsobuje lýzu buněk. Tímto způsobem se AmB stává účinným antimykotikem (Lee *et al.*, 2023; Young *et al.*, 2003). Mechanismy rezistence kvasinek vůči polyenům zahrnují několik různých faktorů. Mezi tyto faktory patří změny v membránových sterolech, obranné mechanismy proti oxidativnímu poškození, defekty v genech pro biosyntézu ergosterolu, faktory ovlivňující složení mastných kyselin v buněčné membráně a také změny v poměru sterol-fosfolipid (McCarthy *et al.*, 2017). Rezistence na tato antimykotika není příliš častá u většiny druhů kvasinek rodu *Candida*. Nicméně kvasinka *Candida lusitanae* představuje výjimku, jelikož u ní dochází k projevům výrazné rezistence vůči těmto antimykotikům (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Tato rezistence vzniká mutacemi genů regulující biosyntézu ergosterolu. Příkladem může být gen ERG3 kódující Δ-5,6 sterol-desaturázu, nezbytnou pro tvorbu ergosterolu. Změněná exprese nebo mutace tohoto genu může ovlivnit citlivost kvasinek k antifungálním látkám. Mutace vedou k vyčerpání ergosterolu a akumulaci alternativních sterolů. Nedostatek ergosterolu mění strukturu buněčné stěny, a tak umožňuje kvasinkám odolat účinkům amfotericinu B (McCarthy *et al.*, 2017). Stejně jako rezistence vůči jiným antimykotikům i rezistence na amfotericin B jsou podmíněny stresovými reakcemi závislými na proteinu Hsp90. Chaperon Hsp90 hraje roli v odpovědi buňky na stres a je důležitý při vytváření rezistence na antimykotika (Lee *et al.*, 2023). Geny spojené s buněčným stresem konkrétně geny označené jako ERG5, ERG6 a ERG25 mají také významný vliv na citlivost buněk k antifungálním látkám. Kvasinky, které si vyvinuly rezistenci vůči amfotericinu B, vykazují vyšší aktivitu těchto genů, což naznačuje jejich zvýšenou expresi (McCarthy *et al.*, 2017).

Candida lusitaniae může získat sekundární rezistenci vůči všem těmto zmiňovaným třídám antimykotik (Borgeat *et al.*, 2021). Tato rezistence vzniká prostřednictvím různých molekulárních mechanismů (Obrázek 10), mezi které patří změny v cílové struktuře pro léčivo, zvýšená exkrece léčiva z buňky a aktivace buněčných drah stresové reakce. K těmto mechanismům rezistence dochází prostřednictvím různých specifických mutací v genomu kvasinky (Lee *et al.*, 2023; Wiederhold, 2017).

Rezistence významně komplikuje léčbu systémových mykóz, a to zejména u pacientů s oslabeným imunitním systémem (Lee *et al.*, 2023). V důsledku časté rezistence k amfotericinu B se doporučuje hledat alternativní antifungální látky. K dosažení účinné léčby infekcí způsobených kvasinkou *C. lusitaniae* je také nutné zvážit kombinovanou terapii nebo použití jiných antifungálních látek (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Některé studie zaměřující se na rezistenci klinických izolátů *Candida lusitaniae* vůči antimykotikům uvádějí zvýšenou rezistenci již po třech dnech kombinované antimykotické terapie. Tyto studie dále naznačují, že odolnost vůči antimykotiku amfotericinu B narůstá během devíti dnů léčby. Tato zjištění zdůrazňují důležitost systematictějšího monitorování a hodnocení účinnosti terapeutických postupů při léčbě infekcí způsobených touto patogenní kvasinkou (Scott *et al.*, 2023).



Obrázek 9 Mechanismy rezistence *Candida lusitaniae* k antimykotikům (upraveno dle Scherner *et al.*, 2011)

2.5.1. Testování citlivosti k antimykotikům

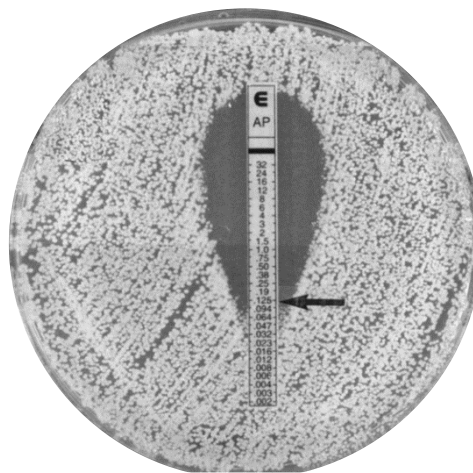
Testování citlivosti kvasinek a hub k antimykotikům je v klinické praxi velmi důležité. V klinických laboratořích se pro testování citlivosti k antimykotikům používají zejména techniky jako je diskový difúzní test (DDT), koncentrační gradient s využitím E-testu (Dannaoui a Espinel-Ingroff, 2019), či mikrodiluční techniky (Balouiri *et al.*, 2016). Výsledky testů mohou poskytnout informace o tom, která antimykotika jsou nejefektivnější proti konkrétním druhům kvasinek a hub (Dannaoui a Espinel-Ingroff, 2019).

Diskový difúzní test (**DDT**) patří mezi nejstarší metody používané pro stanovení citlivosti kvasinek k antimykotickým látkám. Tato metoda je stále široce používána v klinických laboratořích kvůli její nízké ceně a jednoduchosti technické proveditelnosti (Jeon *et al.*, 2021). Pro stanovení citlivosti k antimykotickým léčivům je důležité vytvořit definovanou suspenzi mikroorganismu (zpravidla stupeň 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice). Sterilním vatovým tamponem se homogenně inokuluje suspenze mikroorganismů na agarovou plotnu. Na takto připravenou plotnu se rovnoměrně aplikují disky obsahující antimykotické látky. Disky umístěné na kultivační médium způsobují okamžitou difúzi antimykotika do média. Po inkubaci se odečítají vytvořené inhibiční zóny a porovnávají se s referenčními hodnotami. Menší inhibiční zóny signalizují rezistenci, zatímco větší zóny mohou svědčit o citlivosti kvasinek k danému antimykotiku (Balouiri *et al.*, 2016).

Mikrodiluční test patří mezi základní metody pro testování citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Při této metodě se připravuje postupné dvojkové ředění antimikrobiální látky do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Následně se připraví mikrobiální suspenze (zpravidla stupeň 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice) a aplikuje se do každé jamky. Mikrotitrační destička se inkubuje za vhodných podmínek v závislosti na konkrétním mikroorganismu. Po inkubaci se pozoruje růst mikroorganismů v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zabraňuje viditelnému růstu mikroorganismů. Výsledky mohou být hodnoceny vizuálně nebo pomocí instrumentálních metod, jako jsou spektrofotometry nebo automatizované systémy (Balouiri *et al.*, 2016).

Metoda stripů s koncentračním gradientem antimikrobiální látky (**E-test**) spojuje princip diluční metody s agarovou difúzní technikou pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (Balouiri *et al.*, 2016). E-test používá plastové nosiče nebo papírové stripy s předdefinovaným a exponenciálním gradientem antimykotického léčiva. Suspenze testovaných mikroorganismů

by měla dosahovat 0,5 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Testování se tradičně provádí na RPIM médiu (Roswell Park Memorial Institute medium). Na připravenou agarovou plotnu se aplikuje suspenze mikroorganismů. Testovací strip se aplikuje na povrch kultivačního média a antimykotikum se okamžitě uvolní z nosiče, začne vytvářet kontinuální gradient testované látky v agarovém médiu (Balouiri *et al.*, 2016; Dannaoui a Espinel-Ingroff, 2019). Po inkubaci vznikne oblast inhibice růstu ve tvaru elipsy, jak je znázorněno na Obrázku 11. Minimální inhibiční koncentrace se určuje na průsečíku této elipsy s měřítkem na horní straně proužku (Dannaoui a Espinel-Ingroff, 2019).



Obrázek 10 Ukázka vyhodnocení MIC amfotericinu B u *Candida lusitanae* pomocí E-testu (upraveno dle Peyron *et al.*, 2001)

3. Virulenční vlastnosti *Candida lusitaniae*

Virulence je pojem označující míru patogenity, tedy schopnosti mikroorganismu způsobovat onemocnění. Virulence tedy popisuje stupeň patogenních vlastností daného mikroorganismu, které umožňují napadat hostitelský organismus a šířit se v něm. Tato schopnost se projevuje prostřednictvím tzv. faktorů virulence. Patogeny využívají tyto vlastnosti a signály k oslabení nebo obejití obranných mechanismů hostitele (Moraes Pontes *et al.*, 2020). Mezi faktory virulence řadíme struktury buněčného povrchu (pouzdro, lipopolysacharidy, glykoproteiny a lipoproteiny), či molekulární a buněčné mechanismy (Mello *et al.*, 2021). Mezi další faktory virulence patří rozmanité molekuly produkované mikroorganismy, jako např. toxiny, enzymy a exopolysacharidy (Leitão, 2020). Rovněž je známo, že intracelulární změny v metabolických regulačních drahách přispívají k celkové virulenci mikroorganismů (Mello *et al.*, 2021). Mikroorganismy tímto způsobem cíleně usilují o úspěšné šíření v hostitelském organismu a rozvoj infekce (Moraes Pontes *et al.*, 2020).

Adaptabilita kvasinky *Candida lusitaniae* na různé prostředí (vč. extrémních podmínek jako je nedostatek kyslíku nebo nepříznivý osmotický tlak) je spojena s určitými faktory virulence (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Tato schopnost hraje také klíčovou roli v patogenitě *C. lusitaniae*. Mezi faktory virulence této kvasinky patří např. schopnost adheze a invaze na povrchy hostitelských buněk, metabolická adaptace, dimorfismus, fenotypová variabilita, hydrofobicita buněčného povrchu, sekrece hydrolytických enzymů a tvorba biofilmů. Tyto faktory umožňují kvasince *C. lusitaniae* nejen přežít uvnitř hostitele, ale také s ním interagovat a napadat jej (Arafa *et al.*, 2023; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

3.1. Mechanismus adheze

Adheze je schopnost mikroorganismů přichytit se k povrchům buněk nebo jiných struktur (Willaert, 2018). Mikroorganismy podporují adhezi pomocí různých mechanismů, jako je produkce extracelulárních polysacharidů, formování buněk schopných detekovat signály, úprava náboje, hydrofobicita nebo pevnost buněčné stěny (Kreve a Reis 2021). Adheze je umožněna díky adhezním glykoproteinům (adheziny) umístěným na povrchu buněk a také díky imobilizovaným ligandům (kadheriny, integriny popř. jiné mikroorganismy) (Arafa *et al.*, 2023). Adheziny jsou důležité pro vzájemné interakce mezi buňkami kvasinek a jsou také zodpovědné za zprostředkování kontaktu mezi kvasinkou a hostitelem (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Adheze patogenních kvasinek k hostitelským tkáním může probíhat na různých místech

lidského těla. Cílem adheze patogenních kvasinek je glykokalyx hostitelských buněk. Glykokalyx je extracelulární síť sacharidově bohatých biomolekul vázaných na buněčné membrány nebo uvolňovaných buňkami do vnějšího prostředí. Adhesiny patogenních kvasinek mohou specificky interagovat s glykoproteiny glykokalyxu nebo glykosylovanými receptory hostitele. Tato specifická interakce umožňuje kvasinkám připojit se k povrchu hostitelských buněk a vyvolat tak infekci (Willaert, 2018).

Adheze *Candida lusitaniae* k hostitelským buňkám (zejména k buňkám epiteliálním) představuje zásadní počáteční krok v procesu vzniku infekce způsobené touto kvasinkou (Willaert, 2018). Kvasinka *C. lusitaniae* využívá různé adhezivní molekuly pro interakci s hostitelskými buňkami. Mezi geny kódující důležité adheziny této kvasinky patří ALS, EAP1, ECM33, HWP1, IFF4, INT1 a MP65. Mezi významné adheziny identifikované u kvasinky *Candida lusitaniae* řadíme skupinu adhezínů **Als** (*Agglutinin-like sequence*). Tyto glykoproteiny jsou kódované geny ALS (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022; Tscherner *et al.*, 2011) a přispívají ke schopnosti přilnout, a to nejčastěji na sliznici dutiny ústní. Dalším adhezivním proteinem je **Ecm33**. Tento protein přispívá k celistvosti buněčné stěny kvasinky. Adhezin **Iff4** se podílí na organizaci buněčné stěny a růstu hyf. Další významnou adhezivní molekulou *C. lusitaniae* je manoprotein **Mp65**. Tento protein přispívá k adhezi kvasinky na glukany buněčné stěny hostitele. Tyto adhezivní proteiny umístěné na povrchu kvasinkových buněk navozují interakce, které umožňují pevné spojení s hostitelskými buňkami (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Přilnutím k buněčnému povrchu může kvasinka maskovat svou přítomnost a snížit pravděpodobnost, že bude rozpoznána a napadena imunitními buňkami. Tímto způsobem se může zvýšit schopnost kvasinky přežít v hostitelském organismu a rozvíjet infekci (Hernández-Chávez *et al.*, 2017). Je však známo, že kvasinka *Candida lusitaniae* vykazuje nižší schopnost adheze v porovnání s jinými zástupci rodu *Candida*. Tato vlastnost je spojena s nižší mírou virulence a naznačuje omezenou schopnost způsobit infekci na rozdíl od jiných patogenních druhů kvasinek z rodu *Candida*. V klinické praxi má proto adheze *C. lusitaniae* značný význam zejména v případě invazivních infekcí u pacientů s oslabeným imunitním systémem nebo v důsledku opakovaných chirurgických zákroků (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

3.2. Mechanismus invaze

Invaze nastává po úspěšné adhezi mikroorganismů na hostitelské buňky a označuje schopnost mikroorganismů proniknout do buněk hostitele. Samotný proces invaze, zahrnující poškození epitelu, je považován za patogenní mechanismus (Arafa *et al.*, 2023; Mendoza-Reyes *et al.*,

2022). K invazi může docházet aktivní penetrací skrz buněčnou membránu do hostitelské buňky nebo také procesem endocytózy. Endocytóza je buněčný proces, během kterého buňka vytváří malou vezikulu obklopující a pohlcující části vnějšího prostředí, vč. buněk patogenů (Mayer *et al.*, 2013). Avšak mechanismus invaze závisí na typu hostitelské buňky. Během invaze do buněk dutiny ústní se využívá aktivní penetrace a endocytóza, zatímco při střevní invazi může docházet pouze k aktivní penetraci (Arafa *et al.*, 2023; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

K procesu invaze kvasinky *Candida lusitaniae* do hostitelského organismu přispívají další různé mechanismy, vč. produkce toxinů a enzymů, fenotypové variability a tvorby biofilmu. Tyto mechanismy mají také významnou roli v patogenezi infekcí způsobených touto kvasinkou (Arafa *et al.*, 2023).

3.3. Dimorfismus kvasinek

Dimorfismus je schopnost některých mikroorganismů měnit svou morfologii nebo formu v závislosti na okolních podmínkách (Knop, 2011). Dimorfismus u kvasinek je charakterizován přechodem mezi kvasinkovou a vláknitou (hyfovou nebo pseudohyfovou) formou. Tento proces je jedinečnou charakteristikou patogenity kvasinek (Gauthier, 2015). Všechny formy kvasinek mají své specifické charakteristiky, které mohou přispět k jejich virulenci a způsobit tak onemocnění. Kvasinková forma je spojována s adhezí na povrchu buněk hostitele. Zatímco pseudohyfová nebo hyfová forma může hrát roli v prorůstání do tkání a šíření se v hostitelském prostředí (Knop, 2011). Dimorfismus kvasinek je ovlivněn řadou vnějších podmínek jako je např. pH, teplota, koncentrace CO₂. Některé mikroorganismy tyto signály detekují a přizpůsobují tak přechod mezi formami svého výskytu v závislosti na prostředí (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

Dimorfismus u *Candida lusitaniae* představuje zajímavou oblast výzkumu. Tato kvasinka vykazuje unikátní charakteristiky ve svém přechodu mezi kvasinkovou a vláknitou formou. Zatímco většina druhů *Candida* může vytvářet tradiční hyfy, *Candida lusitaniae* je schopna vytvářet pouze tzv. pseudohyfy. Pseudohyfy jsou řetězce buněk spojených do vláknitých struktur, a to méně diferencovaných než pravé hyfy. Tato schopnost *Candida lusitaniae* přispívá rozvoji k invazivním infekcím a komplikovanějším klinickým stavům (Knop, 2011; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Schopnost morfologické variability je u této kvasinky také často spojována s tvorbou biofilmů, což zvyšuje schopnost *C. lusitaniae* přežít v hostitelském organismu a vyvolávat infekce (Arafa *et al.*, 2023; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

3.4. Fenotypová variabilita

Fenotypová variabilita je schopnost mikroorganismů měnit svůj vnější projev (fenotyp) v reakci na různé podmínky prostředí. U *Candida lusitanae* má tato schopnost důležitou roli v adaptaci na různé podmínky a úzce souvisí s její virulencí. Schopnost měnit svůj fenotyp umožňuje kvasince *C. lusitanae* přizpůsobit se podmínkám prostředí a být úspěšnější v napadení hostitele (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Fenotypová variabilita má významnou roli také ve změnách genové exprese u *C. lusitanae*. Mezi tyto změny genové exprese patří i změny, které mohou ovlivnit citlivost *C. lusitanae* k AmB a dalším antimykotikům (Miller *et al.*, 2006). Studie zaměřená na fenotypovou variabilitu *Candida lusitanae* odhalila, že kultivace této kvasinky v laboratorních podmínkách iniciuje různorodé změny v jejím vnějším projevu např. změny kultivačních projevů (vzhled a barva kolonií). Kolonie světle hnědé a bílé barvy obsahovaly pouze klasické kvasinkové buňky, zatímco tmavě hnědé kolonie obsahovaly kvasinky ve formě pseudohyf. Při testování citlivosti k amfotericinu B bylo zjištěno, že buňky rostoucí ve formě světle hnědých kolonií vykazovaly nižší minimální inhibiční koncentraci (2–4 µg/ml). Buňky rostoucí ve formě tmavě hnědých kolonií vykazovaly vyšší MIC (8 µg/ml) a buňky rostoucí ve formě bílých kolonií měly nejvyšší MIC (256 µg/ml). Tyto výsledky naznačují, že variabilita ve fenotypu souvisí s mírou rezistence *Candida lusitanae* k antimykotikům (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

3.5. Hydrofobicita buněčné stěny

Hydrofobicita buněčného povrchu je schopnost buněk odolávat vodě a upřednostňovat nepolární látky. Tato vlastnost závisí na složení a struktuře buněčných stěn a membrán mikroorganismů. Za hydrofobní chování buněčných membrán zodpovídá přítomnost nepolárních molekul, jako je kyselina teichoová a lipoteichoová, lipopolysacharidy a některé povrchové proteiny (Salas-Tovar *et al.*, 2021). Hydrofobnost buněčného povrchu má zásadní význam při přilnutí nebo odloučení buněk mikroorganismů z povrchů hostitelských buněk (Krasowska a Sigler 2014). Tato vlastnost umožňuje kvasinkám vytvářet hydrofobní interakce s povrchem hostitelských buněk (Nordin a Harun, 2013). Povrchová hydrofobicita buněčné stěny má také významný vliv na schopnost kvasinek vytvářet biofilm na inertních površích. Dále může povrchová hydrofobicita ovlivňovat schopnost mikroorganismů unikat imunitním obranným mechanismům hostitele (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

Povrchová hydrofobicita buněčné stěny taktéž podporuje virulenci a hraje významnou roli v patogenezi *Candida lusitaniae*. Tato kvasinka však vykazuje významně nižší povrchovou hydrofobicitu buněčné stěny oproti jiným druhům kvasinek z rodu *Candida* (např. *C. krusei*, *C. dubliniensis* a *C. tropicalis*). Snížená hydrofobicita buněčné stěny *Candida lusitaniae* může ovlivňovat interakce s hostitelským prostředím, což se projevuje méně efektivní adhezí a invazí buněk do hostitelského organismu (Muadcheingka a Tantivitayakul, 2015; Nordin a Harun, 2013). Tyto aspekty opět naznačují, že tato kvasinka nebude schopná vyvolat onemocnění v hostiteli v takové míře jako ostatní druhy z rodu *Candida* (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

3.6. Produkce hydrolytických enzymů

Extracelulární hydrolytické enzymy (např. fosfolipázy, aspartylproteinázy a lipázy) podporují invazi mikroorganismů. Tyto enzymy degradují hostitelské proteiny a modifikují struktury buněčných membrán. Tento proces tak umožňuje mikroorganismům cíleně proniknout a napadnout imunitní buňky hostitele. Kandidy, a to vč. kvasinky *Candida lusitaniae*, jsou schopné produkovat mnohé hydrolytické enzymy (Arafa *et al.*, 2023). Extracelulární hydrolytické enzymy jsou důležité faktory virulence kvasinek rodu *Candida* (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Tyto enzymy mají význam pro patogenní účinek. Díky těmto enzymům se kvasinky úspěšně vyhýbají účinkům antimikrobiálních látek a aktivně vyvolávají infekce (Arafa *et al.*, 2023; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

3.6.1. Lipázy

Lipázy jsou důležitou skupinou ve vodě rozpustných enzymů. Tyto enzymy patří mezi dobře popsané biokatalyzátory biologických reakcí (Gupta *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2022). Lipázy mají společný charakteristický záhyb α/β -hydrolázy kolem katalytické triády. Struktura α/β -hydrolázy obvykle zahrnuje osm β -řetězců spojených s α -helixy (Lim *et al.*, 2022). Tato struktura umožňuje lipázám katalyzovat hydrolytické štěpení esterových vazeb v nerozpustných substrátech, jako jsou triglyceridy. Tato reakce vede k vytváření diglyceridů, monoglyceridů a mastných kyselin, čímž lipázy zpřístupňují tuky pro další metabolické využití jako zdroje energie. Lipázy byly rozpoznány jako faktor podporující virulenci kvasinek *Candida* tím, že přispívají k morfologickému přechodu, kolonizaci a cytotoxicitě (Angiolella *et al.*, 2024). Tyto enzymy se také podílejí na invazi do hostitelských tkání. Po invazi do tkání modifikují membránové lipidy, což má vliv na imunitní odpověď hostitele. Lipázy se současně podílejí na tvorbě a udržování biofilmů, čímž ještě více přispívají k odolnosti vůči imunitním

reakcím a terapeutickým zásahům. Tyto enzymy slouží dále také jako prostředek pro získávání živin a energie pro kvasinky vč. *Candida lusitaniae* (Gupta *et al.*, 2015).

3.6.2. Fosfolipázy

Fosfolipázy představují heterogenní skupinu enzymů se schopností hydrolyzovat jednu nebo více esterových vazeb fosfolipidů. Prostřednictvím hydrolyzy esterových vazeb dochází k destabilizaci membrán a následnému uvolňování mastných kyselin z fosfolipidů (Balboa a Balsinde, 2021). Uvolněním mastných kyselin z fosfolipidů dochází k narušení buněčné membrány. Kvasinky pronikají narušenými buněčnými membránami do hostitelského organismu a jsou schopné kolonizovat vnitřní orgány hostitele. Regulace aktivity těchto enzymů je umožněna prostřednictvím genové exprese. Díky tomuto mechanismu může docházet ke zvýšení nebo snížení exprese genů pro tvorbu fosfolipáz v závislosti na potřebách buňky nebo podmínkách prostředí. Poruchy této regulace mohou mít negativní dopady, protože fosfolipázy mají důležitý význam při hydrolyze fosfolipidů v membránách a tím ovlivňují integritu a funkce membrán (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

3.6.3. Sekretované aspartylproteázy

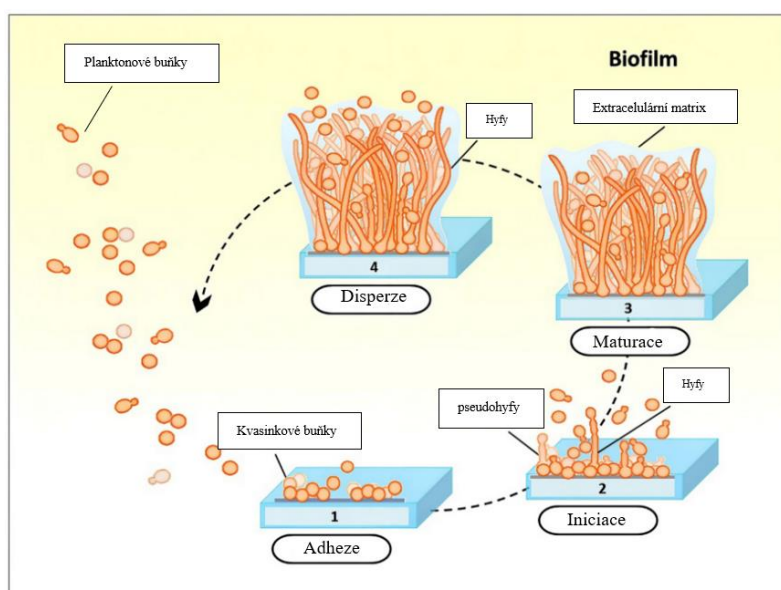
Sekretované aspartylproteázy (Saps) jsou enzymy řazené do třídy proteáz. Aspartylproteázy jsou v přírodě všudypřítomné a účastní se nesčetných biochemických procesů. Tyto enzymy představují skupinu 10 proteáz kódovaných geny SAP1 až SAP10. Geny SAP1 až SAP8 kódují proteázy vylučované do vnějšího prostředí, zatímco geny SAP9 a SAP10 kódují proteázy umístěné v membráně. První aspartylproteáza získala název **kyselá proteáza *Candida***, protože byla izolována z kvasinek rodu *Candida* a projevovala svou aktivitu i při nízkém pH (Guimarães *et al.*, 2019). Aspartylproteázy jsou důležité pro aktivní pronikání kvasinek do buněk hostitele. Tyto enzymy mají schopnost štěpit proteiny obsažené v hostitelských tkáních na jednodušší a využitelné formy (aminokyseliny). Aspartylproteázy tímto umožňují kvasinkám využívat různé hostitelské proteiny jako zdroj dusíku pro svůj vývoj a metabolismus. Tato vlastnost také přispívá k patogenezi *Candida lusitaniae* (Guimarães *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019). Aspartylproteázy dále umožňují *Candida lusitaniae* překonat obrannou reakci imunitního systému tím, že degradují složky vrozeného imunitního systému např. slinný laktoferin, laktoperoxidáza, katepsin D, komplement, interleukin-1 β a α 2-makroglobulin (Gómez-Gaviria *et al.*, 2022; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Sekretované aspartylproteázy vykazují optimální aktivitu v širokém rozmezí pH 2,5–7 (Guimarães *et al.*, 2019). Nejaktivnější jsou však při hodnotách pH 1,9–4,0. Široké rozmezí pH umožňuje

kvasinkám napadnout a kolonizovat různá hostitelská místa. Tyto schopnosti usnadňují kvasinkám pronikat do různých hostitelských tkání a přispívají k rozvoji infekcí způsobených kvasinkou *Candida lusitanae* (Guimarães *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019).

3.7. Tvorba biofilmu

Biofilm představuje uspořádané společenství mikroorganismů adheovaných k živému či neživému povrchu. Toto mikrobiální společenství vytváří vlastní extracelulární polymerní matici (Shree *et al.*, 2023). Extracelulární matrice (EPS) má variabilní složení v závislosti na konkrétním druhu mikroorganismu, přičemž hlavními složkami jsou proteiny, sacharidy, nukleové kyseliny a lipidy (Kassinger a van Hoek, 2020; Santos *et al.*, 2018). Tyto složky vzájemně interagují a utvářejí gelovitý, slizký materiál s odpovídajícími mechanickými vlastnostmi a odolností vůči vnějším nepříznivým podmínkám (Kreve a Reis, 2021). Polymerní extracelulární matrice plní funkci ochrany mikroorganismů před antimikrobiálními látkami. V rámci EPS se vytváří složitá síť kanálků umožňující cirkulaci kapalin a plynů v biofilmu. Tyto kanálky fungují jako zásobovací a odvodňovací systém pro transport živin, kyslíku a odpadních produktů. EPS také napomáhá vytváření trojrozměrných polymerních struktur biofilmu a zároveň poskytuje podporu mikroorganismům při adhezi (Kreve a Reis 2021)

Tvorba mykotického biofilmu představuje víceúrovňový a komplexní proces zahrnující přechod mikroorganismů z volné planktonické formy do přisedlé formy vytvářející biofilm. Proces tvorby mykotického biofilmu je znázorněn na Obrázku 12.



Obrázek 11 Schématické znázornění tvorby biofilmu (upraveno dle Arafa *et al.*, 2023)

Proces tvorby biofilmu je ovlivněn různými vnějšími faktory, jako je teplota, pH, gravitační síly, Brownův pohyb, hydrodynamické síly, vlastnost povrchu či přítomnost signálních molekul (Rather *et al.*, 2021).

Prvním krokem tvorby biofilmu je adheze buněk k povrchům. Adheze spouští proliferaci, kvasinkové buňky rostou do vláknitých forem (hyfy a pseudohyfy) a akumulují extracelulární polysacharidovou matrix (Arafa *et al.*, 2023; Zara *et al.*, 2020). Extracelulární polysacharidová matrix má důležitou roli během vývoje biofilmu. Zralý biofilm je tvořen třívrstevnou strukturou obsahující vnitřní regulační vrstvu, střední mikrobiální základní vrstvu a vnější vrstvu, která je tvořena planktonní formou mikroorganismů (Rather *et al.*, 2021). Konečným krokem tvorby biofilmu je disperze buněk. Při disperzi se kvasinkové buňky rozptýlí z biofilmu, dále difundují, rozšiřují infekci a celý cyklický proces spouštějí znovu (Arafa *et al.*, 2023).

Biofilmy se nacházejí téměř všude, kolonizují lékařské implantáty, živé tkáně, nemocniční povrchy, biotické a abiotické povrchy. Dále se mohou vyskytovat na zařízení pro zpracování potravin, ve vodních kanálech a potrubí (Rather *et al.*, 2021). Biofilmy mohou také přispívat k biologickému znečištění a vzniku onemocnění (Kassinger a van Hoek, 2020). Odolná struktura biofilmu výrazně komplikuje léčbu pomocí běžně dostupných antimykotických léčiv (Zara *et al.*, 2020). Biofilmy sehrávají významnou úlohu při infekcích souvisejících s použitím biomateriálů či medicínských pomůcek (Rather *et al.*, 2021). Kandidy jsou také schopny vytvářet biofilmy na sliznicích nebo endotelech. Tyto biofilmy mají zásadní význam v rozvoji běžných kandidóz, vč. vaginální a orální kandidózy (Cavalheiro a Teixeira, 2018).

Nicméně některé mikrobiální biofilmy jsou také spojeny s udržováním lidského zdraví. Mikroorganismy tvořící biofilmy v lidském těle jsou součástí symbiotických mikroorganismů, označovaných jako lidský mikrobiom (Renner a Weibel, 2011). Lidský mikrobiom má významnou roli při udržování rovnováhy a vývoje lidského těla. Je důležitý pro regulaci trávení, imunitní odpovědi, energetický metabolismus a je spojován s neurologickými procesy, což zdůrazňuje jeho význam pro celkové zdraví a homeostázu organismu (Ogunrinola *et al.*, 2020).

Kvasinka *Candida lusitaniae* se také vyznačuje schopností tvořit biofilmy. Biofilmy umožňují této kvasince přežít v různých prostředích a dynamicky se přizpůsobovat měnícím se podmínkám. Jsou také významné v klinickém ohledu, protože mohou přispívat k odolnosti vůči léčbě a souviset s infekcemi u jedinců s oslabeným imunitním systémem (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022; Rather *et al.*, 2021). Podobně jako ostatní druhy kvasinek, i *C. lusitaniae* může

přilnout např. k plastovým povrchům, zavedeným katetrům, kanylám a drenům. Tato schopnost je důležitá zejména v klinickém prostředí, kde mohou biofilmy vést ke komplikacím a infekcím (Arafa *et al.*, 2023). Některé studie zabývající se kvasinkami *Candida lusitaniae* odhalily, že schopnost vytvářet biofilmy je podstatně ovlivněna specifickým kultivačním médiem. *C. lusitaniae* dobře přilnula k povrchu, pokud rostla v minimálním médiu YNB (Yeast Nitrogen Base medium). Avšak v tkáňovém kultivačním médiu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium). Tyto výsledky poukazují na to, že složení a podmínky prostředí mají významný vliv na tvorbu biofilmů u *C. lusitaniae* (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

3.8. Termotolerance

Termotolerance je schopnost buněk získat přechodnou odolnost vůči zvýšeným teplotám prostředí. Tato schopnost přispívá ke kolonizaci a růstu kvasinek v hostitelském prostředí. Teplota hostitele většinou převyšuje optimální podmínky pro růst kvasinek a hub. Přizpůsobení kvasinek tomuto stresujícímu prostředí je klíčové pro celkovou buněčnou odolnost a schopnost způsobovat poškození hostitelských buněk (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Proteiny tepelného šoku (Hsp) jsou přítomny ve většině organismů a jsou exprimovány v reakci na teplotní stres. Tyto proteiny vykonávají základní fyziologické aktivity a mohou ovlivňovat virulenci prostřednictvím interakce s různými regulátory buněčných signálních drah (Gong *et al.*, 2017).

Genom *C. lusitaniae* obsahuje předpokládané ortology genů pro termotoleranci, vč. Hsp104 a Hsp60, které kódují proteiny tepelného šoku (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Protein Hsp104 má významnou úlohu v termotoleranci. Tento protein má schopnost regulovat procesy či reakce vedoucí k přežití buněk v odpovědi při zvýšené teplotě. Hsp104 je důležitý pro efektivní tvorbu biofilmu a přispívá tak k virulenci kvasinek. V přítomnosti Hsp104 vytvářejí kvasinky biofilmy tzv. spleteného vzhledu. Avšak pokud Hsp104 chybí nebo je mutovaný, struktura hyf je nerovnoměrná a volná. Tyto změny vedou k oslabení schopnosti kvasinek způsobovat infekci (Gong *et al.*, 2017).

Protein Hsp60 působí jako imunodominantní antigen v humorální i buněčné odpovědi. Tento protein funguje jako výrazně rozpoznatelný prvek usnadňující aktivaci imunitního systému. (Gong *et al.*, 2017). Když je kvasinka vystavena teplotě nad 35 °C, exprese Hsp60 se zvyšuje. Existuje křížová reaktivita mezi Hsp60 u kvasinek a Hsp60 u lidí. Křížová reaktivita znamená, že imunitní systém může reagovat na Hsp60 u kvasinek stejně jako na humánní formu Hsp60. Křížová reaktivita naznačuje, že imunitní systém aktivovaný kvasinkovou infekcí může

následně napadat lidské vlastní buňky obsahující protein Hsp60. Tento proces může vést k autoimunitní reakci (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022; Gong *et al.*, 2017).

3.9. Únik před reakcí imunitního systému

Imunitní systém hostitele je rozhodujícím faktorem při rozpoznávání patogenů a aktivaci obranné odpovědi (Hernández-Chávez *et al.*, 2017). Imunitní systém reaguje na detekci kvasinkových buněk prostřednictvím aktivace fagocytózy. Fagocytární receptory pro rozpoznávání vzorů (PRR) mají při této reakci důležitou roli. PRR (*Pattern Recognition Receptors*) jsou exprimovány na povrchu buněk imunitního systému jako jsou makrofágy a neutrofilů. Tyto receptory jsou schopny rozpoznat specifické molekulární struktury na povrchu patogenních buněk PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Jakmile jsou patogenní buňky rozpoznány, jsou fagocytovány buňkami imunitního systému a fagocytární PRR spouští obranné imunitní reakce (Boyce a Andrianopoulos 2015).

Únik před reakcí imunitního systému představuje komplexní proces zahrnující formování biofilmu, produkci proteáz, morfologické změny a syntézu proteinů za účelem překonání oxidačního stresu. Tyto adaptace umožňují kvasinkám přežít v hostitelském prostředí a způsobit infekci s minimálním odporovým účinkem imunitního systému (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022).

U některých kvasinek se vyvinuly strategie vedoucí k určitým obranným reakcím proti imunitnímu systému. Únik před reakcí imunitního systému stejně jako faktory virulence výrazně ovlivňuje poškození tkání a buněk hostitele (Hernández-Chávez *et al.*, 2017). Mezi strategie kvasinek vedoucí k úniku před reakcí imunitního systému, patří např. schopnost kvasinek flexibilně přepínat mezi různými morfologickými formami (Arafa *et al.*, 2023; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022) jak již bylo výše zmíněno. Vlákničitá morfologie vede k perforaci imunitních buněk a umožňuje tak patogenním buňkám úniku. Tato morfologie také zajišťuje přežívání a šíření kvasinkových buněk v hostitelském organismu (Gómez-Gaviria *et al.*, 2022; Hernández-Chávez *et al.*, 2017).

V rámci některých studií byly identifikovány dva možné ortology genů *C. lusitaniae*, a to Hgt1 a Msb2, podobné s geny popsány u *Candida albicans* (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Gen Hgt1 působí jako inhibitor komplementu, potlačuje fagocytózu a ničí neutrofilů. Tento proces přispívá k přežití kvasinky v hostiteli. Msb2 je signální mucin umožňující přežití a růst kvasinek v infikovaném hostiteli. Glykodoména tohoto proteinu je vylučována za účelem

štěpení plazmatických membránových proteinů a zároveň inaktivuje širokou škálu antimikrobiálních peptidů vazbou na ně. Tato schopnost umožňuje kvasince uniknout před imunitním systémem hostitele (Gómez-Gaviria *et al.*, 2022; Hernández-Chávez *et al.*, 2017).

4. Onemocnění v souvislosti s kvasinkou *Candida lusitaniae*

Candida lusitaniae je méně častým druhem způsobujícím onemocnění člověka. Avšak v posledních letech se podílí na rostoucím počtu oportunních infekcí, a to zejména u hospitalizovaných a imunokompromitovaných pacientů (Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). *Candida lusitaniae* byla identifikována jako původce různých typů infekcí vč. kožní, slizniční kandidózy a také invazivních systémových infekcí (Rasool *et al.*, 2023).

Kandidóza je infekce způsobená kvasinkami rodu *Candida*. Tato infekce může postihnout různé části těla, vč. dutiny ústní, urogenitálního traktu, kůže, orgánů a krevního řečiště (Arafa *et al.*, 2023). *Candida albicans* je nejčastějším druhem kvasinky způsobující kandidózu. Nicméně i další druhy rodu *Candida* mohou být původci kandidózy (např. *Candida lusitaniae*). Ačkoli je *C. lusitaniae* relativně vzácná, začíná být považována za nosokomiální patogen. Důvodem je rostoucí výskyt infekcí způsobených touto kvasinkou, a to zejména u hospitalizovaných pacientů, imunokompromitovaných pacientů, pacientů dlouhodobě léčených antibiotiky a pacientů podstupujících chemoterapii nebo transplantaci kostní dřeně (Lu *et al.*, 2023; Mendoza-Reyes *et al.*, 2022). Kromě orální kandidózy, kandidémie a infekcí močových cest může *Candida lusitaniae* způsobit i meningitidu, empyém nebo peritonitidu (Rasool *et al.*, 2023).

4.1. Orální kandidóza

Orální kandidóza je kvasinková infekce způsobená přemnožením kvasinek rodu *Candida* v dutině ústní. Mezi příznaky orální kandidózy patří podráždění či zarudnutí sliznice a také bílé nebo žluté plaky na jazyku, dásních či bukalní sliznici. Hlavní příčinou způsobující přemnožení kvasinek rodu *Candida* v dutině ústní je oslabení imunitního systému, leukémie, podvýživa, používání zubních protéz a inhalátorů kortikosteroidů. Mezi faktory podporující vznik orální kandidózy můžeme řadit také užívání antibiotik, hormonální změny či špatnou ústní hygienu (Millsop a Fazel, 2016). Kvasinka *Candida lusitaniae* nepatří mezi nejčastější původce orální kandidózy, je však schopna toto onemocnění vyvolat. Orální kandidóza způsobená *Candida lusitaniae* se projevuje nepříjemným pálením a obtížemi při polykání. V dutině ústní se objevují difúzní erytematózní a erozivní oblasti zejména na tvrdém i měkkém patře a povrch jazyka bývá taktéž erytematózní (Fusco *et al.*, 2023). Mezi rizikové faktory rozvoje orální kandidózy způsobené druhem *C. lusitaniae* patří dlouholeté silné kuřáctví, předchozí zákroky v ústní dutině, antibiotická nebo steroidní terapie, imunodeficience či aplikace lokálních hygienických

prostředků. Tyto faktory společně vytvářejí prostředí, které může podporovat růst *Candida lusitaniae* v ústní dutině a přispívat k rozvoji orální kandidózy (Fusco *et al.*, 2023). Pro určení diagnózy se kromě klinických příznaků a fyziologických nálezů využívají i laboratorní testy. Laboratorní diagnostika orální kandidózy je klíčovým krokem při potvrzení této infekce. Proces začíná odběrem vzorku z postižené oblasti v dutině ústní, který může být proveden různými způsoby (stěr tamponem, ústní výplach či otisk postižené oblasti). Získaný vzorek může být mikroskopicky analyzován pro zjištění morfologie kvasinek. Vzorky se dále inokulují na speciální živné médium jako je Sabouraudův agar s glukózou či na chromogenní média umožňující identifikaci konkrétního druhu kvasinky. Také se provádí testování citlivosti na různá antimykotika. Pokročilejší metody mohou zahrnovat biochemické testy či molekulárně-biochemické postupy pro přesnější identifikaci druhu kvasinek (Lewis a Williams, 2017). Výsledky laboratorních testů jsou důležité pro stanovení správné léčby orální kandidózy. Léčba orální kandidózy způsobená kvasinkou *Candida lusitaniae* může být komplexní a vyžaduje individuální přístup. Hlavním cílem léčby je potlačení přemnožení kvasinek a zmírnění příznaků infekce. Jednou z možností je podávání antifungálních přípravků (např. flukonazol, itraconazol nebo amfotericin B). Volba konkrétního léku však závisí na závažnosti infekce, celkovém zdravotním stavu pacienta a citlivosti kvasinky na dané antimykotické léčivo. V některých případech může být nutné kombinovat různé typy antimykotických léčiv. Důležitou roli hraje pravidelné monitorování účinnosti léčby a případná úprava léčebného režimu podle výsledků laboratorních testů a klinického stavu pacienta. Kromě lékové terapie je důležité identifikovat a odstranit faktory přispívající k rozvoji orální kandidózy (Fusco *et al.*, 2023; Lewis a Williams, 2017).

4.2. Infekce močových cest v souvislosti s kvasinkou *Candida lusitaniae*

Infekce močových cest (UTI) patří mezi nejběžnější infekce u lidí. Jedná se o stav, při kterém dochází k napadení a rozmnožení patogenních mikroorganismů v kterékoli části urogenitálního traktu. Tyto infekce jsou častým důvodem návštěvy lékaře a jejich výskyt v poslední době významně narůstá. Infekce močových cest zahrnují zánětlivou reakci spojenou s bakteriemi, kvasinkami či viry (Tomczak *et al.*, 2014). Ačkoliv bývají UTI nejčastěji způsobeny bakteriemi, mezi původce mykotických infekcí močových cest patří kvasinky rodu *Candida*. Jedním z druhů kvasinek vyvolávajících UTI jsou kvasinky *Candida lusitaniae*. Tyto kvasinky jsou součástí lidské mikroflóry, mohou se však za určitých okolností nadměrně množit a způsobovat infekce. Přítomnost kvasinek *Candida* v moči se označuje jako kandidurie.

Zatímco u asymptomatických dospělých osob bývá kandidurie často považována za pouhou kolonizaci nebo kontaminaci vzorku, je důležité ji neignorovat. Kandidurie totiž může signalizovat skutečnou infekci močových cest, vulvovaginální kandidózu nebo dokonce diseminovanou kandidémií (Gajdács *et al.*, 2019). Kvasinky rodu *Candida* mohou pronikat do močového traktu dvěma hlavními cestami. Antegrádní infekce zahrnuje přenos kvasinek krví do ledvin. Tento proces následně vede k infekci těchto orgánů. Druhým způsobem je retrográdní infekce, kvasinky prostupují močovou trubicí a pronikají do močového měchýře. Tento typ infekce začíná obvykle v nižších částech močového traktu a může se postupně šířit dále (Odabasi a Mert, 2020). Rizikové faktory pro vznik infekcí močových cest způsobených kandidou jsou dobře známé. Mezi tyto faktory patří *diabetes mellitus*, dlouhodobá hospitalizace, pobyt na jednotce intenzivní péče a nedávné užívání imunosupresiv. Mezi další rizikové faktory patří také poruchy močového měchýře a močové stagnace, přítomnost močových kamenů v ledvinách, transplantace, vrozené nebo strukturální abnormality močových cest (Gajdács *et al.*, 2019). Používání širokospektrých antibiotik může narušit přirozenou flóru v gastrointestinálním a urogenitálním traktu, což vytváří příznivé podmínky pro růst *Candida lusitanae* a následný rozvoj kandidurie. Zavedené močové katétry narušují fyziologické a mikrobiologické bariéry usnadňující vstup kvasinek do urogenitálního traktu (Gajdács *et al.*, 2019; Odabasi a Mert, 2020).

Vzhledem k anatomickým rozdílům bývá kandidurie typicky častější u žen, zejména díky kratší délce močové trubice a vyšší pravděpodobnosti kolonizace *Candida* v oblasti vulvy a vestibulu (Gajdács *et al.*, 2019; Odabasi a Mert, 2020). Infekce močových cest se obvykle diagnostikují na základě přítomnosti příznaků (pálení a řezání při močení, častá potřeba močení, bolesti v podbříšku a přítomnost krve v moči). Diagnosticky významné je kultivační vyšetření moči, které identifikuje a kvantifikuje přítomné kvasinky nebo bakterie (Car, 2006; Schmiemann *et al.*, 2010). U pacientů s asymptomatickou kandidurií se doporučuje nejprve vyloučit kontaminaci opakovanou kultivací moči. Pokud jsou opakované kultivace negativní na *Candida*, jedná se o kontaminaci. U pacientů se zavedenými močovými katétry by měla být kultivace provedena další den po výměně katétru. Léčba poté závisí na závažnosti a příčině infekce (Odabasi a Mert, 2020). V případě mykotických infekcí se k léčbě používají nejčastěji antimykotika ze skupiny azolů (flukonazol, itraconazol) nebo polyenů (AmB). Je nezbytné provést kultivaci ke stanovení citlivosti původce. U rezistentních kmenů může být nutná kombinovaná léčba. Celkově je kladen důraz na včasnou a přesnou diagnostiku, cílenou antimykotickou léčbu dle výsledků kultivace a podpůrnou symptomatickou terapii při akutních

obtížích. U rizikových pacientů, jako jsou těhotné ženy nebo imunokompromitovaní jedinci, je průběh infekcí monitorován se zvýšenou pozorností (Car, 2006; Odabasi a Mert, 2020).

4.3. Kandidémie

Kandidémie je označení pro infekci krevního řečiště způsobené kvasinkami rodu *Candida*. Jedná se o jeden z nejzávažnějších projevů invazivní kandidózy. Klinické projevy kandidémie jsou nespecifické a mohou se projevit širokým spektrem příznaků, typických pro infekce krevního oběhu. Tyto příznaky zahrnují zimnici, třes a horečku a mohou postupovat až k těžké sepsi a septickému šoku s možným poškozením orgánů. Kandidémie se často objevuje u hospitalizovaných pacientů, zejména u těch, kteří mají oslabený imunitní systém (Pappas *et al.*, 2018). Dalšími důležitými rizikovými faktory vzniku kandidémie je přítomnost hematologických malignit či alogenní transplantace hematopoetických buněk (Lortholary *et al.*, 2017). Avšak kandidémie způsobená *Candida lusitanae* je relativně vzácná. Tato infekce může být závažná a obtížně léčitelná, zejména kvůli rezistenci *C. lusitanae* vůči některým antifungálním léčivům. Nejvýraznějším projevem kandidémie způsobené druhem *Candida lusitanae* jsou přetrvávající horečkové stavy. Laboratorní diagnostika pro identifikaci kvasinky *Candida lusitanae* zahrnuje odběr vzorku krve pro hemokulturu. Kvasinky izolované z hemokultur jsou následně identifikovány pomocí metody MALDI-TOF MS na základě jejich hmotnostního spektra (Apsemidou *et al.*, 2020; Sinhal *et al.*, 2015). Dále se provádí testování citlivosti izolovaných kvasinek na antimykotická léčiva. Mezi nejčastější antimykotická léčiva pro léčbu těchto infekcí se používají kaspofungin, amfotericin B či flukonazol. Léčba je zaměřena na potlačení růstu a šíření kvasinky *Candida lusitanae* v krevním řečišti a snižuje riziko komplikací spojených s invazivní kandidémií. Důležitým faktorem v léčbě tohoto onemocnění je detailní určení druhu patogenu, testování citlivosti na antimykotika a důsledná kontrola všech souvisejících faktorů podporující vznik onemocnění (Apsemidou *et al.*, 2020).

4.4. Empyém plic v souvislosti s kvasinkou *Candida lusitanae*

Empyém je infekční onemocnění, při kterém se v pleurální dutině (prostor mezi plicí a hrudní blanou) hromadí hnis nebo hnisavý výpotek. Tato infekce může být ohraničená na určitou část pleurální dutiny, nebo se může rozšířit a zasáhnout celý její prostor. Výskyt empyému se v posledních letech stále zvyšuje (Rasool *et al.*, 2023; Tenconi a Waller 2014). U starších a chronicky oslabených pacientů může smrtelnost na toto onemocnění dosáhnout až 75 %. Infekce pleurální dutiny se rozděluje na dva hlavní typy podle příčiny jeho vzniku, a to na

primární a sekundární empyém. Primární empyém vzniká jako komplikace jiného onemocnění pohrudnice nebo plic. Obvykle se vyvine z komplikovaných zánětů, jako jsou parapneumonické (plicní) výpotky, tuberkulózní výpotky nebo maligní (nádorové) výpotky v pohrudniční dutině. Sekundární empyém je důsledkem předchozího chirurgického nebo invazivního zákroku hrudníku. Může se vyskytnout po plicních resekcích, po penetrujících nebo tupých poraněních hrudníku nebo jakýchkoliv dalších výkonech zasahujících do pohrudničního prostoru (Tenconi a Waller 2014).



Obrázek 12 CT hrudníku prokazující pravostranný pleurální výpotek (upraveno dle Rasool *et al.*, 2023)

Pacienti trpící pleurálním empyémem projevují obvykle symptomy podobné pneumonii nebo sepsi (kašel, horečka, dušnost a bolest na hrudi). Klinicky se toto onemocnění projevuje jako omezená expanze hrudní stěny, tlumené ozvy při poklepávání a redukce vstupu vzduchu, spolu se zvýšenou hladinou bílých krvinek a C-reaktivního proteinu. Rentgenový snímek hrudníku může zobrazit výpotek, hladiny vzduchu a tekutiny nebo ztluštění pleury (Tenconi a Waller 2014). Empyém je závažné onemocnění často spojené s bakteriální infekcí. Nicméně, vzácně může být empyém způsoben kvasinkami, jako je např. *Candida lusitania* (Rasool *et al.*, 2023). Mezi příznaky empyému způsobeného *Candida lusitaniae* patří mimo jiné i ortopnoe či zvýšená dechová frekvence. Možnosti diagnostiky empyému zahrnují laboratorní testy, jako je kompletní krevní obraz a měření laktátu. Dále obrazové vyšetření, jako je RTG a CT hrudníku (Obrázek 13), a ultrazvukové vyšetření pro detekci pleurálního výpotku. Kromě toho se provádí analýza pleurální tekutiny získaná punkcí. Mohou být provedeny také kultivační vyšetření pro identifikaci *Candida lusitaniae*. Léčba zahrnuje intravenózní podání antimykotik

(kaspofungin). Další terapeutické postupy mohou zahrnovat drenáž pleurálního výpotku pomocí hrudní sondy a intrapleurální trombolýzu. K dispozici jsou také léky k podpoře dýchání a bronchodilatátory pro zlepšení dýchacích funkcí pacienta (Rasool *et al.*, 2023).

4.5. Peritonitida v souvislosti s kvasinkou *Candida lusitaniae*

Peritonitida neboli zánět pobřišnice je akutní stav, poměrně často se vyskytující v chirurgické praxi. Peritonitida může být rozdělena na základě její příčiny na primární nebo sekundární. Primární peritonitida je vzácnější forma, typická spíše pro pacienty se sníženou imunitou. Vzniká spontánně a bez předchozího zdroje infekce v dutině břišní. Původci primární formy peritonitidy jsou obvykle bakterie nebo kvasinky přítomné v trávicím traktu (Pramod *et al.*, 2018; Volk, 2014). Sekundární peritonitida je častější a obvykle je spojena s jinými patologickými stavy v břišní dutině, jako je např. perforace trávicího traktu, traumatické poranění nebo chirurgické komplikace (Pramod *et al.*, 2018). Kromě základního dělení na primární a sekundární lze peritonitidu dále rozlišit na septickou a aseptickou. Septická peritonitida je způsobena infekcí. Tato forma infekce je charakterizovaná přítomností hnisu v dutině břišní. Na rozdíl od septické peritonitidy, aseptická peritonitida představuje zánět pobřišnice neinfekční povahy. Příčinou může být chemické podráždění např. žlučí po protržení žlučových cest, pankreatickou šťávou při akutní pankreatitidě, krví po rozsáhlém krvácení do dutiny břišní nebo výpotkem při zánětech pohrudnice (pleuritidě). Aseptická peritonitida se také často vyskytuje jako komplikace po rozsáhlejších abdominálních operacích nebo po tupém úrazu břicha. Pro aseptickou peritonitidu je typické, že ve výpotku není přítomen hnis (Volk, 2014). Klinické příznaky peritonitidy zahrnují bolest břicha, anorexii, zvracení, depresi a letargické stavy. Pokud je infekce přítomna, může docházet k horečce, tachykardii a dalším příznakům sepse. Peritonitida způsobená kvasinkami *Candida lusitaniae* není častá, přesto však byly hlášeny případy této infekce. Mezi faktory zvyšující riziko této peritonitidy patří přítomnost chronických onemocnění, dlouhodobé užívání antibiotik nebo imunosupresivní léčby, předchozí rozsáhlé chirurgické zákroky v břišní oblasti a oslabení imunitního systému z různých příčin (Varda *et al.*, 2023). Diagnostika peritonitidy se obvykle provádí na základě lékařského vyšetření, vč. palpace břicha, a pomocí různých diagnostických testů, jako je ultrasonografie břicha a analýza peritoneální tekutiny (Pramod *et al.*, 2018; Volk, 2014). Pro diagnostiku *Candida lusitaniae* z peritoneální tekutiny se obvykle používají různé testy, vč. cytologických, biochemických, mikrobiologických a kulturačních analýz. K dispozici jsou také testy na bakteriální antigeny nebo proteiny produkované kvasinkami a PCR pro detekci

specifické DNA kvasinek v peritoneální tekutině (Arafa *et al.*, 2023; Volk, 2014). Léčba této infekce může být obtížná kvůli rezistenci kvasinky na některá antifungální léčiva. Proto je důležité provést citlivostní testy a vybrat vhodnou terapii. Běžně se používá kombinace antifungálních léků, jako je amfotericin B nebo flukonazol, spolu s širokospektrálními antibiotiky. V těžších případech této infekce může být nutný chirurgický zákrok k odstranění zdroje infekce (Varda *et al.*, 2023).

5. ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo poskytnout komplexní informace o virulenčních vlastnostech *Candida lusitaniae* a jejich vztahu k patogenezi této kvasinky. *Candida lusitaniae* je méně známý druh kvasinky, jež je příbuzný s běžnějšími patogenními kvasinkami např. *Candida albicans* nebo *Candida glabrata*. *C. lusitaniae* však vykazuje řadu specifických virulenčních vlastností, které jí umožňují způsobovat závažné infekce, zejména u imunokompromitovaných pacientů. Mezi klíčové virulenční faktory patří schopnost adheze a invaze na povrchy hostitelských buněk, metabolická adaptace, dimorfismus, fenotypová variabilita, hydrofobicita buněčného povrchu, sekrece hydrolytických enzymů či tvorba biofilmů. Díky těmto virulenčním vlastnostem je *C. lusitaniae* schopna úspěšně kolonizovat lidského hostitele, napadat jeho tkáně a orgány a vyvolávat závažná onemocnění jako jsou kandidémie, infekce močových cest, peritoneální infekce nebo empyémy. Tyto infekce se navíc obtížně léčí vzhledem k rezistenci *C. lusitaniae* na antimykotickou terapii.

Diagnostika infekcí způsobených *Candida lusitaniae* je obtížná a vyžaduje kombinaci různých metod. Izolace a kultivace kvasinek z klinických vzorků a následná identifikace pomocí mikroskopie a biochemických testů poskytuje důležité informace pro diagnostiku *C. lusitaniae*. Dalšími metodami pro diagnostiku jsou molekulárně-biologické metody založené na amplifikaci specifických DNA sekvencí pomocí polymerázové řetězové reakce. Tyto metody mohou být použity k přesné identifikaci *C. lusitaniae* v klinických vzorcích. Imunologické testy jsou také užitečné pro diagnostiku infekcí způsobených *C. lusitaniae*. V současné době velmi oblíbená metoda MALDI-TOF MS umožňuje rychlou identifikaci mikroorganismů na základě jejich hmotnostního spektra. Kombinací těchto metod lze nejen potvrdit přítomnost *C. lusitaniae*, ale také odlišit tuto kvasinku od jiných příbuzných druhů *Candida*. Správná a včasná diagnostika je důležitá pro zahájení vhodné cílené terapie.

K léčbě infekcí způsobených kvasinkou *Candida lusitaniae* se používají nejčasněji azolová antimykotika (flukonazol, vorikonazol, posakonazol), polyenová antimykotika (amfotericin B), echinokandinová antimykotika (kaspofungin, mikafungin, anidulafungin) nebo jejich kombinace. Velmi důležité je pravidelné testování citlivosti izolátů *C. lusitaniae* a volba správné terapie dle výsledků testů.

Na závěr je důležité zmínit, že detailnější výzkumné procesy zaměřené na kvasinku *Candida lusitaniae* by mohly přispět k lepšímu porozumění její virulence a mechanismům rezistence této kvasinky vůči běžně používaným antimykotikům. Podrobnější znalosti by mohly vést

k vývoji nových účinnějších antimykotických látek schopných překonat rezistenci *C. lusitaniae* a umožnit tak efektivnější a jednodušší léčbu infekcí způsobených touto oportunní kvasinkou. V neposlední řadě by detailnější klinické studie mohly přinést cenné informace o epidemiologii, rizikových faktorech a průběhu infekcí způsobených *C. lusitaniae* u různých skupin pacientů. Tyto poznatky by mohly přispět k optimalizaci diagnostických a léčebných postupů u infekcí způsobených touto kvasinkou.

POUŽITÁ LITERATURA

1. **ALAM M.Z., ALAM Q., JIMAN-FATANI A., KAMAL M.A., ABUZENADAH A.M., CHAUDHARY A.G., AKRAM M., HAQUE A.** (2014). *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 30:1437–1451. DOI:10.1007/s11274-013-1574-z.
2. **AL-ZUBAIDY I. M., SHABAA R.A.H.** (2023). Evaluation the efficacy of some culture média in melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *Materials Today: Proceedings*. 80(3):3167-3170. DOI.org/10.1016/j.matpr.2021.07.184.
3. **ANGIOLELLA L., ROJAS F., GIAMMARINO A., BELLUCCI N., GIUSIANO G.** (2024). Identification of virulence factors in isolates of *Candida haemulonii*, *Candida albicans* and *Clavispora lusitaniae* with low susceptibility and resistance to fluconazole and amphotericin B. *Microorganisms*. 12(1):212. DOI: 10.3390/microorganisms12010212.
4. **APSEMIDOU A., FÜLLER M.A., IDELEVICH E.A., KURZAI O., TRAGIANNIDIS A., GROLL A.H.** (2020). *Candida lusitaniae* breakthrough fungemia in an immuno-compromised adolescent: case report and review of the literature. *Journal of Fungi*. 6(4):380. DOI: 10.3390/jof6040380.
5. **ARAF A.S.H., ELBANNA K., OSMAN G.E.H., ABULREESH H.H.** (2023). *Candida* diagnostic techniques. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*. 9:360–377. DOI: 10.1007/s43994-023-00049-2.
6. **ARYA R.N., RAFIQ N. B.** (2023) Candidiasis. Treasure Island: *StatPearls*.560624. DOI: creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/
7. **BAL CH.K., BHATIA V., KHILLAN V., RATHOR N., SAINI D., DAMAN R., SARIN, S.K.** (2014). Spontaneous *Cryptococcal* peritonitis with fungemia in patients with decompensated cirrhosis: Report of two cases. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. 18(8):536–9. DOI:10.4103/0972-5229.138161.
8. **BALBOA M.A., BALSINDE J.** (2021) Phospholipases: from structure to biological function. *Biomolecules*. 11(3):428. DOI: 10.3390/biom11030428.
9. **BALLOU E.R., JOHNSTON S.A.** (2017). The cause and effect of *Cryptococcus* interactions with the host. *Current opinion in Microbiology*. 40:88–94. DOI:10.1016/j.mib.2017.10.012.
10. **BALOUIRI M., SADIKI M., IBNSOUDA S.K.** (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71–79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
11. **BANDALIZADEH Z., JAVIDNIA J., HOSSEINI S.A., MOOSAZADEH M., AMOUEI A., KERMANI F., SEYEDMOUSAVI S., SHOKOHI T.** (2020). *Cryptococcus* and *cryptococcosis* in Iran during, A systematic review and meta-analysis. *Journal de Mycologie Médicale*. 30(1):1969–2019. DOI: 10.1016/j.mycmed.2019.100917.

12. **BARNETT J.A.** (1998). A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists. *Yeast* 14(16):1439–1451.
DOI:10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1439::AID-YEA339>3.0.CO;2-Z.
13. **BARNETT J.A.** (2000). A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries. 1850–1880. *Wiley* 16(8):755–771.
DOI:/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO; 2-4.
14. **BLOOMFIELD G.** (2018). Spo11-Independent meiosis in social amoebae. *Annual Review of Microbiology*. 72(1):293-307. DOI: 0.1146090817-062232.
15. **BONIFAZ A., GÓMEZ-DAZA F., PAREDES V., PONCE R.M.** (2010). Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra, and black piedra. *Clinics in Dermatology* 28(2): 140–5. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2009.12.004.
16. **BORGEAT V., BRANDALISE D., GRENOUILLET F., SANGLARD D.** (2021). Participation of the ABC transporter CDR1 in azole resistance of *Candida lusitanae*. *Journal of Fungi*. 7(9):760. DOI: 10.3390/jof7090760.
17. **BOYCE K. J., ANDRIANOPOULOS A.** (2015) Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS Microbiology Reviews*. 6(39):797–811.
DOI: 10.1093/femsre/fuv035.
18. **CAR J.** (2006). Urinary tract infections in women: diagnosis and management in primary care. *BMJ*. 332(7533):94–7. DOI: 10.1136/bmj.332.7533.94.
19. **CAVALHEIRO M., TEIXEIRA M.C.** (2018). *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine*. 5(28):29487851. DOI:10.3389/fmed.2018.00028.
20. **DANNAOUI E., ESPINEL-INGROFF A.** (2019). Antifungal susceptibility testing by concentration gradient strip etest method for fungal isolates: A review. *Jurnal of Fungi*. 5(4):108. DOI: 10.3390/jof5040108.
21. **DAS S.P., AHMED S.M.Q., NAIK B., LAHA S., BEJAI V.** (2021). The human fungal pathogen *Malassezia* and its role in cancer. *Fungal Biology Reviews*. 38:9–24. DOI: 10.1016/j.fbr.2021.08.002.
22. **DAVIS I.M.** (2020). Antoni van Leeuwenhoek and measuring the invisible: The context of 16th and 17th century micrometry. *Studies in History and Philosophy of Science Part A*. 83:75–85. DOI: 10.1016/j.shpsa.2020.03.004.
23. **DEORUKHKAR S.C., ROUSHANI S.** (2018). Identification of *Candida species*: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis. *Annals of Microbiology and Immunology*. 1(1):1002.
24. **DUTRA F. F., ALBUQUERQUE P.C., RODRIGUES M.L., FONSECA F.L** (2018). Warfare and defense: The host response to *Cryptococcus* infection. *Fungal Biology Reviews*. 32(2):35–51. DOI: 10.1016/j.fbr.2017.09.002.

25. **EL-ZINEY M.G., ZAID E.A.A., EL-NAGGAR M.Y.** (2018). Characterization of carotenogenic *rhodotorula* strains isolated from delta region, Egypt and their potential for carotenoids production. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 12(2):587–599. DOI: 10.22207/JPAM.12.2.17.
26. **FISHER M.C., ALASTRUEY-IZQUIERDO A., BERMAN J., BICANIC T., BIGNELL E.M., BOWYER P., BROMLEY M., BRÜGGEMANN R., GARBER G., CORNELLY O.A., GURR S.J., HARRISON T.S., KUIJPER E., P.E. RHODES J., SHEPPARD D.C., WARRISOVÁ A., WHITE P.L., XU J., VERWEIJ Z.B.** (2022). Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews Microbiology*. 20:557–57. DOI:org/10.1038/s41579-022-00720.
27. **FRANCISCO E.C., ALMEIDA J.N., QUEIROZ TELLES F., AQUINO V.R., MENDES A.V.A., DE ANDRADE BARBERINO M.G.M., DE TARSO O. CASTRO P., GUIMARÃES T., HAHN R.C., PADOVAN A.C.B., CHAVES G.M., COLOMBO A.L.** (2019) Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. *Clinical Microbiology and Infection*. 25(7):909.e1–909.e5. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.03.026.
28. **FRASER B., MUNAWAR M., HALANI S., SABUR N.** (2023). Disseminated *cryptococcus neoformans* presenting with an isolated pleural effusion in a patient receiving temozolomide and long-term steroids. *BMJ Case Reports*. 16(11):e256255 DOI: 10.1136/bcr-2023-256255.
29. **FUSCO A., CONTALDO M., SAVIO V., BARONI A., FERRARO G.A., DI STASIO D., LUCHESE A., CHIAROMONTE A., DONNARUMMA G., SERPICO R.** (2023). An unconventional oral candidiasis in an immunocompetent patient. *Journal of Fungi*. 9(3):295. DOI: 10.3390/jof9030295.
30. **GABALDÓN T., NARANJO-ORTÍZ M.A., MARCET-HOUBEN M.** (2016). Evolutionary genomics of yeast pathogens in the *Saccharomycotina*. *FEMS Yeast Research*. 16(6):fow064. DOI:10.1093/femsyr/fow064.
31. **GAJDÁCS M., DÓCZI I., ÁBRÓK M., LÁZÁR A., BURIÁN K.** (2019). Epidemiology of candiduria and *Candida* urinary tract infections in inpatients and outpatients: results from a 10year retrospective survey. *Central European Journal of Urology*. 72(2):209–214. DOI: 10.5173/ceju.2019.1909.
32. **GALÁN-SÁNCHEZ F., GARCÍA-MARTOS P., RODRÍGUEZ-RAMOS C., MARÍN-CASANOVA P., MIRA-GUTIÉRREZ, J.** (1999). Microbiological characteristics and susceptibility patterns of strains of *Rhodotorula* isolated from clinical samples. *Mycopathologia*. 145:109–112. DOI:10.1023/A:1007059005753.
33. **GAUTHIER G.M.** (2015). Dimorphism in fungal pathogens of savs, plants, and insects. *PLoS Pathog*. 11(2):e1004608. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004608.

34. **GHAZI S., RAFEI R., OSMAN M., SAFADI, D., MALLAT H., PAPON N., DABBOUSSI F., BOUCHARA J.-P., HAMZE M.** (2019). The epidemiology of *Candida species* in the middle east and North Africa. *General review*. 29(3):245–252. DOI: 10.1016/j.mycmed.2019.07.006.
35. **GÓMEZ-GAVIRIA M., RAMÍREZ-SOTELO U., MORA-MONTES H.M.** (2022). Non-*albicans Candida Species*: Immune response, evasion mechanisms, and new plant-derived alternative therapies. *Journal of Fungi*. 9(1):11. DOI: 10.3390/jof9010011.
36. **GONÇALVES B., FERREIRA C., ALVES C.T., HENRIQUES M., AZEREDO J., SILVA S.** (2016). Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors, *Critical Reviews in Microbiology*. 42 (6):905–927. DOI: 10.3109/1040841X.2015.1091805.
37. **GONG Y., LI T., YU C, SUN S.** (2017). *Candida albicans* heat shock proteins and hsp-associated signaling pathways as potential antifungal targets. *Front Cell Infect Microbiol*. 19(7):520. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00520.
38. **GRUPTA B., GRUPTA S., MINAL CH., THIRUMAL A.R., HABIB A.K., SHANKARGOUDA P.** (2020). Oral *Candida* prevalence and species specificity in leprosy. *Disease-a-Month*. 66(7):100920. DOI: 10.1016/j.disamonth.2019.100920.
39. **GUIMARÃES R.E.C., DE FREITAS H.F., BARROS T.F.** (2019). Upregulation of secreted aspartyl proteinase genes of fluconazole-sensitive *Candida albicans* isolates. *Molecular Biology*. Report 46:6147–6154. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05049-2>.
40. **GUPTA R., KUMARI A., SYAL P., SINGH Y.** (2015). Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*. 57:40–54. DOI. 10.1016/j.plipres.2014.12.001.
41. **HALDER P., PAL U., GANGULY A., GHOSH P., RAY A., SARKAR S. GHOSH, S.** (2021). Understanding etiology of chromosome 21 nondisjunction from gene × environment models. *Scientific Report*. 11(1): 22390. DOI: 10.1038/s41598-021-01672-x.
42. **HAMDINO M., SAUDY A.A., EL-SHAHED L.H., TAHA M.** (2022). Identification of *Malassezia species* isolated from some *Malassezia* associated skin diseases. *Journal of Medical Mycology*. 32(4):101301. DOI: 10.1016/j.mycmed.2022.101301.
43. **HAMZEHEE S., KALANTAR-NEYESTANAKI D., AFSHARI S.H.K, MOUSAVI S.A.A.** (2019). Molecular identification of *Candida species*, assessment of the antifungal susceptibility and the genetic relationship of *Candida albicans* isolated from immunocompromised patients in Kerman, Iran. *Gene Reports* 17:100484. DOI: 10.1016/j.genrep.2019.100484.
44. **HERNÁNDEZ-ALMANZA A., MONTANEZ J.C., AGUILAR-GONZÁLEZ M.A., MARTÍNEZ-ÁVILA C., RODRÍGUEZ-HERRERA R., AGUILAR C.N.** (2014) *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*. 5:64–72. DOI: 10.1016/j.fbio.2013.11.007.

45. **HERNÁNDEZ-CHÁVEZ M.J., PÉREZ-GARCÍA L.A., NIÑO-VEGA G.A., MORA-MONTES, H.M.** (2017). Fungal strategies to evade the host immune recognition. *Journal of Fungi*. 3(4):51. DOI: 10.3390/jof3040051.
46. **HOCKING A.D., PITT J.I.** (2022). Fungi and food spoilage. *Fungi and food Spoilage*. 465–503. DOI: /10.1007/978-3-030-85640-3_10.
47. **HOMMEL R.K.** (2014). *Candida*. *Encyclopedia of Food Microbiology* 2nd Edition: 367–373. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00055-0.
48. **HURAIJOVA B., POZGAJOVA M., GREGAN J.** (2018). Sexual reproduction: preventing re-fertilization in fission yeast. *Current Biology*. 22(28):1300–1303. DOI:/10.1016/j.cub.2018.09.048.
49. **IANIRI G., LEIBUNDGUT-LANDMANN S., DAWSON T.L.** (2022) *Malassezia*: A Commensal, Pathogen, and mutualist of human and animal skin. *Annual Review of Microbiology*. 76(1):757–782. DOI: 10.1146/annurev-micro-040820-010114.
50. **ITURRIETA-GONZÁLEZ I.A., PADOVAN A.C.B., BIZERRA F.C., HAHN R.C., COLOMBO A.L.** (2014). Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS ONE*. 9(10):e109553. DOI: 10.1371/journal.pone.0109553.
51. **MORAES PONTES J.G., FERNANDES L.S., SANTOS R.V., TASIC L., FILL T.P.** (2020). Virulence Factors in the Phytopathogen–Host Interactions: An Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68(29):7555-7570. DOI: 10.1021/acs.jafC.0c02389.
52. **JEON S., SHIN J.H., LIM H.J., CHOI M.J., BYUN S.A., LEE D., LEE S.Y., WON E.J., KIM S.H., SHIN M.G.** (2021). Disk diffusion susceptibility testing for the rapid detection of fluconazole resistance in *Candida* isolates. *Annals of Laboratory Medicine*. 41:559–567. DOI: 10.3343/alm.2021.41.6.559.
53. **JIANG Q., ZHANG J., ZHOU G.** (2023). Oral *Malassezia* infection co-occurring with tinea versicolor: Metagenomic sequencing of the saliva. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 137(3):e45–e52. DOI: 10.1016/j.oooo.2023.10.009.
54. **KASSINGER S.J, VAN HOEK M.L.** (2020). Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 5(1):1–10. DOI:10.1016/j.synbio.2020.01.001.
55. **KHAN Z., AHMAD S., AL-SWEIH N., KHAN S., JOSEPH L.** (2019). *Candida lusitanae* in Kuwait: Prevalence, antifungal susceptibility and role in neonatal fungemia. *PLoS ONE* 14(3):e0213532. DOI: 10.1371/journal.pone.0213532.
56. **KILEY, J.L., ZACK J., RITCHIE S., KRAULAND K., MARKELZ E.** (2019). Deep cutaneous *Trichosporon asahii* infection in a patient recovering from toxic epidermal necrolysis. *Medical Mycology Case Reports*, 23:26–28. DOI: 10.1016/j.mmcr.2018.10.003.

57. **KLAASEN S.J., KOPS G.J.P.L.** (2022). Chromosome inequality: causes and consequences of non-random segregation errors in mitosis and meiosis. *Cells*. 11(22):3564. DOI: 10.3390/cells11223564.
58. **KNOP M.** (2011). Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. *Comptes Rendus Biologies*. 334(8–9): 599–606. DOI: 10.1016/j.crv.2011.05.007.
59. **KRASOWSKA A., SIGLER K.** (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4:112. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00112.
60. **KREVE S., REIS A.C.D.** (2021) Bacterial adhesion to biomaterials: What regulates this attachment? A review, *Japanese Dental Science Review*, 57:85–96. DOI: 10.1016/j.jdsr.2021.05.003.
61. **KUMARAVELU K.R.** (2021). Demonstration of virulence factors of *Trichosporon species* isolated from clinical samples during the COVID 19 pandemic – A study from a tertiary care medical college hospital from South India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 39:104. DOI: 10.1016/j.ijmmb.2021.08.358.
62. **KUNDRÁT, D., KVASNIČKOVÁ E.** (2015). Oportunně patogenní kvasinky rodu *Candida*. *Bioprospect*. 60–64. ISSN 1210–1737.
63. **KUO S.H., LU P., CHEN Y., HO M., LEE Ch., CHOU Ch., LIN S.** (2021). The epidemiology, genotypes, antifungal susceptibility of *Trichosporon* species, and the impact of voriconazole on *Trichosporon* fungemia patients. *Journal of the formosan medical association*. 120(9):1686–1694. DOI: 10.1016/j.jfma.2020.12.007.
64. **LASTAUSKIENĖ E., ČEPUTYTĖ J., GIRKONTAITĖ I., ZINKEVIČIENĖ A.** (2015). Phenotypic switching of *Candida guilliermondii* is associated with pseudohyphae formation and antifungal resistance. *Mycopathologia*. 179:205–211. DOI: 10.1007/s11046-014-9844-3.
65. **LEE D.K., HSIANG T., LACHANCE M.A.** (2018). *Metschnikowia* mating genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 111(10): 1935–1953. DOI:10.1007/s10482-018-1084-y.
66. **LEE Y., ROBBINS N., COWEN L.E.** (2023). Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. *Npj Antimicrobials and Resistance*. 1(5):44259. DOI: 10.1038/s44259-023-00007-2.
67. **LEITÃO J. H.** (2020). Microbial virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(15):5320. DOI:10.3390/ijms21155320.
68. **LEWIS M., WILLIAMS, D.** (2017). Diagnosis and management of oral candidosis. *British dental journal*. 223(9):675–681. DOI: org/10.1038/sj.bdj.2017.886.

69. **LI Z., LI CH., CHENG P., YU G.** (2022). *Rhodotorula mucilaginosa*-alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*. 8(11):e11505. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11505.
70. **LIM S.Y., STEINER J.M., CRIDGE H.** (2022). Lipases: it's not just pancreatic lipase! *American Journal of Veterinary Research*. 83(8):ajvr.22.03.0048. DOI: 10.2460/ajvr.22.03.0048.
71. **LOPEZ M.J.E.** (2015). Candidiasis (vulvovaginal). *BMJ Clinical Evidence*. 2015:0815.
72. **LORTHOLARY, O., RENAUDAT, C., SITBON, K., DESNOS-OLLIVIER M., BRETAGNE S., DROMER F., THE FRENCH MYCOSES STUDY GROUP.** (2017). The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Medicine*. 43:652–662. DOI: 10.1007/s00134-017-4743-y.
73. **LU H., HONG T., JIANG Y., WHITEWAY M., ZHANG S.** (2023). Candidiasis: From cutaneous to systemic, new perspectives of potential targets and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 199:114960. DOI: 10.1016/j.addr.2023.114960.
74. **MAGALHÃES J., CORREIA M.J., SILVA R.M., ESTEVES A.C., ALVES A., DUARTE A.S.** (2022). Molecular techniques and target selection for the identification of *Candida* spp, in oral samples. *Applied Sciences*. 12:9204. DOI: 10.3390/app12189204.
75. **MAYER F.L., WILSON D., HUBE B.** (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 4(2):119-128. DOI:10.4161/viru.22913.
76. **MBA I.E., NWEZE E.I.** (2020). Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 39:1797–1819. DOI: 10096-020-03912-w.
77. **MCCARTHY M., O'SHAUGHNESSY E.M., WALSH T.J.** (2017). Amphotericin B: polyene resistance mechanisms. In: Mayers, D., Sobel, J., Ouellette, M., Kaye, K., Marchaim, D. (eds). Antimicrobial Drug Resistance. *Springer, Cham*, 1:387–395. DOI:10.1007/978-3-319-46718-4_26.
78. **MCDONALD T., D.L. WIESNER, K. NIELSEN.** (2012). *Cryptococcus*. *Current Biology*. 22(14): R554-5. DOI: 10.1016/j.cub.2012.05.040.
79. **MELLO V.G., ESCUDEIRO H., WECKWERTH A.C.V.B, ANDRADE M.I., FUSARO A.E., MORAES E.B., RUIZ L.S., BAPTISTA M.F.M.D.** (2021). Virulence factors and antifungal susceptibility in *Candida* species isolated from dermatomycosis Patients. *Mycopathologia*. 186:71–80. DOI: 10.1007/s11046-020-00509-x.

80. **MENDOZA-REYES D., GÓMEZ-GAVIRIA M., MORA-MONTES H.** (2022). *Candida lusitanae*: Biology, pathogenicity, virulence factors, diagnosis, and treatment. *Infection and Drug Resistance*. 15:5121–5135. DOI: 10.2147/IDR.S383785.
81. **MILLER N.S., DICK J.D., MERZ W.G.** (2006). Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(4):1536–9. DOI: 10.1128/JCM.44.4.1536-1539.2006.
82. **MILLSOP W. J., FAZEL N.** (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*. 34(4):487–494. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022.
83. **MINARI A., HACHEM R., RAAD I.** (2001). *Candida lusitanae* A Cause of Breakthrough Fungemia in Cancer Patients. *Clinical Infectious Diseases*. 32(2):186–190. DOI: 10.1086/318473.
84. **MONJE-GALVAN V., KLAUDA J.B.** (2015). Modeling yeast organelle membranes and how lipid diversity influences bilayer properties. *Biochemistry*. 54(45):6852–6861. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00718.
85. **MUADCHEINGKA T., TANTIVITAYAKUL P.** (2015) Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida species* in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives of Oral Biology*. 60(6):894–901. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.03.002.
86. **MUSSAGY C.U., RIBEIRO H.F., PEREIRA J.F.B.** (2023). *Rhodotorula* sp. as a cell factory for production of valuable biomolecules. *Advances in Applied Microbiology*. 123:133–156. DOI: 10.1016/bs.aambs.2023.04.001.
87. **NAVARRO-TRIVIÑO F.J. M.D., CHUECA N.M.D., RUIZ-VILLAVERDE R. M.D.** (2020). Eczema-like infection caused by a new emerging pathogen: *Rhodotorula mucilaginosa*. *International Journal of Dermatology*. 59(8):e305-e306. DOI: 10.1111/ijd.14846.
88. **NEPPELENBROEK K.H., SEÓ R.S., URBAN M.V., SILVA S., DOVIGO L.D., JORGE J.H., CAMPANHA N.H.** (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Wiley*. 20(4):329–344. DOI:10.1111/odi.12123.
89. **NORDIN M.A.F., HARUN W.H.A.W., RAZAK F.A.** (2013). An *in vitro* study on the anti-adherence effect of *Brucea javanica* and *Piper betle* extracts towards oral *Candida*. *Archives of Oral Biology*. 58(10):1335-1342. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.07.001.
90. **ODABASI Z., MERT A.** (2020). *Candida* urinary tract infections in adults. *World Journal of Urology*. 38(11):2699–2707. DOI:10.1007/s00345-019-02991-5.

91. **OGUNRINOLA G.A., OYEWALE J.O., OSHAMIKA O.O., OLASEHINDE G.I.** (2020). The human microbiome and its impacts on health. *International Journal of Microbiology*. 2020:8045646. DOI: 10.1155/2020/8045646.
92. **PAPPAS P., LIONAKIS M., ARENDRUP M., OSTROSKY-ZEICHNER L., KULLBERG B.J.** (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 4(1):18026. DOI:10.1038/nrdp.2018.26.
93. **PARK S., KANG S., KIM S., KIM J.** (2023). Graphene-encapsulated yeast cells in harsh conditions. *Fungal Biology*. 127(10–11):1389–1396. DOI: 10.1016/j.funbio.2023.10.003.
94. **PÉREZ C.C., DURÁN E.G., GARCÍA P.G., SAUCEDO M.D.I., MARÍN E.S.S., VÁZQUEZ L.P, RÍOS-ROSAS C., WONG-ARÁMBULA C.E, MÉNDEZ J.D.** (2022). Clinical isolates of *Candida lusitaniae* during the covid-19 pandemic in Mexico. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 11(13):1303–1316. DOI: 10.20959/wjpr202213-25555.
95. **PÉREZ C.C., GARCÍA P.C., PARRA L.G.B., SÁNCHEZ S.P., MÉNDEZ J.D.** (2019) *Candida lusitaniae*. Isolation, identification and clinical relevance. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 8(5):606–621. DOI: 10.20959/wjpr20195-14720.
96. **PEYRON F., FAVEL A., MICHEL-NGUYEN A., GILLY M., REGLI P., BOLMSTRÖM A.** (2001). Improved detection of Amphotericin B-Resistant Isolates of *Candida lusitaniae* by Etest. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(1):339–342. DOI:10.1128/jcm.39.1.339-342.2001.
97. **PFALLER M.A.** (2015). Invasive fungal infections and approaches to their diagnosis, *Methods in Microbiology*. 42:219–287. DOI: 10.1016/bs.mim.2015.05.002.
98. **POLKE M., HUBE B., JACOBSEN I.D.** (2015). *Candida* survival strategies. *Advances in applied mikrobiology*.91:139–235. DOI: 10.1016/bs.aams.2014.12.002.
99. **PRAMOD J., VIJAYAKUMAR C., SRINIVASAN K., MAROJU N.K., RAJ KUMAR N., BALASUBRAMANIYAN G.** (2018). Clinical significance of *Candida* in an intraoperative peritoneal specimen with perforation peritonitis: an institutional perspective. *Cureus*. 10(3):e2275. DOI: 10.7759/cureus.2275.
100. **PRISTOV K.E., GHANNOUM M.A.** (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide, *Clinical Microbiology and Infection*. 25(7):792–798. DOI:10.1016/j.cmi.2019.03.028.
101. **RASOOL UL H.M., GOWRI S., HOSNA A.U., SALMAN I., THEO T.** (2023). *Candida lusitaniae*, an emerging opportunistic pathogen in immunocompetent populations: A case report. *Cureus*. 15(8):2870661223. DOI: 10.7759/cureus.43211.

102. **RATHER M.A., GUPTA K., MANDAL M.** (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazillian Journal of Microbiology*. 52(4):1701–1718. DOI: 10.1007/s42770-021-00624-x.
103. **REEDY J.L., FLOYD A.M., HEITMAN J.** (2009). Mechanistic plasticity of sexual reproduction and meiosis in the *candida* pathogenic species complex. *Current Biology*. 19(11):891–899. DOI: 10.1016/j.cub.2009.04.058.
104. **RENNER L.D., WEIBEL D.B.** (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*. 36(5):347–355. DOI 10.1557/mrs.2011.65.
105. **ROSSI, S.A., ZARAGOZA O.** (2021). Infections by *Cryptococcus* species. *Encyclopedia of Mycology*. 1:576–583. DOI:10.1016/B978-0-12-819990-9.00008-1.
106. **SABRA A., BITEAU N., JEAN-WILLIAM D., KLOPP C., NOËL T., DEMENTHON K.** (2023). Médiator subunit Med15 regulates cell morphology and mating in *candida lusitaniae*. *Journal of Fungi*. 9(3):333. DOI:10.3390/jof9030333.
107. **SALAS-TOVAR J.A., ESCOBEDO-GARCÍA S., OLIVAS G. I., ACOSTA-MUÑIZ C.H., HARTE F., SEPULVEDA D.R.** (2021). Method-induced variation in the bacterial cell surface hydrophobicity MATH test. *Journal of Microbiological Methods*. 185:106234. DOI: 10.1016/j.mimet.2021.106234.
108. **SANTOS A.L.S.D., GALDINO A.C.M., MELLO T.P., RAMOS L.S., BRANQUINHA M.H., BOLOGNESE A.M., COLUMBANO-NETO J., ROUDBARY M.** (2018). What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 113(9):e180212. DOI: 10.1590/0074-02760180212.
109. **SCOTT N. E., ERAYIL S. E., KLINE S. E., SELMECKI A.** (2023). Rapid evolution of multidrug resistance in a *Candida lusitaniae* infection during micafungin monotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 67(8):e00543-23. DOI: 10.1128/aaC.00543-23.
110. **SHAIKH H., WEBER D., HAMBURGER J., VAREECHON C.** (2022). *Candida lusitaniae* endophthalmitis: A brief literature review with a focus on treatment options. *Private Practise Infectious Disease*. 2(4):13. DOI:10.55636/ppid2040013.
111. **SHAPIRO R.S., ROBBINS N., COWEN L.E.** (2011). Regulatory circuitry Governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 75(2):213–267 DOI: 10.1128/mmbr.00045-10.
112. **SHERWOOD R.K., BENNETT R.J.** (2009). Fungal meiosis and parasexual reproduction-lessons from pathogenic yeast. *Current Opinion in Microbiology*. 12(6):599–607. DOI: 10.1016/j.mib.2009.09.005.

113. **SHREE P., SINGH CH.K., SODHI K.K., SURYA J.N., SINGH D.K.** (2023). Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. *Medicine in Microecology*. 16:100084. DOI: 10.1016/j.medmiC.2023.100084.
114. **SHURSON G.C.** (2018). Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal feed Science and Technology*. 235:60–76. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010.
115. **SCHMIEMANN G., KNIEHL E., GEBHARDT K., MATEJCZYK M.M., HUMMERS-PRADIER E** (2010). The diagnosis of urinary tract infection. *Deutsches Ärzteblatt International*. 107(21):361–367. DOI 10.3238/arztebl.2010.0361.
116. **SIEBER B., CORONAS-SERNA J.M., MARTIN S.G.** (2023). A focus on yeast mating: From pheromone signaling to cell–cell fusion. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 133:83–95. DOI: 10.1016/j.semcd.2022.02.003.
117. **SINGH D.H., NÉMETH T., PAPP A., TÓTH R., LUKÁCSI S., HEIDINGSFELD O., DOSTAL J., VÁGVÖLGYI C., BAJTAY Z., JÓZSI M., GÁCSEER A** (2019). Functional characterization of secreted aspartyl proteases in *Candida parapsilosis*. *American Society for Microbiology*. 4(4):00484–19. DOI: 10.1128/msphere.00484-19.
118. **SINGHAL N., KUMAR M., KANAUIA P.K., VIRDI J.S.** (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers of Microbiology*. 6:791. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791.
119. **SPAMPINATO C., LEONARDI. D.** (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *Biomed research international*. 2013:204237. DOI: 10.1155/2013/204237.
120. **TADDEI A., GASSER S.M.** (2012). Structure and function in the budding yeast nucleus. *Genetics*, 192(1):107–29. DOI: 10.1534/genetics.112.140608.
121. **TAPIA P.C.** (2010). *Candida lusitanae*. *Chilean Journal of Infectious Diseases*. 27(2):153–154. DOI: 10.4067/S0716-10182010000200010.
122. **TENCONI S., WALLER D.A.** (2014). Empyema thoracis. *Surgery*. 32(5):236–241. DOI: 10.1016/j.mpsur.2014.02.012.
123. **THOMPSON D.S., CARLISLE P.L., KADOSH D.** (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* Species. *Eukaryotic Cell*. 10(9):1173–1182. DOI: 10.1128/EC.05085-11
124. **TOMCZAK H., SZALEK E., GRZEŚKOWIAK E.** (2014). The problems of urinary tract infections with *Candida* spp. aetiology in women. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. 68:1036–1039. DOI:10.5604/17322693.1118989.
125. **TSE C., BOODMAN C., WUERZ T.** (2022). *Trichosporon mucoides* prosthetic valve endocarditis managed with antifungal suppression therapy. *Medical Mycology Case Reports*. 36(8):10–12. DOI: org/10.1016/j.mmcr.2022.02.004.

126. **TSCHERNER M., SCHWARZMÜLLER T., KUCHLER K.** (2011). Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*. 4:169–186. DOI:10.3390/ph4010169.
127. **VARDA B., ALANI M., AHMED S.A** (2023). Rare case of spontaneous fungal peritonitis caused by *Candida lusitaniae* in a patient with necrotizing pancreatitis. *Cureus*. 15(6):e40237. DOI: 10.7759/cureus.40237.
128. **VOLK S.W.** (2014). Peritonitis. *Small Animal Critical Care Medicine*. 2015:643–8. DOI: 10.1016/B978-1-4557-0306-7.00122-7.
129. **WIEDERHOLD N.P.** (2017). Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist*. 10:249-259. DOI: 10.2147/IDR.S124918.
130. **WILLAERT R.G.** (2018). Adhesins of yeasts: protein structure and interactions. *Journal of Fungi*. 4(4):119. DOI: org/10.3390/jof4040119.
131. **YOUNG L. Y., HULL CH. M., HEITMAN J.** (2003). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitaniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(9):2717–2724. DOI: 10.1128/aaC.47.9.2717-2724.2003.
132. **ZARA G., BUDRONI M., MANNAZZU I., FANCELLO F., ZARA S.** (2020). Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36(9):134 DOI: 10.1007/s11274-020-02911-5.