

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Mutace způsobující rezistenci kvasinek rodu *Candida* vůči antimykotikům

Anna Vokounová

Bakalářská práce

2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anna Vokounová**
Osobní číslo: **C16301**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Mutace způsobující rezistenci kvasinek rodu *Candida* vůči antimykotikům**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu týkající se patogenních kvasinek rodu *Candida*, jejich vlastností a klinického významu.
2. Prostudujte literaturu týkající se léků používaných v současné době k léčbě mykóz.
3. V dalším studiu se zaměřte na mechanismy vzniku lékové rezistence u kvasinek rodu *Candida*. Zpracujte přehled mutací a chromozomálních přestaveb, které jsou za vznik rezistence zodpovědné.
4. Ke studiu tematiky použijte hlavně zahraniční odbornou literaturu a informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



Ing. Petr Kalenda, Ph.D.

děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2019

.....

Vokounová Anna

Poděkování

Ráda bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za odbornou pomoc, rady a čas, který mi věnovala.

ANOTACE

Kvasinky rodu *Candida* jsou součástí lidského mikrobiomu. Při poruše kožní nebo slizniční bariéry se stávají nejčastějšími původci mykotických onemocnění. Vzniklé kvasinkové infekce jsou léčeny antimykotiky, zejména Flukonazolem. Častým užíváním Flukonazolu došlo u kvasinek k rozvoji rezistence. Cílem této práce bylo zjistit, co je známo o vzniku rezistence kvasinek rodu *Candida* vůči antimykotikům.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinka, *Candida*, rezistence, antimykotika, flukonazol

ANNOTATION

Yeast of the *Candida* genus are part of the microbiota of human. In case of skin or mucosal barrier disruption, yeasts become the most common originators of fungal diseases. Incurred yeast infections are treated with antifungal drugs, especially Flukonazol. The frequent use of Flukonazol has resulted in developed of resistance in yeasts. The aim of this work was to find what is know about the emergence of *Candida* yeast's resistance to antifungal drugs.

KEYWORDS

Yeast, *Candida*, resistance, antimycotics, flukonazole

Obsah

ÚVOD.....	10
1 KVASINKY	11
1.1 Morfologie	12
1.1.1 Identifikace kvasinek.....	12
1.2 Složení buňky	12
1.2.1 Pouzdro.....	12
1.2.2 Buněčná stěna.....	13
1.2.3 Peroxisomy.....	13
1.2.4 Vakuola	14
1.2.5 Jádro	14
1.3 Metabolismus.....	14
1.3.1 Transport látek.....	14
1.3.2 Metabolismus uhlíku	15
1.3.3 Metabolismus dusíku.....	15
1.4 Využití kvasinek v průmyslu	15
1.4.1 Významné průmyslové kvasinky:	17
2 PATOGENITA.....	18
2.1 Patogenní kvasinky	18
2.1.1 <i>Candida spp.</i>	18
2.1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	19
2.1.3 <i>Malassezia</i>	19
2.1.4 <i>Trichosporon</i>	20
2.1.5 <i>Sporobolomyces</i>	20
2.1.6 <i>Rhodotorula</i>	20
3 Rod <i>CANDIDA</i>	21
3.1 Druhy <i>Candida</i>	22
3.1.1 <i>Candida albicans</i>	22
3.1.2 <i>Candida glabrata</i>	22
3.1.3 <i>Candida parapsilosis</i>	22
3.1.4 <i>Candida krusei</i>	23
3.1.5 <i>Candida tropicalis</i>	23
3.1.6 <i>Candida dubliniensis</i>	23
3.2 Typy kandidóz	24
3.2.1 Orální (ústní) kandidóza.....	24
3.2.2 Vaginální kandidóza.....	24
3.2.3 Diseminovaná kandidóza („roztroušená“)	24
3.2.4 Kandidurie	24
3.2.5 Endokarditida	25

3.3	Faktory virulence	25
3.3.1	Adheziny a invaziny	25
3.3.2	Tvorba biofilmu	25
3.3.3	Produkování hydroláz	26
3.3.4	Metabolická adaptace	27
3.4	Genom <i>Candida spp.</i>	27
3.4.1	Centromera	27
3.4.2	Replikace DNA, telomery a MRS	28
3.4.3	Heterozygosita	28
3.4.4	Aneuploidie	28
4	LÉČBA KVASINKOVÝCH INFEKČÍ	30
4.1	Druhy antimykotik	30
4.1.1	Azoly	30
4.1.2	Polyeny	31
4.1.3	Echinokandiny	31
4.1.4	Flucytosin	32
4.1.5	Sordariny	32
4.1.6	Allylaminy	32
4.1.7	Griseofulvin	32
4.1.8	Thiokarbamátové deriváty	33
4.1.9	Morfolinové deriváty	33
4.1.10	Ciklopirox olamin	33
4.1.11	Léčba slizniční infekce	33
5	MECHANISMUSM REZISTENCE	34
5.1	Rezistence na azoly - Flukonazol	34
5.1.1	Bodové mutace	34
5.1.2	Zvýšená exprese <i>ERG11</i>	35
5.1.3	Efluxní pumpy	35
5.1.4	Změna v biosyntetické dráze ergosterolu	35
5.2	Rezistence na Echinokandiny	36
5.3	Rezistence na Polyeny	36
5.4	Rezistence na Flucytosin	36
6	ZÁVĚR	37
7	POUŽITÁ LITERATURA	38

Seznam zkratek

RFLP	Restriction fragment length polymorphism
PCR	Polymerázová řetězová reakce
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální RNA
ATP	Adenosintrifosfát
GT	Germ tube
HIV	Virus lidské imunodeficiency
AIDS	Syndrom získané imunodeficiency
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
Als	Aglutinin-like
HWP1	Hyphal wall protein 1
SAP	Sekretované aspartátové proteinázy
PLC	Fosfolipáza
MB	Megabyte
CENP-A	Centromere protein-A
UV	Ultraviolet
ATB	Antibiotikum
MFS	Major facilitator superfamily
ABC	ATP binding cassette

Úvod

Kvasinky patří mezi jednobuněčné mikroorganismy, nejvíce využívaný lidmi. Již v dávné historii se kvasinky využívaly k výrobě alkoholických nápojů či výrobě kynutého chleba. V dnešní době mají kvasinky velký význam v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Některé kvasinky, převážně někteří zástupci rodu *Candida*, ale mohou u oslabených pacientů vyvolat závažná onemocnění, kandidózy. Jedná se převážně o oportunní patogenní kvasinky využívající řadu virulentních faktorů.

K léčbě kandidóz se užívají převážně antimykotika. Nejvíce podávanými bývají azoly, echinokandiny a polyeny. Důsledkem častého nebo dlouhodobého užívání těchto antimykotik, dochází u kvasinek k rozvoji rezistence.

1 Kvasinky

Kvasinky se řadí mezi aerobní, jednobuněčné vyšší houby – eukaryota. Z větší části se rozmnožují pučením, což bývá pro většinu kvasinek charakteristické. Na mateřské buňce se vytváří pupen. Ten se postupně zvětšuje a podle jeho umístění na buňce se jedná o monopolární, multipolární nebo bipolární pučení. Jestliže se pupen neoddělí od mateřské buňky po vzniku přepážky, jsou k sobě spojeny a tvoří se pseudomycelium. Pokud se na něm vytváří shluky kulatých buněk, jedná se o blastokonidie. Ty se mohou dále oddělovat a množit pučením. Nebo může nastat rozpad mycelia na válcovité buňky tzv. arthrokoniidie. Třetí možností je balistokonidie, kdy vznikají oválné buňky na stopkách (Janderová a Bendová, 1999).

Některé kvasinky se pohlavně rozmnožují a podle toho se dělí na: askomycety (*S. cerevisiae*), basidiomycety (*Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.*) a deuteromycety (*Candida spp.*, *Brettanomyces spp.*) (Walker, 2009).

U kvasinek, které patří mezi askomycety a basidiomycety, dochází za ideálních podmínek k pohlavnímu rozmnožování, kde může dojít ke konjugaci haploidních buněk nebo vzniku diploidní zygoty. Ta se dále vegetativně rozmnoží nebo dojde ke sporulaci.

Pro svůj život využívají vodné prostředí, živiny (uhlík, dusík) a přítomnost kyslíku, který je nezbytnou součástí při množení. Některé druhy jsou schopny žít i v prostředí s vysokým nebo nízkým obsahem cukrů či solí. Důležitá je pro ně také teplota prostředí. Kvasinky rostou obvykle při 25 – 30°C. Ale některé druhy jsou schopné růst, nebo se pouze množit při teplotě do 20°C. Jiným vyhovuje daleko vyšší teplota, až do 50°C (což je maximální teplota). Většina kvasinek velmi dobře roste při pH okolo 4,5 a 6,5 (Janderová a Bendová, 1999).

K růstu potřebují makronutrienty. Důležitými jsou uhlík, dusík, kyslík, draslík, fosfor a stopové množství mědi, zinku nebo třeba vápníku. Využívají i růstové faktory. Těmi bývají organické sloučeniny ve velmi nízkých koncentracích. Ty nejsou využívány jako zdroj energie, ale například pro specifické katalytické reakce v buňkách. Mezi růstové faktory se řadí vitamíny. Jsou součástí koenzymů, aminokyselin, sterolů, purinů, pyrimidinů a dalších sloučenin (Walker, 2009).

Některé kvasinky jsou i součástí lidského mikrobiomu. Mohou žít jako komenzálové nebo oportunní patogeny, které mohou být pro člověka až smrtelné. Dají se izolovat z půdy,

roślin, zvířat a vody (hlavně znečištěné a odpadní vody). Na rozdíl od bakterií, nejsou kvasinky všude přítomné. Záleží na řadě faktorů, ale také na zdroji uhlíku, dusíku a na přítomnosti antibiotik (Janderová a Bendová, 1999).

1.1 Morfologie

Kvasinky jsou v porovnání s bakteriemi daleko větší. Jejich velikost závisí na daném druhu kvasinky. Velikost se pohybuje v rozmezí 2-50 μm . Šířka buňky bývá 1-10 μm . Kvasinky jsou tvarově rozmanité. Mohou být kulaté, protáhlé, elipsovité, vytvářet pouzdra a mycelia. Záleží na podmínkách, ve kterých žijí a na životním cyklu. Některé kvasinky vytvářejí pigmentové zbarvení během kultivace. Rostoucí kolonie mohou být krémově, černě, bíle, růžově nebo žlutě zbarveny. (Walker, 2009) Podle typu kultivačního média se dá zjistit, zda kvasinky fermentují nebo produkují ureázu (Janderová a Bendová, 1999).

1.1.1 Identifikace kvasinek

K identifikaci kvasinek se využívají molekulární biologické metody: RFLP a PCR. RFLP je metoda, která pomocí restrikčního enzymu (endonukleáza) štěpí molekulu DNA na fragmenty v restrikčním místě. Vzniklé fragmenty se zjišťují pomocí elektroforézy (Ness, 1993). Další metodou je PCR, kde dojde k amplifikaci specifických krátkých úseků DNA. Při vysoké teplotě nejprve dojde k denuraci DNA. Následně k navázání a elongaci primerů pomocí enzymu DNA polymeráza (Edel, 1998).

1.2 Složení buňky

Kvasinky se řadí mezi eukaryotní organismy, které mají plasmatickou membránu, pouzdro, buněčnou stěnu, jádro, mitochondrie, vakuolu, peroxisomy, cytoskelet. V dalším textu jsou komentovány pouze některé orgány (Janderová a Bendová, 1999, Walker 2009).

1.2.1 Pouzdro

Ne všechny kvasinky vytvářejí pouzdro. Mezi ty, co pouzdro tvoří, patří: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Lipomyces* a další. Kolonie kvasinek mající pouzdro, vytváří slizovitý povrch. Pouzdro nebývá součástí buněčné stěny a je tvořeno ze sítě polysacharidů,

skládajících se ze sacharidů jako je manóza a kyselina glukuronová. Slouží jako částečná ochrana před dehydratací a jinými nepříznivými podmínkami (Janderová a Bendová, 1999).

1.2.2 Buněčná stěna

Je složena z polysacharidů (glukany, chitin) a proteinů (manonprotein). V buněčné stěně jsou zastoupeny dva typy glukanu: β -1,3-glukan je fibrilární a tvoří vnitřní vrstvu stěny. β -1,6-glukan je amorfni a nachází se ve střední vrstvě stěny.

Chitin se nalézá v blízkosti jizev. Obsah chitinu v buněčné stěně závisí na kultivačních podmínkách. Při vyšším obsahu NaCl klesá obsah chitinu a naopak. Glukany a chitin jsou zodpovědné za strukturní integritu a tvar buňky.

Manoproteiny vytvářejí manosylové řetězce ve vnější vrstvě stěny, které v elektronmikroskopickém preparátu připomínají kartáčovitý vzhled. Tyto proteiny určují antigenní vlastnosti kvasinek a mohou mít vliv na patogenitu (Janderová a Bendová 1999, Ashbee a Bignell, 2010). Proteiny buněčné stěny bývají mezi sebou propojeny disulfidickými můstky (Klis, 2002).

Proteiny buněčné stěny jsou kovalentně vázány k β -1,3-glukanu a chitinu přes β -1,6-glukan. Pokud jedna z těchto základních složek chybí, bývá to pro kvasinku až smrtelné. Toho se může využívat v léčbě patogenních kvasinek (Klis, 2002).

Součástí buněčné stěny jsou i jizvy. Ty vznikají v době a místě, kde se oddělil pupen. Mají obvykle kruhovitý tvar a jejich počet souvisí s počtem dělení. Dají se barvit fluorescenčními barvivy. Příkladem fluorescenčního barviva je primulin. Nejvíce viditelné jsou okraje jizev. Ty při barvení silně fluoreskují (Janderová a Bendová, 1999, Ashbee a Bignell, 2010).

1.2.3 Peroxisomy

Probíhá zde například rozklad peroxidu vodíku katalyzovaný katalázou, degradace mastných kyselin nebo přeměna methanolu. Nejvíce vyvinuté peroxisomy se nacházejí u kvasinek, které využívají methanol za vzniku formaldehydu a peroxidu vodíku. Formaldehyd se v peroxisomech přeměňuje na dihydroxyaceton a glyceraldehyd-3-fosfát. Peroxid vodíku se rozkládá na vodu a kyslík. Vzniklé konečné produkty slouží pro výstavbu buněčných komponent (Janderová a Bendová, 1999, Van, 2006).

Mezi methyltrofní kvasinky patří *Pichia pastoris*, *P. methanolica* a *C. boidinii* (Van, 2006).

1.2.4 Vakuola

Počet vakuol a jejich velikost se mění během růstu a množení buňky. Ve fázi stacionárního růstu buňky se v ní obvykle nachází jedna velká vakuola. Při množení je v buňce více vakuol, ale daleko menších, než při růstu. V průběhu cyklu se vakuola jednou či dvakrát rozdělí. Kvasinkové vakuoly se řadí mezi degradační organely, které jsou metabolicky aktivní. Mezi její hlavní funkce patří hydrolýza makromolekul, proteolýza, udržování pH, osmoregulace, skladování aminokyselin, vápníku a fosfátů. (Walker 2009, Van den Hazel a Kielland, 1996).

1.2.5 Jádro

U některých kvasinek bývá jádro dobře pozorovatelné ve fázovém mikroskopu díky výrazné struktuře. Ta je zachována i během uzavřené mitózy, kde se jaderný obal nerozpouští. Někdy je možné pozorovat jadérko, které bývá v mikroskopu tmavší oproti jádru. Uvnitř jadérka se nacházejí ribonukleoproteiny, sloužící jako prekurzory rRNA (Janderová a Bendová, 1999).

1.3 Metabolismus

1.3.1 Transport látek

Transport látek do buňky je možný přes buněčnou stěnu a přes plazmatickou membránu. Průchodnost molekul závisí na náboji a tvaru molekuly a v jaké fázi růstu se kvasinka nachází. Molekuly jsou do buňky transportovány buď prostou difúzí, nebo pomocí přenašečů. Menší molekuly, například glycerol, mohou projít skrz plazmatickou membránu prostou difúzí přes hydrofilní póry. Glukóza je přenášena pomocí speciálních přenašečů usnadněnou difúzí nebo aktivním transportem. U kvasinek formou symportu (Janderová a Bendová, 1999).

1.3.2 Metabolismus uhlíku

Kvasinky získávají uhlík ve formě organických sloučenin. Nejčastěji využívaným cukrem pro zdroj energie je glukóza, fruktóza, manóza a sacharóza. Tyto cukry jsou glykolýzou a alkoholdehydrogenázou přeměňovány na ethanol a oxid uhličitý (Walker, 2009, Demain a Kurtzman, 1998). U kvasinek probíhá glykolýza v cytoplazmě. V prvním kroku dochází k navázání fosforu na glukózu za spotřeby ATP. Vzniklá glukóza-6-fosfát se za účasti izomerázy mění na fruktózu-6-fosfát, která se za spotřeby ATP přemění na glyceraldehyd-3-fosfát. V dalším kroku glykolýzy dochází k přeměně glyceraldehydu (dehydrogenací) na pyruvát.

Odbourávání pyruvátu probíhá za přítomnosti (aerobní odbourávání) nebo nepřítomnosti kyslíku (anaerobní odbourávání). Za aerobních podmínek pyruvát reaguje s koenzymem A. Vzniklý acetylCoA následně vstupuje do Krebsova cyklu, kde vzniká CO₂, H₂O a energie. Za anaerobních podmínek je u kvasinek pyruvát přeměněn na acetaldehyd. Konečným produktem je ethanol a CO₂ (Zamora, 2009).

Kvasinky jako je *Candida shehatei*, využívají pro svůj růst a fermentaci D - xylósu. Některé metylotrofní kvasinky (*Pichia pastoris*) získávají uhlík z methanolu. To má velké uplatnění v průmyslu, kde se kvasinky využívají pro výrobu α -ketoglutarátu nebo kyseliny citrónové (Walker, 2009, Demain a Kurtzman, 1998).

1.3.3 Metabolismus dusíku

Kvasinky nejsou schopné vázat molekulární dusík. Proto ho nejčastěji přijímají ve formě amonné soli. Nejběžnější solí bývá síran amonný, ten se přidává i do médií, protože poskytuje zdroj dusíku a síry. Další možným zdrojem dusíku jsou dusičnany, organické sloučeniny dusíku: aminokyseliny (glutamin, kyselina asparagová) a peptidy (glutation). Tyto formy dusíku mohou být intracelulárně katabolizovány nebo se uchovávají ve vakuole, která slouží jako velká zásobárna dusíku. Amonné ionty mohou být přímo přeměňovány na glutamin a glutamát, které bývají prekurzory pro biosyntézu dalších aminokyselin (Walker, 2009).

1.4 Využití kvasinek v průmyslu

Kvasinky jsou schopné fermentace, čehož se využívalo už v historii. Už staří Sumerané používali kvasinky pro výrobu piva. Ve starověkém Římě pro pečení kynutého

chleba a v Mezopotámii vyráběli pomoci kvasinek víno. V dnešní době se fermentace pomocí kvasinek využívá v potravinářském průmyslu pro výrobu nápojů, mléčných výrobků a pečiva. Dále se kvasinky využívají v medicíně (výroba vitamínů a léčiv), potravinářský průmysl, zemědělství, v životním prostředí (při napadení rostlin, čištění vzduchu a vody) a k výrobě chemikálií (kyselina citrónová). Jsou také neocenitelné jako modelové eukaryotické buňky pro biologické a biomedicínské výzkumy, hlavně v oblasti onkologie, farmakologie, toxikologie, virologie a lidské genetiky (Walker, 2009, Johnson a Echavarri-Erasun, 2011).

Pekařské kvasinky

Saccharomyces cerevisiae je nejčastěji využívanou kvasinkou pro výrobu pečiva ve formě droždí. Výhodou této kvasinky při pečení, je tolerance vysoké hladiny sacharózy, odolnost během zmrazování a odmrazování pečiva a rychlá fermentace (Bekatorou a Psarianos, 2006).

Pivní kvasinky

K výrobě piva se používají kvasinky *S. cerevisiae* pro svrchní kvašení a *S. uvarum* pro spodní kvašení. Během spodního kvašení se teplota pohybuje kolem 10 °C. Po fermentaci klesají na dno, kde se shlukují. Tyto kvasinky jsou schopné zpracovávat cukry a výsledkem je vyšší procento alkoholu. Svrchní kvašení probíhá při teplotě kolem 20 °C. Po skončení fermentace se většina kvasinek nachází na povrchu fermentované kapaliny, kde spolu s CO₂ vytvářejí pěnu. Tato piva mívají výraznější chuť a vůni (Jin a Speers, 1998).

Probiotické kvasinky

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které zlepšují rovnováhu střevní mikroflóry. Často se užívají při léčbě průjmů antibiotiky (Van, 2006). Probiotika lze užívat ve formě tablet nebo jsou přidávány do mléčných výrobků, převážně do jogurtů a kefírů (Rai a Pandey, 2018). Za probiotika jsou nejčastěji považovány bakterie (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*), ale i některé kvasinky vykazují probiotický účinek. Nejvýznamnější a nejučinnější kvasinkou je *Saccharomyces boulardii*. Je rezistentní vůči antibiotikům a přežívá v gastrointestinálním traktu. Dalšími kvasinkami, které patří mezi probiotika jsou *Torulaspora delbrueckii* nebo *Kluyveromyces marxianus*.

K. marxianus má protizánětlivý účinek a napomáhá snižovat oxidační stres (D'Souza, 2002, Czerucka a Rampal, 2007).

1.4.1 Významné průmyslové kvasinky:

Rhodotorula glutinis

Rhodotorula glutinis je mezofilní kvasinka, protáhlého nebo elipsoidního tvaru neschopná fermentace. Reprodukují se polárním pučením a využívá mnoho sloučenin jako zdroj uhlíku (glukóza, ethanol, sacharóza a galaktóza). Tato kvasinka je schopná produkovat ureázu a koenzym Q. Je schopna syntetizovat lipidy, obsahující kyselinu palmitovou, olejovou nebo linoleovou. Toho se využívá v průmyslu. Lipidy s obsahem mastných kyselin slouží jako zdroj pro výrobu bionafty, mléčných výrobků a doplňků stravy. Kromě syntézy lipidů, je tato kvasinka schopna syntetizovat karotenoidy (červené, oranžové nebo žluté). Karotenoidy jsou využívány ve farmaceutickém, chemickém a potravinářském průmyslu. Karotenoidy mohou být ve farmaceutickém průmyslu použity jako prekurzor vitamínu A, antioxidanty (ochrana před oxidačními činidly, například kyslíkovými radikály), přípravky pro posílení imunity. V potravinářském průmyslu se často používají jako potravinářské barvivo.

Využití dalších kvasinek

Saccharomyces cerevisiae – pekařské droždí a výroba alkoholu (pivo, víno, ethanol)

Candida kefyr – výroba mléčných produktů (kefír)

Kluyveromyces lactis – výroba mléčných produktů (syrovátka, sýry s plísní)

Candida utilis – produkce krmné biomasy

Hansenula a *Pichia* – využití v klonovacích technologiích

Starmerella – tvorba chuti vína během fermentace

Yarrowia – proteiny z uhlovodíků

Zygosaccharomyces – fermentace cukru

Schizosaccharomyces – alkoholová paliva, některé nápoje

(Walker, 2009, Johnson a Echavarri-Erasun, 2011)

2 Patogenita

Některé druhy kvasinek se řadí mezi patogeny. Nejznámějšími patogenními kvasinkami jsou někteří zástupci rodu *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* nebo *Malassezia*. Jedná se o oportunní patogeny, které u oslabených pacientů vyvolávají závažná onemocnění. (Janderová a Bendová, 1999) Tyto kvasinky bývají komenzály sliznic a kůže. Pokud dojde k narušení slizniční bariéry, dostávají se do těla, kde způsobují infekce. Tyto kvasinky využívají řadu faktorů virulence, které jim pomáhají proniknout do hostitelské buňky pomocí hydrolytických enzymů, růst, proliferovat, metabolicky se přizpůsobit hostitelskému prostředí a vytvářet biofilmy pro svou ochranu (Dadar, 2018).

Můžeme je nalézt ve vodě, vzduchu, půdě, v mléčných výrobcích, na rostlinách a na jídle. Mohou být přenášeny i holuby nebo hmyzem (Janderová a Bendová, 1999).

2.1 Patogenní kvasinky

2.1.1 *Candida spp*

Některé druhy kvasinek rodu *Candida* patří mezi oportunistické patogeny. Způsobují onemocnění zvané kandidóza. Kandidóza je nejčastěji vyvolána kvasinkou *Candida albicans*, která se u zdravých lidí většinou vyskytuje jako komenzál. Tuto kvasinku můžeme nalézt v moči, stolici nebo sputu, aniž by vyvolala onemocnění. U osob se sníženou imunitou, specifickou imunodeficiencí, po chirurgickém zákroku, cukrovkou je však významným patogenem. Kandidóza postihuje sliznice, ústní dutinu, gastrointestinální trakt, kůži a mnoho dalšího. Mezi syndromy infekce patří dermatitida (různé záněty kůže), jaterní selhání a zánět močových cest. Vznik kandidózy závisí na řadě faktorů, mezi něž patří přemnožení kvasinky, která jinak žije jako komenzál, dále imunitní systém člověka a neporušená ochranná bariéra (kůže, sliznice) (Cooper, 2011, Wellehan, 2016).

Důkazem *C. albicans* je GT (Germ tube) test. Tento test se používá pro rychlou identifikaci *C. albicans*. Tato kvasinka je jediná schopná do dvou hodin po inokulaci na speciálním médiu vytvářet zárodky hyf (Mackenzie, 1962). Další možností průkazu kvasinky je PCR metoda nebo využití půd s kyselinou fosfomolybdenovou. Na této půdě *C. albicans* vytváří olivově hnědý nátěr.

Existují ale i jiné patogenní druhy, které způsobují jak povrchové, tak i vnitřní infekce: *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. norvegensis* atd. Tyto kvasinky

většinou způsobí vaginitidy, záněty endokardu anebo akutní záněty středního ucha (Wellehan, 2016).

2.1.2 *Cryptococcus neoformans*

Jedná se o oportunně patogenní kvasinku, která zahrnuje sérotypy A, D a AD. Patří mezi haploidní basidiomycety. Díky silné vrstvě pouzdra, vytváří sliznaté kolonie. *Cryptococcus* je schopen využívat inositol. Ten slouží k jeho průkazu. Jako jediná kvasinka je schopna využívat kreatinin jako zdroj uhlíku, který je obsažen v trusu holubů a švábů. Ti bývají nejčastějšími přenašeči. Většinou se jedná o plicní infekce vzniklé inhalací. U oslabeného jedince může napadat nervový systém (šíří se do mozku a míchy), a to bývá často smrtelné. Tato kvasinka může vyvolat i onemocnění kůže, očí, sliznic nebo kostí (Cooper, 2011, Wellehan, 2016).

2.1.3 *Malassezia*

Malassezia patří mezi lipofilní kvasinky a je součástí mikroflóry kůže. Rod *Malassezia* se skládá ze 14 druhů. Nachází se v místech s velkou produkcí kožního mazu jako je pokožka hlavy, horní část trupu nebo obličej. Udržuje se pomocí mastných kyselin přítomných v kožním mazu. Při silném přemnožení způsobuje systémové nebo povrchové (chronické) infekce.

Prvním kožním onemocněním, které *Malassezia* způsobuje, se nazývá pityriáza. Jedná se o poruchu pigmentace kůže. K pityriáze dochází, když kvasinka produkuje látky, které způsobují inhibici tvorby pigmentu. Je to chronické onemocnění a vyskytuje se na různých částech těla. Například na hlavě nebo zádech. Mezi další způsobená kožní onemocnění patří *Tinea versicolor* způsobená *T. furfur*, *T. globosa* a *M. sympodialis*. Jedná se o chronické onemocnění kůže, kde se tvoří tmavé či světlé skvrny. Dále sem patří seborrhoická dermatitida, lupénka, otitis a atopický ekzém. (Cooper, 2011, Thayikkannu a Kindo, 2015).

Mezi systémové patří infekce krevního oběhu hlavně u novorozenců s katétrem a u starších osob s oslabeným imunitním systémem (Thayikkannu a Kindo, 2015).

2.1.4 *Trichosporon*

Tento rod produkuje ureázu a vytváří mycelia. Kolonie mají voskový, sametový, bílý až nažloutlý vzhled a jsou vyvýšené. Nachází se stejně jako *Malassezia* na kůži. Největšímu riziku jsou vystaveni pacienti po chemoterapii, chirurgickém zákroku a pacienti s HIV. U imunokompromitovaných pacientů způsobuje diseminované infekce, které postihují játra, plíce a slezinu. Nejznámějšími druhy jsou *T. cutaneum* a *T. asahii* (Wellehan, 2016).

2.1.5 *Sporobolomyces*

Tento rod se vyskytuje v různém prostředí. Vytváří růžové nebo oranžové kolonie a lze jej rozeznat od jiných kvasinek. Tvoří reprodukční blastokonidie. *Sporobolomyces* způsobuje u lidí dermatitidu, tvorbu nosních polypů, puchýře na kůži, eumycetomu (granulomatózní onemocnění, postihující hlavně končetiny, někdy i břišní nebo hrudní stěnu). U oslabených pacientů může vyvolat invazivní infekci. Byl zaznamenán malý počet případů nakažením (Cooper, 2011, Wellehan, 2016).

2.1.6 *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* patří mezi basidomycety. Kvasinky jsou všudypřítomné a lze je nalézt ve vzduchu, půdě, jezerech, v mléce a v potravinách. Vytváří růžové až červené kolonie. Charakteristickým znakem této kvasinky je, že nevytváří hyfy ani pseudohyfy. *Rhodotorula* je součástí mikrobiomu kůže a gastrointestinálního traktu. Je známo osm druhů, z nichž tři způsobují u lidí onemocnění. Jsou to *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* a *R. minuta*. *R. mucilaginosa* způsobuje u pacientů s hematologickými malignitami a zavedenými centrálními katétry převážně infekce krevního oběhu, dále meningitidy, oční infekce, endokarditidy a peritonitidy (Cooper, 2011, Wellehan, 2016, Wirth a Goldani, 2012).

3 Rod *Candida*

Existuje zhruba 15 druhů kvasinek rodu *Candida*, které mohou být pro člověka patogenní. Nejvíce hlášených invazivních kandidóz je způsobeno druhy: *Caninda albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* a *C. tropicalis*. Tyto druhy se liší virulencí, epidemiologií a citlivostí na antimykotika (Dadar, 2018).

Candida spp. využívají širokou škálu faktorů virulence, která umožňuje infikovat hostitele. Mezi faktory virulence patří: exprese adhezínů a průnik do hostitelské buňky, tvorba biofilmu, vylučování hydrolytických enzymů, metabolická flexibilita, přizpůsobení změnám pH okolního prostředí, morfologické formy (kvasinková je nutná pro klonální expanzi a hyfy jsou potřebné pro virulenci) a jiné (Dadar, 2018, Mayer, 2013).

Buněčný povrch slouží jako hlavní antigenní determinant, kde dochází k prvnímu kontaktu s hostitelem. Při kontaktu s povrchem (například hostitelské buňky) dojde k přeměně kvasinky na hyfy. Růst hyf je řízen přes thigmotropismus. Thigmotropismus napomáhá k úplnému poškození epiteliálních buněk. Exprese invazinů zprostředkovává vstup patogenu do hostitelské buňky přes indukovanou endocytózu nebo přes aktivní proniknutí do buňky (Mayer, 2013).

Candida spp. je součástí lidského těla jako mikroflóra zažívacího traktu, úst a sliznic. Při jejím přemnožení, ale i při poruše slizniční bariéry, může dojít k závažným infekcím. Takto způsobená onemocnění se nazývají kandidózy (Cooper, 2011, Dadar, 2018).

Kandidózy se vyskytují převážně u imunokompromitovaných lidí. Jedná se především o pacienty s AIDS, rakovinou nebo o příjemce transplantace orgánů a kostní dřeně. Velké riziko nastává i u chirurgického zákroku, u předčasně narozených dětí, u pacientů s jaterním onemocněním nebo diabetes mellitus, při zavedení močového katetru nebo při užívání širokospektrálních antibiotik. Nejzávažnější jsou kandidózy v krevním oběhu, které vedou k vysoké úmrtnosti. Zásadním problémem při léčbě, bývá vysoká odolnost některých kmenů k běžně používaným antimykotikům (Dadar, 2018).

Rozlišit jednotlivé druhy kvasinek rodu *Candida spp.* je někdy obtížné. Proto se využívá fenotypové a genotypové charakteristiky pomocí DNA. Další možností jak jednotlivé kvasinky od sebe rozlišit je použití CHROM agaru, kde se za určité teploty rozlišují barevné kolonie a jejich růst na daném agaru (Cooper, 2011).

3.1 Druhy *Candida*

3.1.1 *Candida albicans*

Nejznámější a nejvíce studovaná a spojená s onemocněním je *Candida albicans*. Kvasinku *C. albicans* nalézáme v gastrointestiálním traktu, na kůži a sliznicích, kde nezpůsobuje žádné zdravotní komplikace. Pokud dojde k narušení normální mikroflóry je schopna vyvolat symptomatické infekce sliznic (Votava, 2010).

Candida albicans je polymorfní houba, která roste buď jako kvasinka elipsovitého tvaru nebo jako hyfa. Obě tyto formy jsou důležité při patogenitě. Záleží na životních podmínkách. Při pH nižším než 6 roste jako kvasinka, ale při pH vyšším jak 7, je vyvolán růst hyf. Existuje ale i řada podmínek, která podporuje růst hyf. Tvorbu hyf stimuluje přítomnost séra, nedostatek nutrientů a oxid uhličitý. Přechod mezi těmito formami se nazývá dimorfismus (Mayer, 2013).

3.1.2 *Candida glabrata*

Z morfologického hlediska jde o haploidní kvasinku, blastokonidii, která je velikostně menší než *C. albicans*. Vytváří biofilm, fermentuje glukózu, ale netvoří hyfy. (Perlin, 2015).

Candida glabrata byla dříve považována za nepatogenní kvasinku. U zdravých jedinců se vyskytuje jako saprofyt ústní dutiny. V současnosti je ale považována za oportunní patogenní kvasinku, z důvodu častého užívání širokospektrých antibiotik. Způsobuje závažné systémové infekce. Jde o infekce orální, krevního oběhu a vaginitidy. Po *C. albicans* je třetí nejčastější příčinou vzniku kandidóz. Nachází se u imonokompromitovaných pacientů a pacientů s diabetes mellitus. Tyto infekce se špatně léčí, z důvodu rezistence na běžná antimykotika (Perlin, 2015, Rodrigues a Silva, 2014).

3.1.3 *Candida parapsilosis*

Pod mikroskopem jsou vidět kulaté až válcovité buňky. Na rozdíl od *C. glabrata*, je schopna stejně jako *C. albicans* existovat ve formě jako kvasinka nebo pseudohyfa. Pseudohyfy mohou být dlouhé a větvit se. Jejich tvorba je úzce spojena s přítomností aminokyselin v kultivačním médiu (hlavně citrulin). (Cooper, 2011, Fidel a Vazquez, 1999)

Candida parapsilosis patří mezi komenzály kůže. Pokud dojde k narušení této bariéry, stává se patogenem. Způsobuje onemocnění převážně u novorozenců, dále u pacientů se zavedenými intravenózními katétry nebo implantáty. Způsobuje meningitidy, endokarditidy a peritonitidy (zánět pobřišnice). (Fidel a Vazquez, 1999).

3.1.4 *Candida krusei*

Candida krusei existuje ve dvou formách stejně jako *C. albicans*. Jde tedy o dimorfní, protáhlou buňku, která tvarem připomíná rýži a patří mezi blastokonidie. Na rozdíl od jiných *Candida spp.* má daleko silnější buněčnou stěnu, která se skládá ze šesti vrstev (Chai a Denning, 2010).

Má vrozenou rezistenci na Flukonazol a sníženou citlivost na Amfotericin B. Je součástí ústní dutiny. Pokud dojde k narušení rovnováhy, stává se patogenem, který způsobuje invazivní kandidózy. Nebezpečným patogenem se stává pro pacienty s hematologickými malignitami, pro příjemce implantátů nebo pro pacienty s neutropenií (mají snížený počet leukocytů) (Cooper, 2011, Chai a Denning, 2010).

3.1.5 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis je diploidní, dimorfní kvasinka. Převážně se nachází v teplých a vlhkých oblastech světa. U onkologicky nemocných lidech a novorozenců s nízkou porodní hmotností, hrozí zvýšené riziko vzniku kandidóz, které mohou být smrtelné. Častým onemocněním bývá nozokomiální kandidémie a kandiurie (Cooper, 2011, Trofa, 2008).

3.1.6 *Candida dubliniensis*

Candida dubliniensis se nalézá v ústní dutině. Je náchylná k běžně užívaným antimykotikům. Většinou bývá zaměňována za *C. albicans*. K jejich rozlišení se používají speciální kultivační média, kde se rozlišuje barva kolonií, tvorba hyf, chlamydospor atd.

U pacientů s HIV a AIDS způsobuje orální nebo erytematózní kandidózy (Samaranayake, 1994, Sullivan a Coleman, 1998).

Mezi další *Candida spp.* patří: *C. guilliermondii* a *C. lusitaniae*. Jedná se sice o oportunní patogenní kvasinky, ale výskyt infekcí je nízký. Nalézáme je u pacientů s hematologickými malignitami a u imonokompromitovaných pacientů. Jedná se především

o invazivní, nozokomiální infekce trávicího a močového traktu nebo endokarditidy (Cooper, 2011).

3.2 Typy kandidóz

3.2.1 Orální (ústní) kandidóza

Orální kandidóza může být rozdělena do několika forem. Nejběžnější jsou akutní pseudomembranózní (označována jako „moučnivka“) a chronická atrofická kandidóza. Pseudomembranózní kandidóza se vyskytuje u malých dětí a u starých lidí. Na sliznici tváří, jazyka a dásních se objevují bílé povlaky. Chronická atrofická kandidóza je často asymptomatická. Objevuje se u lidí se zubní protézou, kde tvoří angulární chelitidu (zánětlivé postižení ústních koutků) a zarudnutí (někdy bývají až bolestivé) (Ashbee a Bignell, 2010).

3.2.2 Vaginální kandidóza

Tato kandidóza se vyskytuje u mnoha žen. Mezi její příznaky patří svědění, pálení a bolest. Tato infekce bývá nejvíce způsobena kvasinkami *C. albicans*, ale i *C. glabrata* a *C. krusei*. Vyskytnout se může i u těhotných žen ((Ashbee a Bignell, 2010).

3.2.3 Diseminovaná kandidóza („roztroušená“)

Jde o systémovou kandidózu. Kvasinka, *C. albicans*, se dostane do krve a je přenesena do tkání, kde může vyvolat rozsáhlé záněty. Nejdůležitější kandidóza bývá plic, jater, centrální nervové soustavy a ledvin. Diagnostika u těchto kandidóz bývá obtížná. Využívají se k tomu počítačová tomografie a mikroskopické vyšetření (Ashbee a Bignell, 2010, Zazula, 2005).

3.2.4 Kandidurie

Jde o kandidózu močových cest. Je způsobena převážně *Candida albicans* a častěji postihuje ženy, než muže. U zdravých jedinců je vzácná a vyskytuje se u pacientů, kteří podstoupili chemoterapii, mají zavedený katétr, užívají dlouhodobě antibiotika a u pacientů ve vyšším věku (Rozsypal, 2008, Gómez-López, 2008, Kladenský, 2016).

3.2.5 Endokarditida

Endokarditida je vzácné onemocnění, které bývá až smrtelné. Jde o zánětlivé onemocnění vnitřního povrchu srdce (endokardu) způsobené mikroby (bakteriální, mykotické), které postihuje jakoukoliv část srdce. Nejčastěji to bývají chlopní vady (Troubil, 2007).

3.3 Faktory virulence

3.3.1 Adheziny a invaziny

Candida spp. využívá soubor proteinů (adhezínů), které umožňují adhezenci na různé mikroorganismy, abiotické povrchy a hostitelské buňky. Adheziny jsou speciální proteiny nacházející se na povrchu buněčné stěny. Struktura proteinů se skládá ze tří částí. N-terminální část adhezinu obsahuje sacharidovou nebo peptidovou doménu a vyčnívá z buněčného povrchu. C-konec obsahuje místo pro připejení GPI místo a spojuje adhezín s buněčnou stěnou. Střední část adhezinu se skládá ze serinu a threoninu (Verstrepen, 2006). Jde o proteiny podobné aglutininovým sekvencím (Als1-Als19). Als1p a Als5p dokáží přilnout na buňky epitelu a na fibronektin. Během raného stádia infekce je důležitý Als1p, který adhezuje na ústní sliznici (Mayer, 2013). Dalším důležitým adhezínem je HWP1. N-konec HWP1 slouží jako substrát pro savčí transglutaminázu. Tato reakce usnadňuje kovalentní navázání hyf na hostitelskou buňku (Nobile, 2006). Mezi adheziny patří i Int1, který byl lokalizován na povrchu kvasinek. Kromě adheze, se podílí na střevní kolonizaci a virulenci (Mayer, 2013, Cooper, 2011).

3.3.2 Tvorba biofilmu

Mezi další faktory virulence patří tvorba biofilmu. Biofilmy jsou mnohobuněčné komunity připojeny k živým (biotickým) a neživým (abiotickým) povrchům a liší se u každého mikroba svojí strukturou a vývojem. Biofilmy se tvoří na tkáních, protézách, katétrech a dalších površích. Biofilmy kvasinek odolávají běžným antimykotikům, imunitnímu systému hostitele a okolním vlivům (pH, teplota) (Troubil, 2007). Tvorba biofilmu zahrnuje adhezenci kvasinek k substrátu, jejich proliferaci, vytváření hyf v horní části biofilmu, nahromadění extracelulární matrix a disperzi (rozptýlení) kvasinkových buněk z biofilmu (přispívá k virulenci). Je řízena několika transkripčními faktory. Mezi tyto

faktory patří: Bcr1, Tec1 a Efg1 (Mayer, 2013). Bcr1 je důležitý pro expresi proteinů buněčné stěny, dále podporuje adhezenci a řídí produkci Als1 a Als3. Tec1 reguluje transkripci Bcr1 (Nobile, 2006).

Nově byly objeveny další významné transkripční faktory: Ndt80, Rob1 a Brg1. Pokud by jeden z těchto faktorů chyběl, došlo by k defektní tvorbě biofilmu.

Při zrání biofilmu, je důležitá přítomnost extracelulární matrix, která obsahuje monosacharidy, polysacharidy a proteiny. Extracelulární matrix chrání buňky před imunitním systémem hostitele a antimykotiky. Extracelulární matrix je řízena pozitivními a negativními faktory. Mezi negativní regulační faktor patří Zap1. Ten snižuje tvorbu β -1,3-glukanu, který je důležitou složkou biofilmu při ochraně kvasinky. Pozitivními regulátory pro produkci β -1,3-glukanu jsou glukoamylázy, glukan transferázy a exoglukanázy (Mayer, 2013, Cooper, 2011, Bojsen a Andersen, 2012).

3.3.3 Produkování hydroláz

Po adhezi kvasinky na hostitelskou buňku (na její povrch) začnou růst hyfy. Tyto hyfy mohou vylučovat speciální hydrolázy, které kvasinkám usnadňují proniknutí do hostitelské buňky. Hydrolázy jsou sekretovány i blastosporami (kvasinkovou, nehyfální formou). Patří sem proteáza (enzym štěpící proteiny), fosfolipáza (enzym štěpící molekulu obsahující lipid s fosforem) a lipáza (enzym, který štěpí tuky na glycerol a mastné kyseliny). Jde o extracelulární enzymy, které narušují buněčnou membránu, a tak přispívají k patogenitě (Mayer, 2013, Cooper, 2011).

Sekretované aspartátové proteinázy (SAP) jsou produkovány *C. albicans*, *C. glabrata* a *C. parapsilosis*. U *C. albicans* je 10 izoenzymů SAP zodpovědných za aktivitu proteinázy. Sekretované aspartátové proteinázy 1-8 jsou vylučovány do extracelulárního prostoru. SAP 9-10 jsou ukotveny v membráně. Úlohou SAP je poškozování tkání, změna v imunitní odpovědi a zachování integrity povrchu kvasinek. Exprese SAP byla prokázána u systémových a orálních kandidóz (Sardi, 2013, Yang, 2003).

Fosfolipázy (PL) u *C. albicans* byly rozřazeny do 4 skupin: A, B, C a D. Enzymy hydrolyzují esterové vazby glycerolfosfolipidu, který je součástí buněčných membrán (Calderone a Clancy, 2011).

Dalším důležitým proteinem je hemolyzin, který je produkován kvasinkou k destrukci červených krvinek a následnému získání železa. Železo je důležitým prvkem pro vývoj kvasinky (Sardi, 2013).

3.3.4 Metabolická adaptace

Tato schopnost pomáhá nejenom kvasinkám, ale i dalším živým mikroorganismům přežít a získávat potřebné živiny v měnícím se prostředí. Tuto schopnost adaptace využívají patogeny v hostitelském prostředí.

Mezi hlavní živiny mikroorganismů patří glukóza, lipidy, aminokyseliny a proteiny. Mikroorganismy, které žijí jako komenzálové v zažívacím traktu se navzájem ovlivňují a regulují tak svůj růst a příjem živin. Pokud ale dojde k nerovnováze, například k diseminované kandidóze (infekce krve), získávají v krvi daleko více živin (glukózy) a začínají se rychle množit.

Dalším místem, kde se dokáží adaptovat je uvnitř makrofágů. Pokud dojde k fagocytóze makrofágem nebo neutrofilem, změní se nutriční podmínky. Fagocyt začne uvnitř produkovat reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály i antimikrobiální peptidy. Dochází i ke snížení koncentrace živin a kvasinka se musí co nejrychleji přizpůsobit. Z aminokyselin získává uhlík, neutralizuje vnitřní prostředí makrofágu a je schopna se i z něj dostat. A to tak, že inhibuje jeho produkci antimikrobiálních peptidů a sama indukuje tvorbu hyf, které pronikají skrz makrofág pomocí mechanických sil (Mayer, 2013).

3.4 Genom *Candida spp.*

Genom *Candida albicans* se skládá z osmi párů chromozomálních homologů. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,95-3,3 MB. I když se jedná o diploidní buňky, projevují vysoký stupeň plasticity genomu, chromozomální přeskupení vyskytující se v reakci na stres, to může vést k aneuploidii. Základními prvky chromozomu jsou centromera, počátek replikace DNA a telomery (Legrand, 2019).

3.4.1 Centromera

Centromera usnadňuje oddělení sesterské chromatidy pomocí tvorby kinetochoru během mitózy. Pro správnou funkci centromery je nutné její shlukování a strukturální integrita

kinetochoru. Při úbytku a poruše kinetochorového proteinu, dojde k přemístění a degradaci CENP - A, který tvoří centromery chromatinu (Zazula, 2005).

3.4.2 Replikace DNA, telomery a MRS

Začátek replikace DNA může být nalezena na dvou místech. Na ramenech chromozomu a v blízkosti centromery (nebo i přímo na centromeře). Centromerická DNA společně s proteiny homologní rekombinace hraje důležitou roli při vložení CENP-A do centromery (Zazula, 2005).

Telomery se nacházejí na konci chromozomu, zajišťují jeho replikaci a ochranu před degradací (Zazula, 2005).

Speciálním znakem genomu je hlavní opakování sekvence (MRS). Je přítomna na všech chromozomech, kromě chromozomu 3. Je složena ze tří podjednotek a pokrývá přibližně 3 % celkového genomu. Skládá se z euchromatinu (spiralizovaný chromatin) a heterochromatinu. MRS ovlivňuje četnost nondisjunkcí (selhání homologních chromozomů během buněčného dělení) a slouží pro vytvoření karyotypické rozmanitosti (Zazula, 2005).

3.4.3 Heterozygosita

Heterozygotita znamená přítomnost různých alel v jednom nebo více lokusech na homologních chromozomech. Heterozygotita maskuje jakékoliv škodlivé recesivní mutace, které mohou být přítomny v genomu. Při mitotické rekombinaci, genové přeměně mezi homologními chromozomy, křížení DNA nebo ztrátě chromozomu a duplikaci může dojít ke ztrátě heterozygotity. To může ovlivnit krátké úseky genomu. Mezi negativní podmínky prostředí, které vyvolají ztrátu heterozygotity patří UV světlo, oxidační stres a účinky antifungálních činidel (Legrand, 2019).

3.4.4 Aneuploidie

Aneuploidie je typ chromozomové mutace, kde dochází ke snížení nebo naopak ke zvýšení počtů chromozomů. Příčinou aneuploidie je chyba v chromozomální segregaci během mitózy a meiózy, kdy dojde k nerovnoměrné segregaci sesterských chromatid. Pokud je kvasinka vystavena tepelnému šoku, antimykotikům nebo vlivům hostitelského prostředí, může to vyvolat aneuploidii specifických chromozomů. Následkem mohou být fenotypové změny, které umožní kvasince rychle se přizpůsobit změnám životního prostředí. Příkladem

je izochromozom. Izochromozom se skládá ze dvou levých ramen chromozomu 5 obsahující geny *ERG11* a *TAC1*, které jsou zodpovědné za vznik rezistence na antimykotika (Forsche, 2014, Zhu, 2018).

4 Léčba kvasinkových infekcí

K léčbě slizničních nebo systémových infekcí, se podávají antifungální léčiva. Pro povrchové infekce se využívají lokální antimykotika a pro systémové infekce antimykotika perorální nebo intravenózní. Způsob jejich podání je důležitý pro volbu vhodného léku.

Existuje několik tříd: azolová a polyenová antimykotika nebo nová skupina antimykotik echinokandiny (MCManus a Coleman, 2014). Léčba kvasinkových infekcí není jednoduchá. Je závislá nejen na citlivosti daného druhu kvasinky, ale i na toxicitě léčiva a lékových interakcích. Vliv na úspěšnou léčbu má také zdravotní stav pacienta a kde se daná infekce či nemoc nachází (Canuto a Rodero, 2002). S nárůstem rezistence na léčiva se vědci snaží nacházet nová léčiva, která budou účinná proti patogenním kvasinkám, ale neohrozí zdraví pacienta (Rozsypal, 2008).

4.1 Druhy antimykotik

4.1.1 Azoly

Azoly se dělí na několik skupin. Mezi ty nejstarší patří imidazoly (Mikonazol, Klotrimazol), později triazoly (Flukonazol) a nejnovější skupinou jsou deriváty triazolu (Posakonazoly). (Spampinato a Leonardi, 2013) Podávají se jako perorální tablety, čípky, masti nebo intravenózně (Rozsypal, 2008). Tato antimykotika inhibují aktivitu cytochromu P450 (lanosterol-14 α -demethylázy), což je enzym podílející se na biosyntéze ergosterolu, který je nejvýznamnější sterolovou složkou v buněčné membráně kvasinek. Tím dojde i k inhibici růstu a replikace kvasinek. Léky jsou určeny pro léčbu lokálních a invazivních infekcí (Spampinato a Leonardi, 2013).

Nejčastěji se používají k léčbě kožních onemocnění způsobené *Malassezia spp.* nebo i orofaryngeálních kandidóz a kryptokokóz (Carrillo-Munoz, 2006). Například Flukonazol je účinný proti *Candida spp.* a lehce působí proti *Cryptococcus spp.* Některé druhy jsou vůči Flukonazolu rezistentní. Například *Candida krusei* a *Candida glabrata*. Tyto kvasinky se léčí pomocí Posakonazolu (Rozsypal, 2008).

4.1.2 Polyeny

Další skupinou léčiv jsou polyeny. Nejvíce užívanými polyeny jsou Amfotericin B a Nystatin. Tvoří komplex mezi molekulou antimykotika (Amfotericin B) a ergosterolem nacházejícím se v membráně. Dochází k narušení důležité lipidové složky a tvorbě pórů v membráně, což vede ke změně permeability membrány a úniku důležitých cytoplazmatických látek ven. To vede ke smrti buňky (Spampinato a Leonardi, 2013). Amfotericin B má silné fungicidní účinky. Působí proti *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* nebo *Cryptococcus spp.* Ale mezi nežádoucí účinky Amfotericinu B patří nefrotoxicita. Proto se používají jeho lipidové deriváty, které mají mnohem nižší toxický účinek, ale jsou stejně účinné (Rozsypal, 2008).

Užívají se v léčbě systémových mykotických onemocnění, při léčbě invazivní, diseminované a orofaryngeální kandidózy (Carrillo-Munoz, 2006).

4.1.3 Echinokandiny

Echinokandiny jsou cyklické lipopeptidy o molekulové hmotnosti kolem 1200 kD. Chemicky jde o cyklické hexapeptidy s N-acyl lipidovým postranním řetězcem. Existují tři klinicky významné echinokandiny: Kaspofungin, Mikafungin a Adinulafungin. Všechny tři echinokandiny jsou rozpustné ve vodě a liší se strukturou postranního řetězce, která je důležitá pro antifungální aktivitu. Podávají se pouze intravenózně. Jejich toxicita pro člověka je nízká, a tedy pro pacienta vhodná. Využívají se pro léčbu systémových mykóz způsobené druhem *Candida spp.* Jsou účinné i proti biofilmům. Vznik rezistence vůči echinokandinům je vzácný (Kofla a Ruhnke, 2011).

Hlavním úkolem echinokandinů je inhibice syntézy β -glukanů v buněčné stěně. Přesněji echinokandiny se váží na FKS1 a inhibují nekompetitivně enzym β -glukan syntázu, což vede k narušení strukturální integrity buněčné stěny (Spampinato a Leonardi, 2013). Toto poškození vede k zranitelnosti vůči osmotické lýze. (MCManue a Coleman, 2014, Rozsypal, 2008).

4.1.4 Flucytosin

Chemicky jde o fluorovanou pyrimidinovou bázi 5-fluorocytosinu, který inhibuje proteosyntézu. Flucytosin je aktivně transportován do buňky pomocí cytosin permeáza, kde je přeměněn na 5-fluorouracil a později pyrofosforylázou na kyselinu 5-fluorouridovou. Ta je dále fosforylována a zapsána do transferové RNA, kde dojde k blokování proteosyntézy. 5-fluorouracil se přemění na monofosfát 5-fluorodeoxyuridin, který inhibuje enzym thymidylát syntetázu. Tento enzym se podílí na syntéze DNA a na procesu dělení jader (Spampinato a Leonardi, 2013). Hlavním nežádoucím účinkem je toxicita. Používá se pouze v kombinaci s jinými léky pro léčbu kryptokokové meningitidy a těžkých kandidóz (Rozsypal, 2008).

4.1.5 Sordariny

Sordariny se řadí mezi významná a účinná antimykotika. Sordarin inhibuje syntézu proteinů u *C. albicans*. Cílovou molekulou je elongační faktor, který má na sobě vazebné místo pro toto léčivo. Tento faktor katalyzuje ribosomální translokaci během proteosyntézy.

Nejúčinnější bývají jeho deriváty, které pomáhají proti řadě kandidóz, aspergilóz a mnoho jiného (Gulati a Nobile, 2016).

4.1.6 Allylaminy

Mezi allylaminy patří terbinafin (Lamisil) a naftifin (Exoderil). Způsobují inhibici enzymu skvalen epoxidáza, který je důležitý pro tvorbu ergosterolu v buněčné stěně. Nastává nedostatek ergosterolu a nahromadění skvalenu (Patočka, 2011).

Používá se pro léčbu kožních mykóz. Jeho nevýhodou je nízká účinnost proti kvasinkám. Více se využívá proti plísňovému onemocnění (Carrillo-Munoz, 2006).

4.1.7 Griseofulvin

Jedná se o ATB, které je produkováno druhem *Penicillium*. Griseofulvin má fungistatické účinky na dermatofyty. Při jeho působení dochází k poruše syntézy nukleových kyselin a růstu hyf (Silva, 2012).

4.1.8 Thiokarbamátové deriváty

Thiokarbamátové deriváty (Tolnaftát, Tolciklát) slouží jako topické léky, které mají širokospektrální účinek. Má podobný účinek jako azolová antimykotika. Dochází k inhibici syntézy ergosterolu v buněčné membráně. Používají se při léčbě dermatomykóz (Silva, 2012).

4.1.9 Morfolinové deriváty

Je to velmi účinné, širokospektrální antimykotikum. Mezi účinné topické léky patří Amorolfin, který má fungistický účinek. Jako ostatní antimykotika, tak i toto léčivo narušuje biosyntézu ergosterolu. Amorolfinem se léčí onychomykózy (infekce nehtů) vyvolané rodem *Malassezia* (Silva, 2012).

4.1.10 Ciklopirox olamin

Ciklopirox olamin je chemicky hydroxypyrimidin, který slouží pro léčbu kožních infekcí, kandidóz nebo dermatofytózy. Ciklopirox, chelatuje kationty železa a hliníku. Tím dojde k inhibici enzymu, který není schopný degradovat peroxid vodíku v buňce (Buchta, 2009).

4.1.11 Léčba slizniční infekce

Kromě běžně užívaných azolových antimykotik, se lokálně jako dezinfekce používá i genciánová violet, borax glycerin nebo jódové přípravky (Silva, 2012).

5 Mechanismus rezistence

Rezistence znamená, že daný mikroorganismus nereaguje na podávané léčivo. Rezistenci můžeme dělit na mikrobiologicky primární, sekundární a klinickou.

Primární rezistence, neboli vnitřní, vzniká u mikroorganismů, který nikdy nepřišel do styku s daným léčivem a jeho působením. Sekundární rezistence je získaná. Daný mikroorganismus se již setkal s léčivem nebo jeho účinnou látkou. Klinická rezistence vzniká při selhání terapie, při opětovném objevení infekce nebo dlouhodobém užívání antimykotik a jiných léků (Ghannoum, 1999, Loeffler a Stevens, 2003).

Mikroorganismy získávají rezistenci vůči danému léčivu prostřednictvím genomové mutace nebo přes horizontální přenos genetické informace (jeden organismus získává genetický materiál jiného jedince). Mikroorganismy mohou získat geny, které kódují cílové enzymy (odstranění vazebného místa, zvýšení produkce enzymů), efluxní pumpy a metabolickou dráhu (tvorba sterolů) (Tenover, 2006, Ghannoum a Rice, 1999).

5.1 Rezistence na azoly - Flukonazol

Jak již bylo zmíněno, Flukonazol inhibuje biosyntézu ergosterolu. Je známo několik mechanismů rezistence vůči azolům. Mezi ně patří nadměrná exprese *ERG11*, zvýšená exprese efluxních pump, bodové mutace *ERG11* (Waugh, 2007).

5.1.1 Bodové mutace

Bodové mutace jsou jedním z mechanismů rezistence, kde v enzymu dochází k aminokyselinovým substitucím. Bylo zjištěno několik aminokyselinových substitucí v *ERG11*, který kóduje enzym lanosterol-14 α -demethyláza. Tyto mutace mohou změnit afinitu enzymu k léčivu u kvasinky *C. albicans*. Jedna z bodových mutací vede k nahrazení argininu v poloze 467 lysinem. Tato záměna může mít za následek změny v hem kofaktoru. U další bodové mutace v genu *ERG11* dochází k nahrazení threoninu alaninem (T315A) v poloze 315. Mutace T315A se nachází v aktivním místě enzymu, snižuje se enzymatická aktivita a vazba azolů na aktivní místo (White a Marr, 1998).

5.1.2 Zvýšená exprese *ERG11*

Zvýšená exprese *ERG11* snižuje citlivost na Flukonazol. Doprovází expresi efluxních pump a bodovou mutaci R467K (náhrada argininu lysinem). Ke zvýšení exprese *ERG11* může docházet prostřednictvím amplifikace genu *ERG11* (duplikací 5. chromozomu) nebo přítomností izochromozomu 5L. U *C. glabrata* dochází k duplikaci celého chromozomu, což indukuje zvýšení počtů kopií genu *ERG11* (Klepser, 2001, Sasse, 2012).

5.1.3 Efluxní pumpy

Efluxní pumpy jsou důležitým mechanismem rezistence. Snižují intracelulární akumulaci léčiva dvěma způsoby. Může dojít k zabránění vstupu léčiva do buňky nebo k jeho odstranění. Existují dva typy efluxních pump: MFS proteiny a ABC transportéry. Liší se svou strukturou, zdrojem energie a cílovými substráty (Klepser, 2001).

MF proteiny využívají jako zdroj energie nutný pro transport protonový gradient. MF proteiny jsou kódovány MDR1 genem.

ABC získávají energii hydrolýzou ATP. ABC (transportér adenosintrifosfátu vázající kazetu prostřednictvím aminokyselinové sekvence) se skládá ze 4 domén: dvou membránových a dvou cytoplazmatických domén. ABC transportéry jsou kódovány několika geny, převážně *CDR* geny (*CDR1* a *CDR2*).

Zvýšená exprese efluxních pump kódovaných *CDR* a *MDR* geny, je nejčastější příčinou vzniku rezistence na Flukonazol. *CDR* geny zajišťují rezistenci téměř na všechny azoly (Ghannoum a Rice, 1999, Morschhäuser, 2002).

5.1.4 Změna v biosyntetické dráze ergosterolu

Gen *ERG3* kóduje enzym Δ 5,6 sterol desaturáza, který přeměňuje 14-methyl-fekosterol na toxické steroly (episterol). Změna v biosyntetické dráze ergosterolu je dalším mechanismem vzniku rezistence. Mutace genu *ERG3*, způsobuje ztrátu funkce enzymu vytvářet toxické steroly. To se projeví sníženou účinností azolů (Klepser, 2001).

5.2 Rezistence na echinokandiny

Tato léčiva inhibují enzym β -(1,3)-D-glukan syntetázu. Tím naruší tvorbu buněčné stěny, což má za následek smrt kvasinky. Rezistence na toto léčivo bývá zatím nízká u *C. albicans*. Narůstající rezistence byla prokázána u *Candida glabrata*. Při mechanismu rezistence na echinokandiny, dochází k bodovým mutacím genu *FKS* (omezení aminokyselinových substitucí) ve dvou oblastech. U *Candida albicans*, *C. parapsilosis* a *C. guilliermondii* je to v oblastech *FKS1* a u *Candida glabrata* *FKS2*.

U *C. albicans* dochází ke změně serinu na prolin, tyrosin a fenylalanin v poloze 645 a patří mezi dominantní mutace. Rezistence závisí na expresi *FKS* genu (Morschhäuser, 2016, Balashov a Park, 2006). U *C. parapsilosis* a *C. guilliermondii* probíhá substituce prolinu na alanin v poloze 660 (Walker a Gow, 2010).

5.3 Rezistence na polyeny

Rezistence na Amfotericin B a Nystatin se vyskytuje vzácně, ale přesto některé druhy jsou rezistentní (*C. lusitaniae*). První možností vzniku rezistence, je nahrazení některých nebo všech sterolů vázající polyeny. Tím dojde ke snížení fluidity (tekutosti) membrány a snížení afinity Amfotericinu B k této membráně. Další možností je snížení obsahu ergosterolu v membráně, což může mít za následek snížení polyenové aktivity. Tyto membránové změny mohou být způsobeny mutacemi v genu *ERG3*, který se podílí na biosyntéze ergosterolu. (Canuto a Rodero, 2012, Ghannoum a Rice, 1999)

5.4 Rezistence na Flucytosin

Rezistence může vzniknout dvěma mechanismy. Prvním mechanismem je snížení cytosin-permeázové aktivity, kde následně dojde ke snížení buněčné absorpce léčiva. Druhým mechanismem je ztráta aktivity enzymu uracil fosforibozyltransferáza, který je důležitý pro přeměnu 5-fluorouracilu na kyselinu 5-fluorouridyl. Mutací genu *FCY2* (gen kódující cytosin-permeázu) vzniká rezistence vůči flucytosinu (Canuto a Rodero, 2002, Ghannoum a Rice, 1999, Loeffler a Stevens, 2003).

6 Závěr

Cílem této práce je ve stručnosti popsat mutace způsobující rezistenci u kvasinek rodu *Candida* vůči antimykotikům.

Kvasinky se řadí mezi jednobuněčné houby, které se převážně rozmnožují pučením. Pro svůj růst využívají uhlík, draslík, fosfor a stopové množství zinku, mědi a vápníku. Jako zdroj energie a uhlíku slouží kvasinkám hlavně sacharidy. Kvasinky mají nezastupitelný význam v potravinářském průmyslu při výrobě pekařského droždí, piva a vína. Ve farmaceutickém průmyslu využívají kvasinky pro produkci karotenu, koenzymu Q 10 a pro výrobu probiotik.

Některé kvasinky mohou být součástí lidského mikrobiomu. Pokud ale dojde k narušení ochranné bariéry (kůže, sliznice) nebo přemnožení kolonií, stávají se oportunními patogeny. U oslabených jedinců mohou způsobit závažná onemocnění, která mohou být až smrtelná. Kvasinkové infekce se nazývají kandidózy a jsou léčeny antimykotiky. K léčbě se nejvíce užívají azolová a polyenová antimykotika a nově echinokandiny. Častým užíváním těchto léčiv se u kvasinek rozvinula rezistence. Vzniklá rezistence u kvasinek je způsobena aneuploidií, bodovými mutacemi některých genů nebo jejich zvýšenou expresí, které způsobí například změnu nebo odstranění vazebného místa pro léčivo.

7 Použitá literatura

ANN CHAI, Louis Yi; DENNING, David W.; WARN, Peter. *Candida tropicalis* in human disease. *Critical reviews in microbiology*, 2010, 36.4: s. 282-298.

ASHBEE, H. Ruth; BIGNELL, Elaine M. (ed.). *Pathogenic yeasts*. Berlin Heidelberg: Springer, 2010, e-ISBN 978-3-642-03150-2.

BALASHOV, Sergey V.; PARK, Steven; PERLIN, David S. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, 50.6: s. 2058-2063.

BEKATOROU, Argyro; PSARIANOS, Costas; KOUTINAS, Athanasios A. Production of food grade yeasts. *Food Technology & Biotechnology*, 2006, 44.3, s. 407-415, ISSN 1330-9862.

BOJSEN, Rasmus K.; ANDERSEN, Kaj Scherz; REGENBERG, Birgitte. *Saccharomyces cerevisiae* a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, 65.2: s. 169-182.

BUCHTA, Vladimír, et al. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Dermatol. praxi*, 2009, 3.3: s. 109-118.

CALDERONE, Richard A.; CLANCY, Cornelius J. (ed.). *Candida and candidiasis*. American Society for Microbiology Press, 2011, ISBN 978-1-55581-539-4

CANUTO, Mar Masiá; RODERO, Félix Gutiérrez. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet infectious diseases*, 2002, 2.9: s. 550-563

CARRILLO-MUNOZ, A. J., et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*, 2006, 19.2: s. 130-9.

COOPER JR, Chester R. Yeasts pathogenic to humans. In: *the yeasts*. Elsevier, 2011. s. 9-19.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2007, 26.6: s. 767-778.

DADAR, Maryam, et al. *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control–An update. *Microbial pathogenesis*, 2018, 117: s. 128-138.

DEMAIN, A. L.; PHAFF, H. J.; KURTZMAN, C. P. The industrial and agricultural significance of yeasts. In: *The Yeasts*. Elsevier, 1998. s. 13-19.

D'SOUZA, Aloysius L., et al. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *Bmj*, 2002, 324.7350: 1361.

EDEL, V. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. *Applications of PCR in Mycology*, 1998, s. 1-20.

FIDEL, Paul L.; VAZQUEZ, Jose A.; SOBEL, Jack D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*, 1999, 12.1: s. 80-96.

FORCHE, Anja. Large-scale chromosomal changes and associated fitness consequences in pathogenic fungi. *Current fungal infection reports*, 2014, 8.2: s. 163-170.

GHANNOUM, Mahmoud A.; RICE, Louis B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 1999, 12.4: s. 501-517.

GÓMEZ-LÓPEZ, Alicia, et al. Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2008, 9.16: s. 2801-2816.

GULATI, Megha; NOBILE, Clarissa J. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 2016, 18.5: s. 310-321.

JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-990-1.

JIN, Yu-Lai; SPEERS, R. Alex. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 1998, 31.6-7: s. 421-440.

JOHNSON, Eric A.; ECHAVARRI-ERASUN, Carlos. Yeast biotechnology. In: *The yeasts*. Elsevier, 2011. s. 21-44.

KANAFANI, Zeina A.; PERFECT, John R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical infectious diseases*, 2008, 46.1: s. 120-128

KLADENSKÝ, MUDr Jiří. Charakter urogenitální mykotické infekce a její dopady na urologickou praxi. *Urol. praxi*, 2016, 17.2: s. 59-62.

KLEPSEK, Michael E. Antifungal resistance among *Candida* species. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 2001, 21.8P2: s. 124-132.

KLIS, Frans M., et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 2002, 26.3: s. 239-256.

KOFLA, G.; RUHNKE, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis-review of the literature. *European journal of medical research*, 2011, 16.4: s. 159.

KOT, Anna M., et al. Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied microbiology and biotechnology*, 2016, 100.14: s. 6103-6117.

LEGRAND, Mélanie, et al. Candida albicans: An Emerging Yeast Model to Study Eukaryotic Genome Plasticity. *Trends in Genetics*, 2019.

LOEFFLER, Juergen; STEVENS, David A. Antifungal drug resistance. *Clinical infectious diseases*, 2003, 36.Supplement_1: s. 31-41.

MACKENZIE, D. W. R. Serum tube identification of Candida albicans. *Journal of Clinical Pathology*, 1962, 15.6: s. 563-565.

MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 2013, 4.2: s. 119-128.

MCMANUS, Brenda A.; COLEMAN, David C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Candida albicans. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 21: s. 166-178.

MORSCHHÄUSER, Joachim. The genetic basis of fluconazole resistance development in Candida albicans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2002, 1587.2-3: s. 240-248.

MORSCHHÄUSER, Joachim. The development of fluconazole resistance in Candida albicans—an example of microevolution of a fungal pathogen. *Journal of microbiology*, 2016, 54.3: s. 192-201.

NESS, FrÉdÉrique, et al. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1993, 62.1: s. 89-94.

NOBILE, Clarissa J., et al. Function of Candida albicans adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryotic cell*, 2006, 5.10: s. 1604-1610.

NOBILE, Clarissa J., et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS pathogens*, 2006, 2.7: s. 63.

PATOČKA, Jiří. Sordarin, antimykotikum s unikátním mechanismem účinku. 2011

PERLIN, David S. Echinocandin resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, 61.suppl_6: s. 612-617.

RAI, Amit Kumar; PANDEY, Ashok; SAHOO, Dinabandhu. Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in food science & technology*, 2018.

RODRIGUES, Célia F.; SILVA, S.; HENRIQUES, Mariana. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2014, 33.5: s. 673-688.

ROZSYPAL, Hanuš, et al. Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2008, 22.1: s. 40-44.

SAMARANAYAKE, Yuthika H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Journal of medical microbiology*, 1994, 41.5: s. 295-310.

SARDI, J. C. O., et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 2013, 62.1: s. 10-24.

SASSE, Christoph, et al. The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 2012, 86.3: s. 539-556.

SILVA, Sónia, et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 2012, 36.2: s. 288-305.

SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Darío. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*, 2013, 2013.

SULLIVAN, Derek; COLEMAN, David. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *Journal of clinical microbiology*, 1998, 36.2: s. 329-334.

SULLIVAN, Derek J., et al. *Candida dubliniensis*: an update. *Revista iberoamericana de micología*, 1999, 16: s. 72-76.

TENOVER, Fred C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 2006, 119.6: s. 3-10.

THAYIKKANNU, Ambujavalli Balakrishnan; KINDO, Anupma Jyoti; VEERARAGHAVAN, Mahalakshmi. *Malassezia*—can it be ignored?. *Indian journal of dermatology*, 2015, 60.4: s. 332.

TROFA, David; GÁCSEK, Attila; NOSANCHUK, Joshua D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 2008, 21.4: s. 606-625.

TROUBIL, Martin, et al. Infekční endokarditida. *Intervenční a akutní kardiologie*, 2007, 6.4: s. 139-143.

VAN DEN HAZEL, H. Bart; KIELLAND-BRANDT, Morten C.; WINTHER, Jakob R. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*, 1996, 12.1: s. 1-16.

VAN DER KLEI, Ida J., et al. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2006, 1763.12: s. 1453-1462.

VARELA, Cristian; BORNEMAN, Anthony R. Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 2017, 34.3: s. 111-128.

VERSTREPEN, Kevin J .; KLIS, Frans M. Flokulace, adheze a tvorba biofilmu v kvasinkách. *Molekulární mikrobiologie* , 2006, 60,1: s. 5-15.

VOLTAN, Aline Raquel; FUSCO-ALMEIDA, Ana Marisa; MENDES-GIANNINI, Maria José Soares. Candiduria: epidemiology, resistance, classical and alternative antifungals drugs. *SOJ Microbiol Infect Dis*, 2014, 2.2: s. 1-7.

VOTAVA, Miroslav, et al. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Neptun, 2010.

WALKER, Graeme M. Yeast. In: *Desk Encyklopedie mikrobiologie*, 2. vydání. Elsevier / Academic Press, 2009.

WALKER, Louise A.; GOW, Neil AR; MUNRO, Carol A. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47.2: s. 117-126.

WAUGH, Christine D. *Agents Acting on Fungal Cell Membranes*. 2007.

WELLEHAN, James FX, et al. Infectious disease. In: *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery*. WB Saunders, 2016. s. 22-106.

WIRTH, Fernanda; GOLDANI, Luciano Z. Epidemiology of Rhodotorula: an emerging pathogen. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012, 2012.

WHITE, Theodore C.; MARR, Kieren A.; BOWDEN, Raleigh A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 1998, 11.2: s. 382-402.

YANG, Yun-Liang. Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 2003, 36.4: s. 223-228.

ZAMORA, Fernando. Biochemistry of alcoholic fermentation. In: *Wine chemistry and biochemistry*. Springer, New York, NY, 2009. s. 3-26.

ZAZULA, R., et al. Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní medicína pro praxi*, 2005, 7: s. 349-353.

ZHU, Jin, et al. Cellular stress associated with aneuploidy. *Developmental cell*, 2018, 44.4: s. 420-431.